



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102037010 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200980116204. 9

代理人 权陆军 李连涛

(22) 申请日 2009. 05. 05

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

*C07K 16/00* (2006. 01)

61/050336 2008. 05. 05 US

12/387359 2009. 05. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/042761 2009. 05. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/137424 EN 2009. 11. 12

(83) 生物保藏信息

ATCC 68629 1991. 05. 31

ATCC CRL-10762 1991. 05. 31

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 G · 弗拉特萨诺斯 J-C · 贝克

M · 科波

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

权利要求书 1 页 说明书 47 页 序列表 4 页  
附图 3 页

(54) 发明名称

预防具有未分化关节炎的受试者中类风湿性  
关节炎发展的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过给有此需要的受试者施用有效量的可溶性 CTLA4 分子,用于治疗未分化关节炎(UA)和/或预防具有UA的受试者中类风湿性关节炎(RA)发展的方法和组合物。

1. 一种用于治疗受试者中的 UA 的方法,其包括给所述受试者施用 CTLA4 分子,其中所述 CTLA4 分子结合 CD80 和 / 或 CD86,并且包括从在第 26 位上的丙氨酸或是在第 27 位上的甲硫氨酸开始并且以在第 150 位上的天冬氨酸结束的如 SEQ ID NO :2 中所示的 CTLA4 细胞外结构域,或其结合 CD80 和 / 或 CD86 的部分。

2. 权利要求 1 的方法,其进一步包括改变所述 CTLA4 分子的溶解度或亲和力的氨基酸序列。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述改变溶解度或亲和力的氨基酸序列包括免疫球蛋白。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述免疫球蛋白是免疫球蛋白恒定区或其部分。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分进行突变,以减少效应子功能。

6. 权利要求 4 的方法,其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分包括人或猴免疫球蛋白分子的铰链、CH2 和 CH3 区。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分包括人或猴免疫球蛋白分子的铰链、CH2 和 CH3 区。

8. 一种用于治疗受试者中的 UA 的方法,其包括给所述受试者施用 CTLA4 分子,其中所述 CTLA4 分子包括:

(a)SEQ ID NO :2 的从在第 27 位上的甲硫氨酸开始,并且以在第 383 位上的赖氨酸结束的氨基酸序列,或

(b)SEQ ID NO :2 的从在第 26 位上的丙氨酸开始,并且以在第 383 位上的赖氨酸结束的氨基酸序列。

9. 一种用于治疗受试者中的 UA 的方法,其包括给所述受试者施用由指定 ATCC®编号 68629 的核酸分子编码的 CTLA4 分子。

10. 权利要求 1 或权利要求 8 的方法,其用于减少 UA 的症状。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述症状选自关节肿胀、关节压痛、炎症、晨僵和疼痛。

12. 权利要求 1-8 中任一项的方法,其中所述药物组合物用于以 10mg/kg 受试者重量的量施用所述可溶性 CTLA4 融合分子。

13. 权利要求 1 或权利要求 8 的方法,其用于抑制结构性伤害。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述结构性伤害选自腕和手中的侵蚀、腕和手中的骨髓水肿、腕和手中的滑膜炎。

## 预防具有未分化关节炎的受试者中类风湿性关节炎发展的方法

### 发明领域

[0001] 总的来说,本发明涉及免疫系统疾病例如未分化关节炎(UA)领域。具体地,本发明涉及通过给有此需要的受试者施用有效量的可溶性 CTLA4 分子,用于治疗 UA 和 / 或预防具有 UA 的受试者中 RA 发展的方法和组合物。

### [0002] 发明背景

[0003] 类风湿性关节炎(RA)是最常见的炎性关节炎,影响全世界约1%的人口(Wolfe, F., "The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis", Baillieres Clin. Rheumatol., 9(4):619-632(1995年11月))。与男性相比较,女性发展疾病的可能性为2-3倍,其中峰发病率在生命的第40到第60年之间(Hochberg, M.C. 等人, "Epidemiology of rheumatoid arthritis: update", Epidemiol. Rev., 12:247-252(1990); Markenson, J.A., "Worldwide trends in the socioeconomic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis", Semin. Arthritis Rheum., 21(2Suppl. 1):4-12(1991年10月); Spector, T.D., "Rheumatoid arthritis", Rheum. Dis. Clin. North Am., 16(3):513-537(1990年8月); 和 Zvaifler, N.J., "Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis", in Arthritis and Allied Conditions, McCarty, D.J., Koopman, W.J., 编辑 Philadelphia: Lea & Febiger, 723-736(1993))。尽管 RA 在临床上由于影响滑膜关节的严重炎症而识别,但它也是具有频繁关节外表现的全身性疾病。不幸的是, RA 的自然史的特征在于关节破坏、躯体功能受损和不良的健康相关的生活质量。

[0004] 越来越多的科学证据表明关节破坏在 RA 早期发生。超过90%的受试者在 RA 诊断后2年内具有通过常规射线照相术的关节伤害证据(Emery, P., "The Optimal Management of Early Rheumatoid Disease: The Key to Preventing Disability", Br. J. Rheum., 33:765-768(1994))。使用更灵敏的技术例如 MRI 或超声可以在症状发作数周内检测出关节伤害(McGonagle, D. 等人, "The relationship between synovitis and bone changes in early untreated rheumatoid arthritis", Arthritis Rheum., 42:1706-1711(1999) 和 Wakefield, R.J. 等人, "The value of sonography in the detection of bone erosion in patients with rheumatoid arthritis: A comparative study with conventional radiography", Arthritis Rheum., 43:2761-2770(2000))。这些发现已造成渐增的关于可以有效抑制炎症过程的治疗的需要,所述炎症过程引起在 RA 早期的骨和软骨丧失,并且已越来越注重 RA 的较早诊断和治疗。

[0005] 然而,与具有更确定疾病的受试者相比较,当应用于具有早期炎性关节炎的受试者时,1987 美国风湿病协会(American Rheumatism Association)(ARA)关于 RA 的标准更不灵敏和特异。具有早期炎性关节炎的受试者可能具有寡关节炎(oligoarthritis)而不是多关节炎,可能有关节炎症状小于6周,或根据常规射线照相术可能最初缺乏类风湿因子、类风湿性结节或侵蚀(Van Gaalen, F.A. 等人, "Autoantibodies to Cyclic

Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 50(3) :709-715(2004))。因此, 这些受试者在疾病过程早期通常未能满足 1987RA( 或任何其他风湿性疾病) 诊断标准。这些受试者随后通过排除过程诊断为具有未分化关节炎 (UA)。提交给设计用于早期炎性关节炎诊断和管理的专门三级护理中心的约 40% 受试者未满足 RA 或任何其他风湿性疾病诊断标准 (Van Gaalen, F.A. 等人, “Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 50(3) :709-715(2004))。因此, 未分化关节炎是常见的临床实体。

[0006] 正常滑膜是包围关节间隙且使关节间隙分离的组织。细胞的衬里层由巨噬细胞样和成纤维细胞样滑膜细胞组成, 覆盖包含少量树突细胞、成纤维细胞、肥大细胞和血管结构的薄结缔组织基质 (Konttinen, Y. T. 等人, “Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates”, *Arthritis Rheum.*, 24(1) :71-79(1981 年 1 月))。

[0007] 在 RA 中, 滑液组织变得明显增厚和肿胀。随着疾病进展, 存在滑膜细胞的逐步增殖和募集, 以及炎性细胞募集进入滑膜内 (Konttinen, Y. T. 等人, “Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates”, *Arthritis Rheum.*, 24(1) :71-79(1981 年 1 月))。滑膜中最高达 50% 的浸润白细胞是 T 淋巴细胞, 主要是具有活化 / 记忆表型的 CD4+T 细胞 (Konttinen, Y. T. 等人, “Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates”, *Arthritis Rheum.*, 24(1) :71-79(1981 年 1 月) ; Forre, O. 等人, “Augmented numbers of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of subjects with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis: in vivo-activated T lymphocytes are potent stimulators in the mixed lymphocyte reaction”, *Scand. J. Immunol.*, 15(2) :227-231(1982 年 2 月) ; Van-Boxel, J. A. 等人, “Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes”, *N. Engl. J. Med.*, 293(11) :517-520(1975 年 9 月) ; Kidd, B. L. 等人, “Immunohistological features of synovitis in ankylosing spondylitis: a comparison with rheumatoid arthritis”, *Ann. Rheum. Dis.*, 48(2) :92-98(1989 年 2 月) ; Cush, J. J. 等人, “Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from subjects with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 31(10) :230-238(1988 年 10 月) ; Laffon, A. 等人, “Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis”, *J. Clin. Invest.*, 88(2) :546-552(1991 年 8 月) ; 和 Klareskog, L. 等人, “Relationship between HLA DR expressing cells and T lymphocytes of different subsets in rheumatoid synovial tissue”, *Scand. J. Immunol.*, 15(5) :501-507(1981 年 5 月))。单核细胞 / 巨噬细胞起源的细胞也变得在类风湿滑膜中突出, 占最高达 20% 的细胞, 并且它们也显示活化表型 (Firestein, G. S. 等人, “How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis ?” *Arthritis Rheum.*, 33(6) :768-773(1990 年 6 月) )

和 Firestein, G. S. 等人, “Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid”, *J. Immunol.*, 144(9) :3347-3353(1990 年 5 月 1 日)). 类风湿滑膜中的单核细胞 / 巨噬细胞样细胞产生一大批促炎分子, 包括细胞因子 IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6、GM-CSF, 以及蛋白水解酶, 包括胶原酶和基质金属蛋白酶。B 细胞、浆细胞和嗜中性粒细胞占类风湿滑膜中小于 5% 的细胞, 尽管嗜中性粒细胞在滑液中是突出的 (Konttinen, Y. T. 等人, “Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates”, *Arthritis Rheum.*, 24(1) :71-79(1981 年 1 月) ;Forre, O. 等人, “Augmented numbers of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of subjects with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis :in vivo-activated T lymphocytes are potent stimulators in the mixed lymphocyte reaction”, *Scand. J. Immunol.*, 15(2) :227-231(1982 年 2 月) ;和 Firestein, G. S. 等人, “Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid”, *J. Immunol.*, 144(9) :3347-3353(1990 年 5 月 1 日))。

[0008] 随着滑膜增殖和炎症进展, 血管、炎性滑膜组织的扩张团块被称为血管翳。血管翳负责侵入关节软骨且破坏骨。活化 T 细胞的产物被认为是血管翳形成和扩张背后的驱动因子 (Zvaifler, N. J. 等人, “Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 37(6) :783-789(1994 年 6 月))。

[0009] 类风湿滑膜中的单核细胞 / 巨噬细胞样细胞和树突细胞表达 II 类 MHC 以及共刺激分子例如 CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2), 并且可能起抗原呈递细胞的作用 (Balsa, A. 等人, “Differential expression of the costimulatory molecules B7.1(CD80) and B7.2(CD86) in rheumatoid synovial tissue”, *Br. J. Rheumatol.*, 35(1) :33-37(1996 年 1 月) ;Liu, M. F. 等人, “The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium”, *Arthritis Rheum.*, 39(1) :110-114(1996 年 1 月) ;Ranheim, E. A. 等人, “Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 37(11) :1637-1646(1994 年 11 月) ;Sfikakis, P. P. 等人, “Expression of CD28, CTLA4, CD80, and CD86 molecules in subjects with autoimmune rheumatic diseases :implications for immunotherapy”, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 83(3) :195-198(1997 年 6 月) ;和 Thomas, R. 等人, “Functional differentiation of dendritic cells in rheumatoid arthritis :role of CD86 in the synovium”, *J. Immunol.*, 156(8) :3074-3086(1996 年 4 月 15 日))。表达 CD28 的活化 CD4+T 细胞是类风湿滑膜中突出的浸润细胞类型, 并且通常发现其与表达 II 类 MHC 和共刺激分子的细胞邻近。这暗示 T 细胞活化 / 共刺激在滑膜炎症发病机理中的重要作用。这与实验观察一致 :通过与滑膜细胞和破骨细胞的细胞与细胞接触, 或通过分泌的细胞因子的苦心经营, 活化 T 细胞是驱动 RA 中的滑膜炎和骨破坏的主要因子。总之, 这些观察暗示活化 T 细胞和通过 CD28 递送的共刺激信号在驱动 RA 的免疫病理学中起关键作用。

[0010] 治疗 RA 的方法已朝向在诊断后较早时起始缓解疾病的抗风湿性药物 (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug) (DMARD) 疗法发展, 伴随药物疗法的后续最佳化, 以对疾病结果具有更大的有利影响 (Redlich, K. 等人, “Rheumatoid Arthritis Therapy After

Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Blockade”, *Arthritis Rheum.*, 40(12) : 3308-3319(2003))。然而,不存在关于具有 UA 患者治疗的护理标准 (Harrison, B. J. 等人, “Natural remission in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction”, *Br. J. Rheumatol.*, 35 : 1096-1100(1996))。这在很大程度上是由于基于目前常用的临床特征, 临床医生无法精确测定这些受试者的预后及其发展 RA 的危险。未分化关节炎可能自发缓和, 进展至分化风湿性疾病例如 RA 或保持未分化 (Quinn, M. A. 等人, “Evaluation and management of early inflammatory polyarthritis”, *Rheumatology*, 第 3 版, MOSBY (Elsevier Limited), 885-891(2003))。由于关于预后的不确定性, DMARDs 通常在具有 UA 的受试者中发作时不起始。相反, NSAIDs 通常是在口服皮质类固醇之前采用的第一批药物。DMARDs 通常在关节炎症状和病征难以由前 2 种类型干预控制时使用。因此, 常规采用“金字塔”法 (Harrison, B. J. 等人, “Natural remission in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction”, *Br. J. Rheumatol.*, 35 : 1096-1100(1996))。然而, 不幸的是, 这种方法可能在潜在地疾病改善疗法起始前允许患者发展关节伤害和破坏。

[0011] 仍然没有经批准的抗风湿疗法被证实从根本上改变未分化关节炎的病程且预防 RA 的发展。已在短过程的 TNF 拮抗剂疗法后在靶向早期 RA 预防 / 缓和的临床试验中对靶向 TNF  $\alpha$  的试剂英夫单抗进行研究。然而, 公开的数据证实 6 个月过程的 TNF 拮抗剂疗法不预防 UA 进展至 RA (Saleem, B. 等人, *Rheumatology, Academic Unit of Musculoskeletal Disease, Leeds, United Kingdom, Ann. Rheum. Dis.*, 66 (Suppl. II) : 186 (2007))。

[0012] 明显需要通过选择性靶向 T 细胞活化且预防 RA 发展, 可以给具有未分化关节炎处于发展 RA 的高度危险中的受试者提供从根本上改变其疾病过程的机会的治疗。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了预防或抑制具有 UA 的受试者中 RA 发展的方法, 其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0015] 本发明进一步提供了减缓或延缓具有 UA 的受试者中 RA 发展的方法, 其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0016] 本发明还提供了治疗具有 UA 的受试者的方法, 其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0017] 本发明提供了施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物, 从而减轻具有 UA 的受试者中与疾病相关的至少一种症状, 包括减少: 关节肿胀、关节压痛、炎症、晨僵和疼痛、以及结构性伤害, 随后减少躯体能力丧失。

[0018] 本发明的方法还可以用于改善具有 UA 的受试者的躯体功能, 如通过健康评定问卷 (Health Assessment Questionnaire) (HAQ) 和 / 或健康相关的生活质量 (SF-36) 工具 (instrument) 评估的。

[0019] 本发明的方法还可以用于抑制具有 UA 的受试者中的关节结构性伤害, 如通过腕和手的侵蚀和骨髓水肿评分和 / 或滑膜炎评分评估的。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1 呈现了关于 CTLA4-Ig 分子表达盒的部分的核苷酸序列 (SEQ ID NO : 1)。还显示的是由核酸编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 2)。可以由这种表达盒产生的 CTLA4-Ig 分子

包括具有下述残基的氨基酸序列的分子：(i)SEQ ID NO:2 的 26-383、(ii)SEQ ID NO:2 的 26-382、(iii)SEQ ID NO:2 的 27-383、或 (iv)SEQ ID NO:2 的 26-382、或任选地 (v)SEQ ID NO:2 的 25-382、或 (vi)SEQ ID NO:2 的 25-383。表达盒包括下述区域：(a) 制瘤素 M 信号序列 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 11-88；SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-26)；(b) 人 CTLA4 的细胞外结构域 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 89-463；SEQ ID NO:2 的氨基酸 27-151)；(c) 人 IgG1 恒定区的修饰部分 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 464-1159；SEQ ID NO:2 的氨基酸 152-383)，包括经修饰的铰链区 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 464-508；SEQ ID NO:2 的氨基酸 152-166)、经修饰的人 IgG1 CH2 结构域 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 509-838；SEQ ID NO:2 的氨基酸 167-276)、和人 IgG1 CH3 结构域 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 839-1159；SEQ ID NO:2 的氨基酸 277-383)。

[0022] 图 2 描述了到由于 RA 发展而中断的时间，如在实施例 III 中描述的临床研究中评估的。

[0023] 发明详述

[0024] 如本文利用的：

[0025] 术语“CTLA4-Ig”或“CTLA4-Ig 分子”或“CTLA4Ig 分子”可互换使用，并且指包括至少这样的多肽的蛋白质分子，所述多肽具有 CTLA4 细胞外结构域或其部分和免疫球蛋白恒定区或其部分。细胞外结构域和免疫球蛋白恒定区可以是野生型、或突变型或经修饰的，和哺乳动物的，包括人或小鼠。多肽可以进一步包括另外的蛋白质结构域。CTLA4-Ig 分子也可以指多聚体形式的多肽，例如二聚体、四聚体和六聚体。CTLA4-Ig 分子也能够与 CD80 和 / 或 CD86 结合。

[0026] 术语“B7-1”指 CD80；术语“B7-2”指 CD86；并且术语“B7”指 B7-1 和 B7-2 两者 (CD80 和 CD86)。术语“B7-1-Ig”或“B7-1Ig”指 CD80-Ig；术语“B7-2-Ig”或“B7-2Ig”指 CD86-Ig。

[0027] 在一个实施方案中，“CTLA4Ig”指具有下述残基的氨基酸序列的蛋白质分子：(i)SEQ ID NO:2 的 26-383、(ii)SEQ ID NO:2 的 26-382、(iii)SEQ ID NO:2 的 27-383、或 (iv)SEQ ID NO:2 的 27-382、或任选地 (v)SEQ ID NO:2 的 25-382、或 (vi)SEQ ID NO:2 的 25-383。在单体形式中，这些蛋白质在本文中可以被称作“SEQ ID NO:2 单体”或“具有 SEQ ID NO:2 序列的”单体。这些 SEQ ID NO:2 单体可以二聚化，从而使得二聚体组合可以包括例如：(i) 和 (i)；(i) 和 (ii)；(i) 和 (iii)；(i) 和 (iv)；(i) 和 (v)；(i) 和 (vi)；(ii) 和 (ii)；(ii) 和 (iii)；(ii) 和 (iv)；(ii) 和 (v)；(ii) 和 (vi)；(iii) 和 (iii)；(iii) 和 (iv)；(iii) 和 (v)；(iii) 和 (vi)；(iv) 和 (iv)；(iv) 和 (v)；(iv) 和 (vi)；(v) 和 (v)；(v) 和 (vi)；以及 (vi) 和 (vi)。这些不同的二聚体组合也可以彼此结合以形成四聚体 CTLA4Ig 分子。这些单体、二聚体、四聚体和其他多聚体在本文中可以被称作“SEQ ID NO:2 蛋白质”或“具有 SEQ ID NO:2 序列的”蛋白质。(编码如 SEQ ID NO:2 中所示 CTLA4Ig 的 DNA 根据布达佩斯条约规定于 1991 年 5 月 31 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC®)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209，并且已给予 ATCC® 登记号 ATCC® 68629；表达如 SEQ ID NO:2 中所示的 CTLA4Ig 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系于 1991 年 5 月 31 日保藏，具有 ATCC® 鉴定号 CRL-10762)。

[0028] “原料药 (drug substance)”指在最终药物产品配制中利用的原材料。一般的 CTLA4Ig 原料药组合物包括 20mg/ml-60mg/ml 蛋白质浓度，6-8 的 pH 和 < 5% 的 % HMW 种

类。

[0029] “配制的本体溶液 (bulk solution)”指在容器填充前的最终制剂,例如在填充小瓶用于冻干前的配制的溶液,或在填充注射器用于 SC 注射前的配制的溶液。

[0030] “药物产品”指在容器中包装的最终制剂,其可以在使用前重构,例如对于冻干药物产品;在使用前进一步稀释,例如对于液体药物产品;或按原样使用,例如对于 SC 溶液药物产品。

[0031] “健康评定问卷 (HAQs)”指用于就疾病活动性症状评估患者的一组问题。这些症状包括:关节肿胀、关节压痛、炎症、晨僵、在关于其身体健康和功能的自填问卷中由每个患者评估的疾病活动性和能力丧失,如医生评估的疾病活动性和能力丧失,以及疼痛 (Fries, J. F. 等人, J. Rheumatology, 9 :789-793 (1982))。

[0032] “医疗结果研究简表 -36 (SF-36)”指用于评估疗法对健康相关的生活质量 (HRQOL) 影响的表格。SF-36 由涵盖 4 个躯体和 4 个心理领域 (躯体功能、因躯体问题引起的角色限制 (role-physical)、身体疼痛、一般健康、生命力、社会功能、因情绪问题引起的角色限制 (roleemotional) 和心理健康) 的 36 项组成。这些个别领域用于获得从 0 到 100 的躯体和心理组分总结评分,其中越高的评分指示越好的生活质量。

[0033] “1987 修订的美国风湿病协会 (ARA) 类风湿性关节炎 (RA) 分类标准”指下表 1 中描述的一组标准。为了分类目的,如果受试者已满足 7 个标准中的至少 4 个,那么他或她被说成具有 RA。标准 1 到 4 必须存在至少 6 周。

[0034] 表 1 1987 修订的 ARA 的 RA 分类标准

[0035]



| 标准                    | 定义                                                                                  |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 晨僵                 | 在最大限度改善前关节中及关节周围的晨僵持续至少 1 小时                                                        |
| 2. 3 个或 3 个以上关节区域的关节炎 | 至少 3 个关节区域同时具有由医生观察到的软组织肿胀或软组织液（不是单纯骨生长过度）（14 个可能关节区域是[右或左] PIP、MCP、腕肘、膝、踝和 MTP 关节） |
| 3. 手关节的关节炎            | 腕、MCP 或 PIP 关节中至少一个关节区域如上的肿胀                                                        |
| 4. 对称性的关节炎            | 身体双侧上的相同关节区域（与标准 2 中一样）同时受累（在无绝对对称的情况下，PIP、MCP 或 MTP 关节的双侧受累也是可接受的）                 |
| 5. 类风湿性结节             | 由医生观察到的在骨突或伸肌表面上或在近关节区域中的皮下结节                                                       |
| 6. 血清类风湿因子            | 通过在小于 5% 的正常对照受试者中阳性的任何方法证实异常量的血清“类风湿因子”                                            |
| 7. 射线照相术的改变           | 在 PA 手和腕射线照片上典型的 RA 改变，这必须包括局限于受累关节或与受累关节最明显相邻的侵蚀或明确的骨脱钙作用（单独的骨关节炎改变不合格）            |

[0036] 缩写:ARA,美国风湿病协会;PIP,近端指间;MCP,掌指;MTP,跖趾;RA,类风湿性关节炎;PA,后前位的\*。

[0037] 术语“ACR”指基于由美国风湿病学学会(American College of Rheumatology)确立的标准的临床应答研究。ACR核心数据集和应答定义(ACR Core Data Set and Response Definitions)在下表2中描述。如果存在压痛和肿胀关节计数中的20%改善以及所测量的5种其余症状的3种中的20%改善,例如患者和医生总体疾病改变、疼痛、躯体能力丧失、和急性期反应物例如C反应蛋白(CRP)或快速安全报告(ESR),那么受试者满足“ACR20”标准(Felson,D. T. 等人,Arthritis Rheum.,36:729-740(1993);Felson,D. T. 等人,Arthritis Rheum.,38:1-9(1995))。类似地,如果存在压痛和肿胀关节计数中的分别50或70%改善,以及所测量的5种其余症状的3种中的分别50或70%改善,例如患者和医生总体疾病改变、疼痛、躯体能力丧失、和急性期反应物例如CRP或ESR,那么受试者满足“ACR50”或“ACR70”标准。

[0038] 表2 ACR核心数据集和应答定义

[0039]

| ACR 核心数据集组分       | 批准的测量工具                   |
|-------------------|---------------------------|
| 1. 压痛关节计数         | 标准化的 68 关节计数              |
| 2. 肿胀关节计数         | 标准化的 66 关节计数              |
| 3. 受试者对疼痛的总体评价    | 0-100mm 视觉模拟量表            |
| 4. 受试者对疾病活动性的总体评价 | 0-100mm 视觉模拟量表            |
| 5. 医生对疾病活动性的总体评价  | 0-100mm 视觉模拟量表            |
| 6. 受试者对躯体功能的评价    | 健康评定问卷 (HAQ)              |
| 7. 急性期反应物值        | ESR (Westergren) 和 C 反应蛋白 |

[0040] 当人们具有 2 个或更多个关节的有症状临床滑膜炎且具有至少一个且不超过 3 个表 1 中所述美国风湿病协会 (1987) RA 分类标准时,他们被诊断有未分化关节炎 (UA)。

[0041] 如本文使用的,“治疗”UA 意指通过药物或其他疗法管理 UA。UA 的治疗可以抑制与疾病相关的免疫介导的事件,改善疾病或病症症状,减少疾病严重性,改变疾病进展过程和 / 或改善或治愈疾病。例如,治疗 UA 可通过调节免疫应答来实现,例如通过调节功能性 CTLA4 和 / 或 CD28 阳性细胞与 B7 阳性细胞的相互作用。可替代地,治疗 UA 可以通过经由使用本文描述的组合物预防或抑制疾病进展至 RA 来实现。例如,治疗 UA 包括如通过 MRI 测量的关节侵蚀抑制。

[0042] 血清样品可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 就 CTLA4Ig 进行分析。

[0043] CTLA4-Ig 单体和多聚体

[0044] CTLA4-Ig 分子可以包括例如单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或其他多聚体形式的 CTLA4-Ig 蛋白质。CTLA4-Ig 分子可以包括具有至少 CTLA4 的细胞外结构域和免疫球蛋白恒定区的蛋白质融合物。CTLA4-Ig 分子可以具有例如就 CTLA4 细胞外结构域和免疫球蛋白恒定区序列而言的野生型或突变序列。单独的 CTLA4-Ig 单体或二聚体、四聚体或其他多聚体形式可以是糖基化的。

[0045] 在一些实施方案中,本发明提供了具有至少特定百分比的二聚体或其他多聚体分子的 CTLA4-Ig 分子群体。例如,本发明提供了超过 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% CTLA4-Ig 二聚体的 CTLA4-Ig 分子群体。在一个实施方案中,本发明提供了包括约 95% - 约 99.5% CTLA4-Ig 二聚体和约 0.5% - 约 5% CTLA4-Ig 四聚体的 CTLA4-Ig 分子群体。在另一个实施方案中,CTLA4 分子群体包括约 98% CTLA4-Ig 二聚体、约 1.5% CTLA4-Ig 四聚体和约 0.5% CTLA4-Ig 单体。

[0046] 在一个实施方案中,本发明提供了 CTLA4-Ig 分子群体,其中所述群体基本上不合 CTLA4-Ig 单体分子。基本上不含 CTLA4-Ig 单体分子可以指具有小于 1%、0.5% 或 0.1% 单体的 CTLA4-Ig 分子群体。

[0047] 在一个实施方案中,本发明提供了 CTLA4-Ig 分子群体,其中所述群体基本上不合大于二聚体的 CTLA4-Ig 多聚体,例如四聚体、六聚体等。基本上不合大于二聚体的 CTLA4-Ig 多聚体分子可以指具有小于 6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.1% 的大于二

聚体形式的 CTLA4-Ig 多聚体的 CTLA4-Ig 分子群体。

[0048] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 单体分子可以具有例如下述氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:2 的 26-383、(ii)SEQ ID NO:2 的 26-382、(iii)SEQ ID NO:2 的 27-383、或(iv)SEQ ID NO:2 的 27-382、或任选地(v)SEQ ID NO:2 的 25-382、或(vi)SEQ ID NO:2 的 25-383。当包括 SEQ ID NO:1 的核酸序列的表达盒在 CHO 细胞中表达时,所表达的占优势单体形式具有甲硫氨酸的 N 末端氨基酸残基(SEQ ID NO:2 的残基 27),这与野生型人 CTLA4 的 N 末端氨基酸残基对应。然而,因为 SEQ ID NO:1 还包括关于制瘤素 M 信号序列的编码序列(SEQ ID NO:1 的核苷酸 11-88),所以由 SEQ ID NO:1 表达的蛋白质包含制瘤素 M 信号序列。在蛋白质从细胞质输出或分泌到细胞外的过程中,信号序列从表达的蛋白质中切割。但切割可以导致 N 末端变体,例如在氨基酸残基 25 和 26 之间的切割(导致残基 26 的 N 末端,即,“Ala 变体”),或在氨基酸残基 24 和 25 之间切割(导致残基 2 的 N 末端,即“Met-Ala 变体”),与在氨基酸残基 26 和 27 之间的切割(导致残基 27 的 N 末端)形成对比。例如, Met-Ala 变体可以以约 1% 存在于 CTLA4-Ig 分子的混合物中,并且 Ala 变体可以以约 8-10% 存在于 CTLA4-Ig 分子的混合物中。此外,由于不完全加工,由 SEQ ID NO:1 表达的蛋白质可以具有 C 末端变体。占优势的 C 末端是在 SEQ ID NO:2 的残基 382 处的甘氨酸。在 CTLA4-Ig 分子的混合物中,在 C 末端上具有赖氨酸(SEQ ID NO:2 的残基 383)的单体可以例如以约 4-5% 存在。

[0049] CTLA4-Ig 单体分子可以包括人 CTLA4 的细胞外结构域。在一个实施方案中,细胞外结构域可以包括 SEQ ID NO:1 的核苷酸 89-463 的核苷酸序列,其编码 SEQ ID NO:2 的氨基酸 27-151。在另一个实施方案中,细胞外结构域可以包括人 CTLA4 的突变序列。在另一个实施方案中,细胞外结构域可以包括对于 SEQ ID NO:1 的核苷酸 89-463 的核苷酸改变,从而使得产生保守氨基酸改变。在另一个实施方案中,细胞外结构域可以包括与 SEQ ID NO:1 的核苷酸 89-463 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列。

[0050] CTLA4-Ig 单体分子可以包括人免疫球蛋白的恒定区。这个恒定区可以是恒定区的部分;这个恒定区可以具有野生型或突变序列。恒定区可以来自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。恒定区可以来自免疫球蛋白的轻链或重链。当恒定区来自 IgG、IgD 或 IgA 分子时,恒定区可以包括下述恒定区结构域中的一个或多个:CL、CH1、铰链、CH2 或 CH3。当恒定区来自 IgM 或 IgE 时,恒定区可以包括下述恒定区结构域中的一个或多个:CL、CH1、CH2、CH3 或 Ca4。在一个实施方案中,恒定区可以包括来自 IgG、IgD、IgA、IgM 或 IgE 的一个或多个恒定区。

[0051] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 单体分子包括经修饰的人 IgG1 铰链区(SEQ ID NO:1 的核苷酸 464-508;SEQ ID NO:2 的氨基酸 152-166),其中在 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 156、162 和 165 处的丝氨酸已由野生型序列中存在的半胱氨酸进行工程改造。

[0052] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 单体分子包括经修饰的人 IgG1 CH2 区和野生型 CH3 区(经修饰的人 IgG1 CH2 结构域具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸 509-838 和 SEQ ID NO:2 的氨基酸 167-276;人 IgG1 CH3 结构域具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸 839-1159 和 SEQ ID NO:2 的氨基酸 277-383)。

[0053] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 分子群体包括具有于 2006 年 8 月 22 日授权的

美国专利号 7,094,874 的图 7、8 或 9 中任何一个或多个中以及美国专利申请公开号 2003/0083246 和 2004/0022787 中所示的序列的单体,所述专利以及专利申请在此整体引入本文作为参考。

[0054] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 四聚体分子包括 2 个 CTLA4-Ig 多肽对或二聚体,其中每个多肽具有下述氨基酸序列之一:(i)SEQ ID NO:2 的 26-383、(ii)SEQ ID NO:2 的 26-382、(iii)SEQ ID NO:2 的 27-383、或 (iv)SEQ ID NO:2 的 27-382、或任选地 (v)SEQ ID NO:2 的 25-382、或 (vi)SEQ ID NO:2 的 25-383。多肽或二聚体对的每个成员与另一个成员共价连接,并且 2 个多肽对彼此非共价结合,从而形成四聚体。此种四聚体分子能够与 CD80 或 CD86 结合。

[0055] 在另一个实施方案中,此种四聚体分子可以与 CD80 或 CD86 结合,其抗体亲抗原性 (avidity) 为 CTLA4-Ig 二聚体 (其单体具有上述氨基酸序列之一) 与 CD80 或 CD86 的结合抗体亲抗原性的至少 2 倍。在另一个实施方案中,此种四聚体分子可以与 CD80 或 CD86 结合,其抗体亲抗原性为野生型 CTLA4 与 CD80 或 CD86 的结合亲和力或抗体亲抗原性的至少 2 倍。此种更大的抗体亲抗原性可以促成在治疗如下所述的免疫病症和其他疾病中的更高功效。此外,更大或改善的抗体亲抗原性可以产生药物的更高效力结果。例如,包括 CTLA4-Ig 四聚体的治疗组合物将具有比相同量的具有 CTLA4-Ig 单体的治疗组合物更高的抗体亲抗原性,且因此更高的效力。在另一个实施方案中,与 CTLA4-Ig 二聚体 (其单体具有上述氨基酸序列之一) 相比较,此种四聚体分子可以对 T 细胞增殖具有至少 2 倍大的抑制。在另一个实施方案中,与野生型 CTLA4-Ig 分子相比较,此种四聚体分子可以对 T 细胞增殖具有至少 2 倍大的抑制。

[0056] T 细胞增殖可以使用本领域已知的标准测定进行测量。例如,评估 T 细胞增殖的最常见方法之一是经由抗原或针对 TCR 的激动性抗体刺激 T 细胞,并且测量例如在增殖 T 细胞中滴定的胸苷 (3H-TdR) 的掺入或由增殖 T 细胞释放到培养物中的细胞因子量。从而可以测量 CTLA4-Ig 分子对 T 细胞活化或增殖的抑制作用。

[0057] CTLA4-Ig 分子的亲和力是分子与单一配体包括 CD80、CD86 或 CD80Ig 或 CD86Ig 融合蛋白的结合强度。CTLA4-Ig 与配体的亲和力可以通过使用例如基于表面等离子共振技术的结合相互作用分析 (BIA) 进行测量。除测量结合强度外,它还允许实时测定结合动力学,例如结合和解离速率常数。表面基质与之共价附着的由用薄金属膜包被的载玻片组成的传感器芯片,用相互作用物之一即 CTLA4-Ig 或配体之一包被。允许包含另一种相互作用物的溶液流过其表面上。将连续光束导向表面的另一侧,并且测量它的反射角。在 CTLA4-Ig 与配体结合时,光束的共振角改变 (因为它依赖于接近于传感器反应侧的介质的折射率,而所述折射率又与介质中溶解材料的浓度直接相关)。它随后借助于计算机进行分析。

[0058] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 结合实验可以通过表面等离子共振 (SPR) 在 BIAcore 仪器 (BIAcore AG, Uppsala, 瑞典) 上执行。CTLA4-Ig 可以通过伯胺基团与 BIAcore 传感器芯片上的羧甲基化葡聚糖基质共价偶联,从而使 CTLA4-Ig 固定到传感器芯片。可替代地,抗恒定区抗体可以用于经由 Ig 片段使 CTLA4-Ig 间接固定到传感器表面。其后,将配体加入芯片以测量与配体结合的 CTLA4-Ig。亲和力测量可以例如如 van der Merwe, P. 等人, J. Exp. Med., 185 (3):393-404 (1997) 中所述执行。

[0059] 还可以测量 CTLA4-Ig 分子的抗体亲抗原性。抗体亲抗原性可以定义为 2 种分子

或细胞在多个位点上彼此结合的强度的总和。抗体亲抗原性不同于亲和力,所述亲和力是在分子上的一个位点与其配体的结合强度。不受理论束缚,CTLA4-Ig 分子更高的抗体亲抗原性可以导致通过 CTLA4-Ig 分子对 T 细胞增殖和活化的抑制效力增加。抗体亲抗原性可以例如通过 2 类固相测定进行测量:a) 竞争抑制测定,和 b) 洗脱测定。在两者中,使配体与固体支持体附着。在竞争抑制测定中,随后将 CTLA4-Ig 分子以固定浓度连同不同浓度的游离配体加入溶液中,并且测定使固相结合抑制 50% 的配体量。需要的配体越少,抗体亲抗原性越强。在洗脱测定中,将配体加入溶液中。在获得平衡状态后,将离液剂或变性剂(例如,异硫氰酸盐、尿素或二乙胺)以不同浓度加入,以破坏 CTLA4-Ig/配体相互作用。其后用 ELISA 测定抵抗洗脱的 CTLA4-Ig 量。抗体亲抗原性越高,需要越多的离液剂以洗脱特定量的 CTLA4-Ig。CTLA4-Ig 分子的异质混合物的相对抗体亲抗原性可以表示为抗体亲抗原性指数(AI),与洗脱 50% 结合的 CTLA4-Ig 分子所需要的洗脱剂浓度相等。通过测定在不同浓度的洗脱剂下洗脱的 CTLA4-Ig 百分比可以执行数据的精确分析。

[0060] 用于产生本发明的 CTLA4Ig 分子的方法

[0061] CTLA4Ig 分子的表达可以在原核细胞中。原核生物最通常由各种细菌菌株代表。细菌可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性的。一般地,革兰氏阴性细菌例如大肠杆菌(*E. coli*)是优选的。还可以使用其他微生物菌株。

[0062] 上文描述的编码 CTLA4Ig 分子的序列可以插入设计用于在原核细胞例如大肠杆菌中表达外来序列的载体内。这些载体可以包括常用的原核控制序列,其在本文中定义为包括用于转录起始的启动子,任选含操纵基因,连同核糖体结合位点序列,包括此种常用启动子如  $\beta$ -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖(lac)启动子系统(Chang 等人, *Nature*, 198:1056(1977))、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel 等人, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057(1980)) 和  $\lambda$  衍生的  $P_L$  启动子和 N-基因核糖体结合位点(Shimatake 等人, *Nature*, 292:128(1981))。

[0063] 此种表达载体还将包括复制起点和赋予对抗生素的抗性的选择标记,例如  $\beta$ -内酰胺酶或新霉素磷酸转移酶基因,从而使得载体可以在细菌中复制,并且当在抗生素例如青霉素或卡那霉素的存在下生长时可以选择携带质粒的细胞。

[0064] 表达质粒可以经由多种标准方法引入原核细胞内,包括但不限于  $\text{CaCl}_2$  冲击(Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110(1972), 和 Sambrook 等人, 编辑, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Press(1989)) 和电穿孔。

[0065] 依照本发明的实践,真核细胞也是合适的宿主细胞。真核细胞的例子包括无论是原代还是无限增殖化的任何动物细胞,酵母(例如,啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) 和巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)), 和植物细胞。骨髓瘤、COS 和 CHO 细胞是可以用作宿主的动物细胞的例子。具体的 CHO 细胞包括但不限于 DG44(Chasin 等人, *Som. Cell. Molec. Genet.*, 12:555-556(1986); Kolkekar, *Biochemistry*, 36:10901-10909(1997))、CHO-K1(ATCC<sup>®</sup> 编号 CCL-61), CHO-K1 Tet-On 细胞系(Clontech)、指定为 ECACC85050302 的 CHO(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)、CHO 克隆 13(GEIMG, Genova, IT)、CHO 克隆 B(GEIMG, Genova, IT)、指定为 ECACC 93061607 的 CHO-K1/SF(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)、和指定为 ECACC 92052129 的 RR-CHOK1(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)。举例说明性植物细胞包

括烟草（全植物、细胞培养或愈合组织）、玉米、大豆和稻细胞。玉米、大豆和稻种也是可接受的。

[0066] 上文描述的编码 CTLA4Ig 分子的核酸序列也可以插入设计用于在真核宿主中表达外来序列的载体内。载体的调节元件可以根据具体真核宿主而改变。

[0067] 用于在表达载体中使用的常用真核控制序列包括与哺乳动物细胞相容的启动子和控制序列，例如 CMV 启动子（CDM8 载体）和禽类肉瘤病毒（ASV）（ $\pi$ LN 载体）。其他常用启动子包括来自猿猴病毒 40（SV40）的早期和晚期启动子（Fiers 等人，Nature, 273 : 113 (1973)），或其他病毒启动子例如衍生自多瘤、腺病毒 2 和牛乳头瘤病毒的那些。还可以使用诱导型启动子例如 hMTII（Karin 等人，Nature, 299 : 797-802 (1982)）。

[0068] 用于在真核生物中表达 CTLA4Ig 分子的载体还可以携带称为增强子区的序列。这些在最佳化基因表达中是重要的，并且在启动子区上游或下游发现。

[0069] 用于真核宿主细胞的表达载体例子包括但不限于用于哺乳动物宿主细胞的载体（例如 BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2（Maniatis）；pIRES（Clontech）；pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1（Life Technologies）；pVPakc 载体、pCMV 载体、pSG5 载体（Stratagene））、逆转录病毒载体（例如 pFB 载体（Stratagene））、pCDNA-3（Invitrogen）或其修饰形式、腺病毒载体；腺伴随病毒载体、杆状病毒载体、酵母载体（例如 pESC 载体（Stratagene））。

[0070] 编码 CTLA4Ig 分子的核酸序列可以整合到真核宿主细胞的基因组内并且随着宿主基因组复制而复制。可替代地，携带 CTLA4Ig 分子的载体可以包含允许染色体外复制的复制起点。

[0071] 为了在啤酒糖酵母中表达核酸序列，可以使用来自内源酵母质粒 2  $\mu$  环的复制起点（Broach, Meth. Enzymol., 101 : 307 (1983)）。可替代地，可以使用能够促进自主复制的来自酵母基因组的序列（参见例如，Stinchcomb 等人，Nature, 282 : 39 (1979)）；Tschemper 等人，Gene, 10 : 157 (1980)；和 Clarke 等人，Meth. Enzymol., 101 : 300 (1983)）。

[0072] 用于酵母载体的转录控制序列包括用于合成糖酵解酶的启动子（Hess 等人，J. Adv. Enzyme Reg., 7 : 149 (1968) 和 Holland 等人，Biochemistry, 17 : 4900 (1978)）。本领域已知的另外启动子包括在 CDM8 载体中提供的 CMV 启动子（Toyama 等人，FEBS, 268 : 217-221 (1990)）；关于 3-磷酸甘油酸激酶的启动子（Hitzeman 等人，J. Biol. Chem., 255 : 2073 (1980)），和用于其他糖酵解酶的那些。

[0073] 其他启动子是诱导型的，因为它们可以通过环境刺激或细胞的生长培养基进行调节。这些诱导型启动子包括来自关于热休克蛋白、醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮分解代谢相关的酶、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的基因的那些。

[0074] 调节序列也可以置于编码序列的 3' 末端上。这些序列可以作用于稳定信使 RNA。此种终止子在几种酵母衍生的和哺乳动物基因中在编码序列后的 3' 非翻译区中发现。

[0075] 关于植物和植物细胞的举例说明性载体包括但不限于土壤杆菌属（*Agrobacterium*） $T_i$  质粒、花椰菜花叶病毒（CaMV）、和番茄金黄花叶病毒（TGMV）。

[0076] 哺乳动物细胞可以通过这样的方法进行转化，所述方法包括但不限于，在磷酸钙的存在下转染、显微注射、电穿孔或经由用病毒载体转导。

[0077] 用于将外来 DNA 序列引入植物和酵母基因组内的方法包括（1）机械法，例如 DNA 显微注射到单细胞或原生质体内，在 DNA 的存在下使细胞与玻璃珠一起涡旋，或将 DNA 包被

的钨或金球射击到细胞或原生质体内；(2) 通过经由聚乙二醇处理或实施高压电脉冲（电穿孔）使细胞膜对大分子可渗透而引入 DNA；或 (3) 与细胞膜融合的脂质体（包含 cDNA）的使用。

[0078] 美国专利申请公开号 2005/0019859 和美国专利号 7,332,303 教导通过动物或哺乳动物细胞培养用于产生本发明蛋白质特别是重组糖蛋白产物的方法，并且引入本文作为参考。

[0079] 在细胞培养方法的蛋白质生产期后，使用本领域技术人员了解的技术从细胞培养基中回收 CTLA4Ig 分子。具体地，CTLA4Ig 分子作为分泌的多肽从培养基中回收。

[0080] 最初使培养基离心以去除细胞碎片和颗粒。随后利用下述本领域公认的非限制性纯化程序从污染 DNA、可溶蛋白质和多肽中纯化所需蛋白质：SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；乙醇沉淀；在免疫亲和或离子交换柱上分级分离；反相 HPLC；在二氧化硅上或在阴离子交换树脂例如 QAE 或 DEAE 上的层析；层析聚焦；使用例如 SEPHADEX® G-75 柱的凝胶过滤；和 A 蛋白 SEPHAROSE® 柱以去除污染物例如 IgG。蛋白酶抑制剂例如苯甲基磺酰氟 (PMSF) 或蛋白酶抑制剂混合物 (cocktail) 的添加也可以用于抑制纯化过程中的蛋白水解降解。本领域技术人员将认识到适合于目的蛋白质例如糖蛋白的纯化方法可能需要改变，以引起在重组细胞培养物中表达后蛋白质特征中的变化。

[0081] 选择糖蛋白的碳水化合物基团的纯化技术和方法也在本发明的背景中有用。例如，此种技术包括 HPLC 或使用阳离子或阴离子交换树脂的离子交换层析，其中依赖于待选择的碳水化合物，收集更碱性或更酸性的级分。此种技术的使用也可以导致污染物的伴随去除。

[0082] 纯化法可以进一步包括灭活和 / 或去除病毒和 / 或逆转录病毒的另外步骤，所述病毒和 / 或逆转录病毒可能潜在地存在于哺乳动物细胞系的细胞培养基中。大量病毒清除步骤是可获得的，包括但不限于，用离液剂例如尿素或胍处理、去污剂、另外的超滤 / 渗滤步骤、常规分离例如离子交换或尺寸排阻层析、pH 极值、热、蛋白酶、有机溶剂或其任何组合。

[0083] 在贮存或进一步加工前，纯化的 CTLA4Ig 分子需要浓缩和缓冲液更换。Pa11 Filtron TFF 系统可以用于由原料药所需的最终缓冲液浓缩且交换来自先前纯化柱的洗脱缓冲液。

[0084] 在一个方面，已浓缩且实施渗滤步骤的纯化的 CTLA4Ig 分子可以填充到 2-L BIOTAINER® 瓶、50-L 生物加工袋或任何其他合适容器中。此种容器中的 CTLA4Ig 分子在冷冻前可以在 2°C -8°C 贮存约 60 天。纯化的 CTLA4Ig 分子在 2°C -8°C 的延长贮存可能导致 HMW 种类比例中的增加。因此，对于长期贮存，CTLA4Ig 分子在贮存前可以在约 -70°C 冷冻且贮存于约 -40°C 的温度。冷冻温度可以从约 -50°C 到约 -90°C 不等。冷冻时间可以改变，并且在很大程度上依赖于包含 CTLA4Ig 分子的容器容积和在冷冻机中装载的容器数目。例如，在一个实施方案中，CTLA4Ig 分子在 2-L BIOTAINER® 瓶中。在冷冻机中装载小于 4 个 2-LBIOTAINER® 瓶可能需要约 14- 至少 18 小时冷冻时间。至少 4 瓶的装载可能需要约 18- 至少 24 小时冷冻时间。具有冷冻的 CTLA4Ig 分子的容器贮存于约 -35°C 到约 -55°C 的温度。在约 -35°C 到约 -55°C 的温度的贮存时间可以改变，并且可以短至 18 小时。冷冻的原料药可以以控制方式解冻用于配制药产品。

[0085] 于 2005 年 12 月 20 日提交的共同未决的美国专利申请系列号 60/752, 267 和于 2006 年 12 月 19 日提交的 PCT/US2006/049074 教导通过动物或哺乳动物细胞培养用于产生本发明蛋白质特别是重组糖蛋白产物的方法, 并且引入本文作为参考。

#### [0086] 药物组合物

[0087] 本发明的方法利用药物组合物, 其包括与本领域技术人员已知的可接受载体或佐剂混合的 CTLA4Ig 分子。药物组合物优选包括合适载体和佐剂, 其包括当与 CTLA4Ig 分子结合时保留分子活性且与受试者的免疫系统不反应的任何材料。这些载体和佐剂包括但不限于, 离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质例如人血清清蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、磷酸缓冲盐水溶液、水、乳剂 (例如油 / 水乳剂)、盐或电解质例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质和聚乙二醇。其他载体也可以包括无菌溶液; 片剂, 包括包衣的片剂和胶囊。一般地此种载体包含赋形剂例如淀粉、乳、糖 (例如, 蔗糖、葡萄糖、麦芽糖)、特定类型的粘土、明胶、硬脂酸或其盐、硬脂酸镁或钙、滑石、植物脂肪或油、树胶、二元醇或其他已知赋形剂。此种载体还可以包括风味和颜色添加剂或其他成分。包括此种载体的组合物通过众所周知的常规方法进行配制。此种组合物还可以在各种液体组合物例如脂质体内以及在各种聚合组合物中例如聚合小球体内进行配制。

[0088] 包括可溶性 CTLA4 分子的制剂在于 2005 年 12 月 20 日提交的共同未决的美国临时专利申请系列号 60/752, 150 和于 2006 年 12 月 19 日提交的 PCT/US2006/062297 中描述, 并且引入本申请作为参考。如共同未决的美国临时专利申请系列号 60/752, 150 中所述, 可溶性 CTLA4 分子可以配制用于 IV 和皮下应用。简言之, 合适的皮下 (SC) 制剂包括在水性载体中与稳定水平的糖组合的至少 100mg/ml 蛋白质浓度的 CTLA4Ig 分子。

[0089] 经由预填充 (pre-filled) 注射器递送的 CTLA4Ig SC 药物产品的例子在下表 3 中提供。

#### [0090] 表 3

[0091] CTLA4Ig SC 药物产品的组成, 125mg/ml (125mg/ 注射器)

[0092]

| 组分                       | 量 (mg/ 注射器) |
|--------------------------|-------------|
| CTLA4Ig                  | 125         |
| 蔗糖                       | 170         |
| 泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188) | 8.0         |
| 一碱价磷酸钠, 一水合物             | 0.143       |
| 磷酸氢二钠, 无水                | 0.971       |
| 注射用水                     | 足量至 1. ml   |



[0093] 本说明书的实施例 I 和 II 描述在本发明的方法中有用的 CTLA4Ig 静脉内 (IV) 和皮下制剂的制备。在实施例 III 中描述的在本发明的方法中利用的 CTLA4Ig 冻干制剂的例子在下文列出。

[0094] 表 4

[0095] 冻干的 CTLA4Ig (250mg/ 小瓶) 药物产品的组成

[0096]

| 组分                        | 量 (mg/ 小瓶) <sup>a</sup> |
|---------------------------|-------------------------|
| CTLA4Ig                   | 262.5                   |
| 麦芽糖一水合物                   | 525                     |
| 一碱价磷酸钠, 一水合物 <sup>b</sup> | 18.1                    |
| 氯化钠 <sup>b</sup>          | 15.3                    |
| 盐酸                        | 调整至 7.5                 |
| 氢氧化钠                      | 调整至 7.5                 |

[0097] <sup>a</sup> 包括 5% 过量填充 (overfill) 用于小瓶、针、注射器损失。

[0098] <sup>b</sup> 这些组分存在于 CTLA4Ig 原料药溶液中。

[0099] 冻干的药物产品可以用水性载体构建。本文感兴趣的水性载体是药学上可接受的 (对于给人施用安全且无毒的) 且对于在冻干后制备液体制剂有用的水载体。一般地, 冻干的药物产品用 10ml 无菌注射用水 USP (SWFI) 或 0.9% 氯化钠注射液 USP 构建至约 25mg/ml。构建的溶液用 0.9% 氯化钠注射液 USP 进一步稀释至 1-10mg/ml 药物产品浓度。用于注射的稀释的药物产品是等渗的且适合于通过静脉内输注施用。

[0100] 制造物品

[0101] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了包含药物产品且优选提供其使用说明书的制造物品。制造物品包括容器。合适容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可以由多种材料例如玻璃、塑料或金属形成。

[0102] 容器容纳冻干的或液体制剂。在容器上或与之结合的标签可以指出关于重构和 / 或使用的指导。例如, 标签可以指出 250mg/ 小瓶药物产品待重构至如上所述的蛋白质浓度。标签可以进一步指出 SC 制剂用于或预期用于皮下施用。容纳制剂的容器可以是多用途 (multi-use) 小瓶, 其允许例如皮下制剂的反复施用 (例如, 2-6 次施用)。可替代地, 容器可以是包含例如皮下制剂的预填充注射器。

[0103] 制造物品可以进一步包括第二个容器, 其包括例如用于冻干的制剂的合适载体。

[0104] 制造物品可以进一步包括从商业和用户立场看来需要的其他材料, 包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有使用说明书的包装插页。

[0105] 例如在冻干的药物产品重构和 / 或溶液从小瓶转移到静脉内袋后, 不含聚硅氧烷的注射器优选用于不含表面活性剂的药物产品, 并且可以与药物产品小瓶一起共包装。

[0106] 使用方法

[0107] 本发明提供了预防或抑制具有 UA 的受试者中 RA 发展的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0108] 本发明进一步提供了减缓或延缓具有 UA 的受试者中 RA 发展的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0109] 本发明还提供了治疗具有 UA 的受试者的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物。

[0110] 施用有效量的 CTLA4Ig 分子或其药物组合物,从而减轻受试者中与疾病相关的至少一种症状,包括减少:关节肿胀、关节压痛、炎症、晨僵和疼痛、以及结构性伤害,随后减少躯体能力丧失。

[0111] 本发明的方法还可以用于改善具有 UA 的受试者的躯体功能,如通过健康评定问卷 (HAQ) 和 / 或健康相关的生活质量 (SF-36) 工具评估的。

[0112] 本发明的方法还可以用于抑制具有 UA 的受试者中的关节结构性伤害,如通过腕和手的侵蚀和骨髓水肿评分和 / 或滑膜炎评分评估的。

[0113] 由本发明提供的症状减轻量可以使用为测量且证明临床情况中的症状减轻而确立的公认标准中的任何一种进行测量。用于测量症状减轻的可接受标准可以包括基于由美国风湿病学学会确立的标准 (例如, ACR20) 的得分、症状减轻的 4 种量度 (在“CDER Guideline for the Clinical Evaluation of Anti-Inflammatory and Antirheumatic Drugs-FDA 1988”中)、和健康评定问卷 (HAQ) (Fries, J.F. 等人, J. Rheumatology, 9: 789-793(1982)))。关于这些标准的一般描述,参见 Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis(RA) (1999 年 2 月)。

[0114] 本发明提供了用于施用单独或与其他治疗药物结合的 CTLA4Ig 分子的各种局部或全身方法。该方法包括静脉内、肌内、腹膜内、经口、吸入和皮下方法,以及可植入泵、连续输注、基因疗法、脂质体、栓剂、局部接触、小泡、胶囊和注射方法。与载体配合的 CTLA4Ig 通常冻干用于贮存,并且在施用前用水或缓冲溶液重构。作为本领域中的标准实践,本发明的组合物可以以任何药学上可接受的形式施用于受试者。

[0115] 用于本发明制剂的最有效施用模式和剂量方案依赖于患者的健康和对治疗的应答以及治疗医生的判断。依照本发明的实践,用于治疗受试者的有效量是约 0.1-100mg/kg 受试者重量的量。在另一个实施方案中,有效量是约 0.1-20mg/kg 受试者重量,优选 1-10mg/kg 受试者重量的量。在具体实施方案中,CTLA4Ig 的有效量是约 2mg/kg 受试者重量。在另一个具体实施方案中,CTLA4Ig 的有效量是约 10mg/kg 受试者重量。在另一个具体实施方案中,CTLA4Ig 的有效量是对于称重小于 60kg 的受试者 500mg,对于称重在 60-100kg 之间的受试者 750mg,和对于称重超过 100kg 的受试者 1000mg。

[0116] 本发明的 CTLA4Ig 分子制剂可以以足以阻断受试者中的内源 B7 (例如, CD80 和 / 或 CD86) 分子与其各自配体结合的量施用于受试者且持续足以阻断受试者中的内源 B7 (例如, CD80 和 / 或 CD86) 分子与其各自配体结合的时间 (例如, 时间长度和 / 或多次)。内源 B7/ 配体结合的阻断从而抑制 B7 阳性细胞 (例如, CD80 和 / 或 CD86 阳性细胞) 与 CD28 和 / 或 CTLA4 阳性细胞之间的相互作用。因此,试剂的剂量可以依赖于受试者和施用模式

而改变,美国专利申请公开号 2003/0083246 和 2004/0022787 教导了关于具有 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列的 CTLA4Ig 用于治疗风湿性疾病例如类风湿性关节炎的剂量和施用时间表。全部引入本文作为参考。

[0117] 依赖于需要,可以以单次或多次/小时/天/周/月/年,将有效量的 CTLA4Ig 分子每天、每周、每月和/或每年施用于受试者。例如,在一个实施方案中,有效量的 CTLA4Ig 分子可以最初每 2 周施用一次进行一个月,并且随后接着每个月施用一次或第 1、15、29 天和其后每月施用一次。对于较早给药(即第 15 和 29 天)允许  $\pm 3$  日窗口。对于其后每月一次给药允许  $\pm 7$  日窗口。

[0118] 可替代地,本领域技术人员将能够响应患者危险状态和/或对治疗的反应而修改施用方案。例如,上述方案可以通过将第 5 天施用加入方案中进行修改。

[0119] 如本文使用的,“4 周”、“月”或“每月”指  $28 \pm 7$  天的时间段。

[0120] 一般地,本发明的 CTLA4Ig 分子制剂的剂量基于体重,并且施用方案可以由靶血清谷概况指示。一般地,在约  $3 \mu\text{g/mL}$ –约  $35 \mu\text{g/mL}$  之间的本发明 CTLA4Ig 分子的靶谷血清浓度将足以治疗具有 UA 的受试者中的 UA 或预防 RA 发展,优选约  $5 \mu\text{g/mL}$ –约  $30 \mu\text{g/mL}$ ,更优选约  $10 \mu\text{g/mL}$ –约  $30 \mu\text{g/mL}$ 。本领域技术人员将能够调整 CTLA4Ig 的用量和/或施用时间表,以达到所需血清谷浓度。

[0121] 本发明的分子或药物组合物的施用可以经由 30 分钟至一个或多个小时静脉内输注。可替代地,单次至多次皮下注射可以递送所需用量。

[0122] 本发明的 CTLA4Ig 分子可以与其他免疫抑制/免疫调谐疗法结合伴随或顺次施用,例如如本文指定的,共施用的免疫抑制剂或免疫调谐化合物的剂量当然将依赖于采用的共药物(co-drug)类型而改变。

[0123] 非类固醇抗炎药(NSAIDs)可以与本发明的 CTLA4Ig 分子结合伴随或顺次施用。NSAIDs 减少受试者中的炎症反应。NSAIDs 包括但不限于乙酰水杨酸、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳、水杨酸镁、双水杨酯、水杨酸钠、双氯芬酸钠、依托度酸、非诺洛芬钙、氟比洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯灭酸盐(meclofenamate)、萘普生、萘丁美酮、苯基丁氮酮(phenylbutazone)、吡罗昔康、舒林酸、托美汀、对乙酰氨基酚、布洛芬、Cox-2 抑制剂、美洛昔康和曲马多。

[0124] 皮质类固醇可以与本发明的 CTLA4Ig 分子结合伴随或顺次施用。例如,施用稳定低剂量的经口皮质类固醇(等价于每天  $\leq 10\text{mg}$  泼尼松),或每 6 个月作为经口过程(等价于  $20\text{mg/天}$  泼尼松,进行最多 2 周),或单次 IM(肌肉)给药或单次 IA(关节内)给药施用高剂量皮质类固醇。

[0125] 皮质类固醇的例子包括但不限于,倍他米松、布地奈德、皮质醇、可的松、地塞米松、氢化可的松(hydrocortisone)、甲基强的松龙、强的松龙、泼尼松和去炎松。

[0126] 一般地,上述共施用的药物的标准剂量和施用方案不受本发明 CTLA4Ig 分子加入治疗方案的影响。然而,由于毒性较少的本发明 CTLA4Ig 分子掺入治疗方案内,本领域技术人员可以开处更低剂量的共施用的药物。开处方信息可以基于关于每种共施用的药物的包装插页。

[0127] 如先前讨论的,关节破坏在 RA 早期发生。这个理解已强调可以从根本上改变而不是仅仅抑制炎症过程的疗法的需要,所述炎症过程引起在 RA 过程早期的致使虚弱的症状

和结构性伤害。因此,这越来越注重 RA 的早期诊断和治疗。然而,当应用于具有早期炎性关节炎的受试者时,1987 ARA 的 RA 标准更不灵敏和特异,并且这些受试者随后诊断有未分化关节炎,常见的临床问题。

[0128] 近期已证实在观察后一年,对于针对环状瓜氨酸肽的抗体也阳性(抗 CCP2 阳性)的具有的 UA 受试者就处于 RA 发展的高度危险中 (Van Gaalen, F. A. 等人,“Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis”, *Arthritis Rheum.*, 50(3) : 709-715 (2004))。关于针对环状瓜氨酸肽的血清抗体的存在的阳性测试比更传统的标准对于 RA 发展具有更高的预测价值,所述更传统的标准例如类风湿因子的存在或不存在。与 18% 的抗 CCP 阴性对照相比较,对于抗 CCP 抗体阳性的 UA 患者的 83% 在一年时发展 RA。这个发现暗示可以容易地鉴定具有 UA 的患者亚群,其将处于 RA 发展的高度危险中,并且因此将是关于针对驱动 RA 中炎症和关节破坏的根本机制的靶向治疗的理想候选者。此种方法可以预防不幸地表征 RA 的自然史的关节伤害、功能残疾和后续受损的生活质量的发展。

[0129] 实施例 III 和 IV 描述了设计用于比较 CTLA4Ig 与安慰剂在预防受试者中的 RA 发展中的功效的临床研究,所述受试者具有近期发作的未分化关节炎,处于 RA 发展的高度危险中。

[0130] 该临床研究是对于初级终点 12 个月持续时间和对于次级终点 24 个月的随机化、双盲、安慰剂对照、双臂平行设计研究。对于研究的前 6 个月,使受试者 1 : 1 随机化以接受 CTLA4Ig 或安慰剂。随机化基于侵蚀的存在或不存在分为 2 个组。

[0131] 仔细地筛选这个研究中的受试者,以确保他们具有近期发作的 UA (即关节炎症状存在 < 18 个月),对于抗 CCP2 抗体阳性,未满足关于任何其他风湿性疾病的诊断标准,并且未接受超过 2 周的 DMARDs 或指示用于 RA 的任何生物学药物的更多治疗。该研究设计用于研究用 CTLA4Ig 单一疗法的相对短的 6 个月治疗时间段是否预防在治疗开始后 1 年或 2 年内至 RA 的进展。此外,探究 CTLA4Ig 对具有 UA 的受试者中的疾病活动性、躯体功能、健康相关的生活质量和 PD 生物标记活性的作用,并且在 6 个月治疗时间段过程中以及在研究药疗法的最后一次给药后最高达 18 个月将其与安慰剂比较。在研究药疗法的最后一次给药后的 18 个月未治疗观察时间段的包括允许评估 CTLA4Ig 治疗的任何观察的作用的持续性。在治疗和观察时间段过程中允许 NSAIDs 和稳定低剂量经口皮质类固醇 ( $< 10\text{mg/天}$  泼尼松或等价物) 的使用,以及高剂量皮质类固醇疗法的有限使用。在任何时候发展 RA 的受试者中断研究且可以接受标准护理。

[0132] 因为使随机化限制至 57 个受试者 (其中 56 个进行治疗) 的严格入组 (enrollment) 标准,所以未进行正式统计学假设测试。然而,这个研究的结果在功效的多重结果测量 (临床、放射学、MRI 和生物标记活性) 中一般一致地支持 CTLA4Ig 超过安慰剂,并且提供基于体重以  $10\text{mg/kg}$  的剂量每月 IV 给予一次进行 6 个月的 CTLA4Ig 减缓从 UA 进展到 RA 的证据。CTLA4Ig 的治疗利益看起来持续至药物中断后最高达 18 个月。

[0133] 到第 12 个月时发展 RA 的受试者比例对于接受 CTLA4Ig 的组 (12/27, 46.2%) 比安慰剂组 (t6/24, 66.7%) 更低 (20.5% 治疗差异; 95% CI :  $\sim 47.4\%$ , +7.8%)。到第 24 个月时,与 73.9% (17/23) 的已接受 6 个月的 CTLA4Ig 治疗过程的受试者相比较,87.5% (12/24) 的具有 UA 的受试者在安慰剂组中已发展 RA (13.6% 治疗差异; 95% CI :  $-37.6\%$ ,

+10.8%)。在具有 UA 的受试者的这个研究中使用的重量分级的 10mg/kg CTLA4Ig 剂量类似于批准用于成年人中的 RA 治疗的 10mg/kg 剂量。

[0134] 在具有 UA 的这个受试者群体中,用 CTLA4Ig 的治疗改善躯体功能和医生报告的疾病活动性。在第 6 个月时,与安慰剂相比较超过 2 倍的用 CTLA4Ig 治疗的受试者已达到躯体功能 (HAQ-DI) 中临床上有意义的改善 (62%与 24%比较),或具有如由 < 2.6 的 DAS-28(CRP) 得分指示的疾病减轻 (71%与 35%比较)。在用 CTLA4Ig 的研究治疗时间段结束时可见的 ILAQ-DI 和 DAS 28(CRP) 中数字上更大的改善在未治疗随访的 6 和 18 个月後仍是明显的,尽管与安慰剂的治疗组差异在第 12 和 24 个月时更小。使用钆 (gandolinium) 增强的手和腕 MR 图像以及手和足的常规射线照片的射线照相术评估,指出在研究药物治疗时间段过程中在接受 CTLA4Ig 的受试者中最低限度的疾病进展。

[0135] 值得注意的是,在用 CTLA4Ig 治疗 6 个月後,抗 CCP2 抗体的血清水平减少,并且这种减少在无研究药物治疗 6 个月後仍是明显的。比较而言,抗 CCP2 抗体水平在安慰剂组中增加。抗 CCP2 抗体高度预示健康受试者和具有未分化关节炎的患者中的将来 RA 发展。

[0136] 治疗早期 UA 的保守方法已得到提倡,其将 DMARDs 以及随后的生物制品的使用仅限于关节炎症状和病征难以由 NSAIDs 和低剂量皮质类固醇治愈的那些患者。在具有 UA 的 56 个受试者的这个研究中,CTLA4Ig 由具有极早阶段疾病的个体良好耐受。在 6 个月的研究治疗时间段过程中,AEs 对于 CTLA4Ig 和安慰剂组以相似比率报告,没有 AE 导致死亡,并且同样地,2 个治疗组中低数目的受试者具有 SAE (每个治疗组中 1 个),或由于 AE 而中断 (每个治疗组中 1 个)。此外,不存在用 CTLA4Ig 的更大感染危险的证据,并且仅 1 个受试者报告了在 CTLA4Ig 输注开始 1 小时内发生的输注 AEs。关于血液学和血液化学的临床实验室数据一般是不显著的,并且未鉴定出安全问题。四 (4) 个受试者在第 12 个月时变得对于抗 CTLA4-T 抗体血清反应阳性,其中 2 个对于中和抗体测试阳性。抗体的开发看起来与临床安全发现无关。

[0137] 本发明人发现 CTLA4Ig 的施用延缓具有 UA 的患者中至确定性 RA 的进展。另外,CTLA4Ig 治疗的疾病减轻作用在治疗停止後维持 6 个月。

[0138] 通过参考下述实施例,本发明将得到更全面地理解。然而,它们不应解释为限制本发明的范围。公开内容自始至终的所有引用在此特别引入作为参考。

[0139] 实施例 I

[0140] CTLA4Ig 冻干的 (250mg/ 小瓶) 药物产品是适合于静脉内 (IV) 施用的无菌、无致热原亲液物。每个一次使用 (single-use) 小瓶包含 250mg CTLA4Ig,其用无菌注射用水 USP 构建,并且在使用时用 0.9%氯化钠注射液 USP 进一步稀释。

[0141] 关于 115 升批量大小的批料配方在下表 5 中描述。

[0142] 表 5

[0143] 批料配方

[0144]

| 组分                       | 量 (kg) |
|--------------------------|--------|
| CTLA4Ig 原料药 <sup>a</sup> | 4.6    |

|         |                        |
|---------|------------------------|
| 麦芽糖一水合物 | 9.2                    |
| 盐酸      | 调整至 pH 7.5             |
| 氢氧化钠    | 调整至 pH 7.5             |
| 注射用水    | 足量至 119.6 <sup>b</sup> |

[0145] <sup>a</sup> CTLA4Ig 原料药:蛋白质浓度 50mg/ml, 25mM 磷酸钠, 50mM 氯化钠, pH 7.5, < 5% HMW 种类。

[0146] <sup>b</sup> 配制的本体溶液密度=约 1.04g/ml。

[0147] 将所需量的 CTLA4Ig 原料药加入配备混合器的清洁且灭菌的不锈钢配药容器中。使原料药溶液在 250±50rpm 下混合,同时使溶液温度维持在 5℃ -25℃之间。

[0148] 将所需量的麦芽糖一水合物粉末加入配药容器中。使溶液在 15℃ -25℃混合最低限度 10 分钟。

[0149] 若需要,则使用先前制备的 1N 氢氧化钠溶液或 1N 盐酸溶液将溶液 pH 调整至 7.3-7.7。使用注射用水 USP 使批料达到最终批料重量(最终足量),并且最低限度混合 8 分钟。配制的本体溶液取样用于 pH 测定。

[0150] 配制的本体溶液用 1 个 0.45-μm 过滤器进行预过滤。在 0.45-μm 过滤器过滤后的配制的本体溶液取样用于生物负荷和细菌内毒素(BET)测定。

[0151] 在填充前,预过滤的配制的本体溶液用串联的 2 个 0.22-μm 过滤器进行无菌过滤。

[0152] 通过完全自动的填充/加塞机,使无菌过滤的配制的本体溶液填充且用 20nm-Daikyo 灰色丁基塞子部分加塞。使 15-cc I 型火石管玻璃小瓶洗涤且灭菌/去致热原。

[0153] 使填充且部分加塞的药物产品小瓶冻干。在 CTLA4Ig 药物产品冻干过程中使用的冷冻干燥循环概括在下表 6 中提供。

[0154] 表 6

[0155] 用于 CTLA4Ig 冻干的药物产品的冷冻干燥循环

[0156]

| 过程参数                     | 过程中控制                                                  |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|
| 装载温度                     | $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$                              |
| 冷冻 (搁架温度斜升 (Shelf Ramp)) | 在 2.5 小时内从 $5^{\circ}\text{C}$ 到 $-45^{\circ}\text{C}$ |
| 冷冻                       | 在 $-45 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 保持 4 小时                  |
| 初次干燥 (搁架温度斜升)            | 在 2 小时内从 $-45^{\circ}\text{C}$ 到 $-19^{\circ}\text{C}$ |
| 初次干燥 (真空)                | $100 \pm 20$ 微米                                        |
| 初次干燥                     | 在 $-19 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 保持 84 小时                 |
| 中间干燥 (搁架温度斜升)            | 在 2 小时内从 $-19^{\circ}\text{C}$ 到 $0^{\circ}\text{C}$   |
| 中间干燥                     | 在 $0 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 保持 8 小时                    |
| 第二次干燥 (搁架温度斜升)           | 在 2.5 小时内从 $0^{\circ}\text{C}$ 到 $30^{\circ}\text{C}$  |
| 第二次干燥 (真空)               | $100 \pm 20$ 微米                                        |
| 第二次干燥                    | 在 $30^{\circ}\text{C}$ 保持 12 小时                        |
| 加塞                       | $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$                             |
| 加塞 (真空)                  | $500 \pm 100$ 微米                                       |
| 在卸载前贮存                   | 在 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 保持至少 4 小时                 |

[0157] 在冻干循环结束时,使用无菌过滤的氮使室压升高至 500 微米,并且在真空下执行小瓶加塞。加塞的小瓶在冻干器内保持至少 4 小时。冻干且加塞的小瓶通过压盖机在 HEPA 过滤的空气下用 20-mm 铝、白色易拉型 (flip-off) 密封条进行密封。通过外部小瓶洗涤剂用去离子水漂洗密封的小瓶。洗过的药物产品小瓶贮存于  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0158] 冻干的 CTLA4Ig (250mg/ 小瓶) 药物产品的组成在下表 7 中列出。

[0159] 表 7

[0160] 冻干的 CTLA4Ig (250mg/ 小瓶) 药物产品的组成

[0161]

| 组分                        | 量 (mg/ 小瓶) <sup>b</sup> |
|---------------------------|-------------------------|
| CTLA4Ig                   | 262.5                   |
| 麦芽糖一水合物                   | 525                     |
| 一碱价磷酸钠, 一水合物 <sup>b</sup> | 18.1                    |
| 氯化钠 <sup>b</sup>          | 15.3                    |
| 盐酸                        | 调整至 7.5                 |

|      |         |
|------|---------|
| 氢氧化钠 | 调整至 7.5 |
|------|---------|

[0162] <sup>a</sup> 包括 5% 过量填充用于小瓶、针、注射器损失。

[0163] <sup>b</sup> 这些组分存在于 CTLA4Ig 原料药溶液中。

[0164] 实施例 II

[0165] CTLA4Ig SC, 125mg/ml (125mg/ 小瓶) 药物产品配制为适合于皮下施用的无菌、无致热原即用型溶液。在 5-L 规模 (3, 500 个小瓶) 下制造一批 CTLA4Ig SC, 125mg/ml (125mg/ 小瓶) 药物产品。批料配方在下表 8 中描述。

[0166] 表 8

[0167] 批料配方

[0168]

| 组分                       | 量 (gm)   |
|--------------------------|----------|
| CTLA4Ig 原料药 <sup>a</sup> | 625      |
| 蔗糖                       | 850      |
| 泊洛沙姆 188                 | 40       |
| 一碱价磷酸钠, 一水合物             | 0.715    |
| 磷酸氢二钠, 无水                | 4.86     |
| 注射用水                     | 足量至 5.0L |
| 总批量大小 (L)                | 5.0      |

[0169] <sup>a</sup> CTLA4Ig 原料药: 蛋白质浓度 50mg/ml, 25mM 磷酸钠, 50mM 氯化钠, pH 7.5, < 5% HMW 种类。

[0170] 如上文实施例 I 中所述, 用于 CTLA4Ig SC, 125mg/ml (125mg/ 小瓶) 药物产品的制造方法涉及大批原料药从在 pH 7.5 下的 25mM 磷酸钠、50mM 氯化钠到 10mM 磷酸钠 pH 7.8 的缓冲液更换, 随后为通过缓冲液去除从 ~ 50mg/ml 到 ~ 150mg/ml 的蛋白质浓缩。随后使蔗糖和泊洛沙姆 188 溶解于浓缩的蛋白质溶液中, 并且用 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.8 调整最终批料重量。本体溶液通过 0.22 微米灭菌过滤器进行过滤, 并且填充到灭菌且去致热原的 5-cc I 型火石玻璃小瓶内, 用 20mm 橡胶塞子加塞, 并且用 20mm 铝易拉型密封条密封。

[0171] CTLA4Ig SC 药物产品, 125mg/ml (125mg/ 小瓶) 的组成在下表 9 中提供。

[0172] 表 9

[0173] CTLA4Ig SC, 125mg/ml (125mg/ 小瓶) 药物产品的组成

[0174]

| 组分 | 量 (mg/ 小瓶) <sup>c</sup> |
|----|-------------------------|
|----|-------------------------|



|              |           |
|--------------|-----------|
| CTLA4Ig      | 175       |
| 蔗糖           | 238       |
| 泊洛沙姆 188     | 11.2      |
| 一碱价磷酸钠, 一水合物 | 0.20      |
| 磷酸氢二钠, 无水    | 1.36      |
| 注射用水         | 足量至 1.4ml |

[0175] ° 包括 40% 过量填充用于小瓶、针、注射器损失。

[0176] 实施例 III

[0177] 类风湿性关节炎 (RA) 是可以导致进行性关节破坏、畸形、显著躯体能力丧失和不良生活质量的自身免疫病症。没有治疗被证实预防 RA 发展。这个研究将比较 CTLA4Ig 与安慰剂在预防受试者中的 RA 发展中的功效, 所述受试者具有近期发作的未分化关节炎 (UA), 在研究时间段过程中处于 RA 发展的高度危险中。

[0178] 初级目的

[0179] 评估在不知情研究药疗法开始后 1 年发展如通过 1987 ARA 标准定义的 RA 的具有 UA 的受试者比例。

[0180] 次级目的

[0181] 1) 评估在不知情研究药疗法开始后 2 年发展如通过 1987 ARA 标准定义的 RA 的具有 UA 的受试者比例。

[0182] 2) 使用 MRI 成像评估在 2 个治疗组之间在研究疗法开始后 6、12 和 24 个月时手 (腕、MCP 和 PIP 关节) 的滑膜炎和结构性关节伤害程度。

[0183] 3) 评估在 2 个治疗组之间在药疗法开始后 6、12 和 24 个月时具有持续有症状临床滑膜炎的受试者比例。

[0184] 4) 评估 CTLA4Ig 对自身抗体 [IgM 类风湿因子和抗环状瓜氨酸肽 (抗 CCP2)] 的血清水平的药物动力学作用。

[0185] 5) 使用全 DAS (CRP) 得分的平均值评估在治疗组之间随着时间过去的疾病活动性。

[0186] 6) 评估在 6、12 和 24 个月时具有 < 1.6 的全 DAS 得分的受试者比例。

[0187] 7) 使用 HAQ 的能力丧失指数 (HAQ) 和 SF-36 工具分别评估躯体功能和健康相关的生活质量。

[0188] 8) 评估 CTLA4Ig 在这个研究群体中的安全, 包括在 6 个月治疗过程完成后 CTLA4Ig 的免疫原性评估。

[0189] 三级目的

[0190] 1) 评估在 2 个治疗组之间随着时间过去在 ACR RA (美国风湿病学学会类风湿性关节炎) 复合变量的核心组分中的改变。

[0191] 研究设计

[0192] 这是对于初级终点 12 个月持续时间和对于次级终点 24 个月的随机化、双盲、安慰剂对照、双臂平行设计研究。对于研究的前 6 个月,受试者将 1 : 1 随机化以接受 CTLA4Ig 或安慰剂。随机化将基于侵蚀(集中读数)的存在或不存在分级为 2 个组。研究自始至终将允许受试者服用非类固醇抗炎药(NSAIDs)。研究自始至终将允许受试者服用稳定低剂量的经口皮质类固醇(等价于每天 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松)。随研究人员的意思,试验每 6 个月可以利用最高达 2 种下述高剂量的皮质类固醇伴随药疗法:经口过程(等价于  $20\text{mg}/\text{天}$ 泼尼松,进行最多 2 周),或单次 IM 给药或单次 IA 给药。在 6 个月研究药疗法后具有持续关节炎但未满足 RA 标准的受试者将脱离研究药疗法进行观察,并且随研究人员的意思,将被允许采用上述伴随药疗法。将不允许用研究药疗法的后续给药。

[0193] 在试验过程中任何点上发展初级终点(通过 ARA 标准的 RA)的受试者将中断研究,并且随研究人员的意思,将被允许接受抗风湿性治疗,包括 DMARDs 和 / 或生物疗法。

[0194] 受试者将基于其在筛选就诊时的重量进行最初给药。称重 $< 60\text{kg}$ 的受试者将接受  $500\text{mg}$ ;称重在  $60\text{--}100\text{kg}$  之间的受试者将接受  $750\text{mg}$ ;并且称重 $> 100\text{kg}$ 的受试者将接受 1 克。CTLA4Ig 将在第 1、15、29 天和其后每 28 天时施用,进行总共 8 次给药。研究自始至终将允许受试者服用稳定低剂量的经口皮质类固醇(等价于每天 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松)。

[0195] 已诊断有未分化性关节炎的受试者将在筛选时间段中就针对环状瓜氨酸肽的抗体(抗 CCP2)的存在或不存在进行评估。具有阳性抗 CCP2 测试的受试者将基于侵蚀的存在或不存在进行分级,并且随机化到研究药物治疗时间段内。研究药物治疗时间段将是用 CTLA4Ig 或安慰剂的 6 个月治疗。未满足 RA 标准的完成治疗时间段的受试者将在观察时间段中脱离研究药疗法进行观察,其中维持不知情。观察时间段将由就安全和功效的 18 个月每季就诊组成。

[0196] 研究群体

[0197] 具有未分化性关节炎(UA)诊断的至少 18 岁但不超过 75 岁的男性或女性(非哺乳且非妊娠),其具有 2 个或更多个关节的有症状临床滑膜炎,并且 1) 具有 1987ARA 关于 RA 的诊断标准中的至少一个且不超过 3 个,2) 未满足关于任何其他风湿性疾病(例如,红斑狼疮)的诊断标准,和 3) 通过 ELISA 对于针对环状瓜氨酸肽的自身抗体也是阳性的(Immunoscan RA Mark 2,Euro-Diagnostica,Arnhem,荷兰)。疾病持续时间[定义为从未分化性关节炎的症状(关节疼痛、肿胀或显著僵硬)发作到入组的时间]必须小于 18 个月。在筛选前不允许用 DMARD 或生物疗法的先前治疗。

[0198] 评估标准

[0199] 研究的初级结果将是在 12 个月时具有通过 1987 ARA 标准的 RA 诊断的受试者比例。

[0200] 次级功效结果量度包括在 24 个月时具有通过 1987 ARA 标准的 RA 诊断的受试者比例,在 6、12 和 24 个月时具有持续有症状临床滑膜炎的受试者比例,在 6、12 和 24 个月时的平均全 DAS(CRP)得分,在 6、12 和 24 个月时具有 $< 1.6$ 的 DAS 得分的受试者比例,类风湿因子和抗 CCP 抗体效价,以及使用对顺序和治疗不知情的集中读数器通过钆 MRI 得到的手炎症和结构性伤害(滑膜炎、侵蚀和骨炎程度)。受试者报告的结果将包括 HAQ 和 SF-36。

[0201] 将评估在 2 个治疗组之间随着时间过去在 ACR RA 复合变量的核心组分中的改变作为三级目的。

**[0202] 功效分析**

**[0203]** 初级功效分析将是评估在 CTLA4Ig 和安慰剂中在 12 个月时 RA 发展的比率。将提供关于 2 个治疗组在 12 个月时具有 RA 诊断的受试者比例的点和区间估计。在 CRF 中因“缺乏功效”的确定原因中断研究的受试者将视为对于初级终点的非应答者（即，在评估发展通过 ARA 标准的 RA 的受试者比例时，他们将计数在分子（numerator）和分母（denominator）中）。如果受试者具有在第 12 个月就诊时不归因于中断而遗失的数据和来自后续就诊的评估，那么这个评估将在 12 个月分析中使用。否则，受试者将不包括在分析中。将执行类似分析以用于评估关于在 24 个月时 RA 发展的比率。

**[0204]** 将使用 MRI 成像评估滑膜炎和结构性关节伤害程度。将使用 OMERACT 6RA MRI 评分系统 (Ostergaard, M. 等人, “OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core Set of MRI Acquisitions, Joint Pathology Definitions, and the OMERACT RA-MRI Scoring System”, J. Rheumatology, 30 (6) :1385-1386 (2003))。将使用描述统计学在 6、12 和 24 个月时概括在侵蚀、水肿和滑膜炎中距离基线的改变。

**[0205]** 将在 6、12 和 24 个月时评估有症状临床滑膜炎的持续性。关于 CTLA4Ig 和安慰剂组将用点估计和 95% 置信区间概括关于持续性滑膜炎的比率。

**[0206]** 将评估 CTLA4Ig 对自身抗体 [IgM 类风湿因子和抗环状瓜氨酸肽（抗 CCP2）] 的血清水平的药物动力学作用。将按照治疗组概括在基线、第 12 个月和第 24 个月就诊时的药物动力学变量分布连同其距离基线的改变。将按照治疗臂和基线状态（阳性 / 阴性）概括达到阳性 / 阴性结果的受试者比例。

**[0207]** 关于在每次就诊中的 CTLA4Ig 和安慰剂组，将用点估计和 95% 置信区间概括在 6、12 和 24 个月时在全 DAS (CRP)、HAQ 和 SF-36 的所有组分中距离基线的平均改变。此外，将按照治疗臂概括具有减轻（全 DAS 得分 < 1.6）的受试者百分比。

**[0208]** 将评估在 2 个治疗组之间随着时间过去在 ACR RA 复合变量的核心组分中的改变。

**[0209] 安全分析**

**[0210]** 将列出显著体格检查发现以及临床和实验室测试结果。将概括统计学制成表格。将产生所有不利事件的频率分布和个别列表。将列出在临床实验室测试结果距离基线中的改变。将按照治疗臂概括由于一定原因的中断。

**[0211] 免疫原性分析**

**[0212]** 将使用描述统计学（几何平均值、标准差等）概括免疫原性变量分布及其距离基线的改变，并且还将计算距离基线的改变的 95% 置信区间。免疫原性的缺乏将定义为阳性应答的不存在。基于关于每个测定阳性的测定截止值和那个应答通过免疫耗竭的进一步证实，定义阳性应答的存在。对于抗 CTLA4Ig 测定，通过用平均给药后受试者血清样品 OD 除以其相应给药前（第 1 天）受试者血清样品 OD 的平均值来计算该值。对于抗 CTLA4-T 测定，通过用平均受试者血清样品 OD 除以在样品板上阴性对照的平均 OD 来计算截止值。在测定验证过程中确立截止值，并且当受试者群体或测定试剂中产生改变时可以重新确立。如果样品是阴性的，那么给它指定 < 评估的稀度的值。如果值是阳性的，那么评估连续稀释，并且给它指定与内插的血清稀度倒数相应的滴度值，这等于关于阳性的确立的截止值。还将计算阳性应答比率（如果存在的话）及其 95% 置信区间。

**[0213] 受试者选择标准**

- [0214] 对于进入研究内,必须满足下述标准。
- [0215] 包括标准
- [0216] A. 签名的书面知情同意书
- [0217] 受试者将自愿参加研究且签署知情同意书。
- [0218] B. 靶群体
- [0219] 受试者必须具有 UA 的诊断。具有 UA 的受试者应具有 2 个或更多个关节的有症状临床滑膜炎,并且应具有美国风湿病协会 (1987) RA 分类标准中的至少一个且不超过 3 个。
- [0220] 受试者必须未满足关于任何其他风湿性疾病 (例如,红斑狼疮) 的诊断标准。
- [0221] 受试者的疾病持续时间 [ 定义为从关节炎的症状 ( 关节疼痛、肿胀或僵硬 ) 发作到入组的时间必须小于 18 个月。
- [0222] 受试者必须通过 ELISA 对于针对环状瓜氨酸肽的自身抗体是阳性的 (Immunoscan RA Mark 2, Euro-Diagnostica, Arnhem, 荷兰)。
- [0223] C. 年龄和性别
- [0224] 男性和女性,年龄 18-75 岁。具有生育可能性的男性和女性如果实行有效的避孕措施则是合格的。
- [0225] D. 伴随药疗法
- [0226] 研究自始至终允许使用稳定低剂量的经口皮质类固醇。治疗必须已减少至等价于每天  $\leq 10\text{mg}$  泼尼松进行 28 天,并且在治疗 (第 1 天) 前 28 天中的至少 25 天稳定。
- [0227] 排除标准
- [0228] A. 性别和生殖状态
- [0229] 1) 整个研究时间段和 CTLA4Ig 最后一次输注后最高达 10 周不愿意或不能使用可接受方法以避免妊娠的 WOCBP
- [0230] 2) 妊娠或哺乳的女性
- [0231] 3) 在入组时或在研究药物施用前具有阳性妊娠测试的女性
- [0232] 4) 整个研究药物治疗时间段和研究药疗法最后一次输注后最高达 10 周不愿意或不能使用适当避孕方法的男性。
- [0233] B. 医疗史和并发症
- [0234] 5) 受损、不能胜任或无法完成研究相关评估的受试者。
- [0235] 6) 满足关于任何其他风湿性疾病 (例如,红斑狼疮) 的诊断标准的受试者。
- [0236] 7) 未分化关节炎持续时间超过 18 个月
- [0237] 8) 先前已接受用批准的生物学 RA 疗法 (英夫单抗、依那西普 (etanercept)、阿那白滞素 (anakinra)、阿达木单抗 (adalimumab)) 的治疗的受试者。
- [0238] 9) 具有主要器官系统的活动性脉管炎的受试者。
- [0239] 10) 严重、进行性或不受控制的肾、肝、血液、胃肠、肺、心、神经学或脑疾病的当前症状。在研究人员看来,可能将参加这个研究的受试者置于不可接受的危险中的伴随医学状况。
- [0240] 11) 女性受试者,其尚未具有年龄和 / 或危险因素合适的乳腺癌筛选 (如通过公开的指导和 / 或由国家癌症或医学学会和 / 或卫生部 (Ministry of Health) 认可的地方标准定义的),或已具有怀疑为恶性肿瘤的乳腺癌筛选研究,并且其中恶性肿瘤的可能性无法根

据另外临床、实验室或其他诊断评估合理排除。

[0241] 12) 在最近 5 年内具有癌症史的受试者（通过局部切除术治愈的非黑素瘤皮肤细胞癌除外）。现有的非黑素瘤皮肤细胞癌必须在给药前去除。

[0242] 13) 具有临床上显著药物或酒精滥用的受试者。

[0243] 14) 具有任何严重急性细菌感染（例如肺炎或肾盂肾炎，除非用抗生素治疗且完全消除）的受试者。

[0244] 15) 具有严重慢性或复发性细菌感染（例如复发性肺炎、慢性支气管扩张）的受试者。

[0245] 16) 在前 3 年内具有需要治疗的活动性结核 (TB) 的受试者。在筛选时具有阳性 PPD 的受试者对于研究将不合格，除非活动性 TB 感染已排除，并且他们在入组时具有阴性胸部 X 射线片。等于或大于 10mm 的 PPD 应答将视为阳性测试，尽管如通过临床环境和研究人员根据公开的指导和 / 或由医学学会认可的地方标准测定的，可以应用更低阈值 (5mm)。

[0246] 17) 具有在入组前小于 2 个月消除的带状疱疹的受试者。

[0247] 18) 在潜在入组时具有活动性或潜伏性细菌或病毒感染证据（如通过研究人员评估的）的受试者，包括具有人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染证据的受试者。

[0248] C. 体格和实验室测试发现

[0249] 19) 乙型肝炎表面抗原阳性受试者。

[0250] 20) 同时是 RIBA 阳性或 PCR 阳性的丙型肝炎抗体阳性受试者。

[0251] 21) 具有下述实验室值中的任何一种的受试者：

[0252]  $Hgb < 8.5g/dL$ 。

[0253]  $WBC < 3,000/mm^3 (3 \times 10^9/L)$

[0254] 血小板  $< 100,000/mm^3 (100 \times 10^9/L)$ 。

[0255] 血清肌酸酐  $>$  正常上限 2 倍。

[0256] 血清 ALT 或 AST  $>$  正常上限 2 倍。

[0257] 在研究人员看来，可能将参加这个研究的受试者置于不可接受的危险中的任何其他实验室测试结果。

[0258] D. 禁止疗法和 / 或药疗法

[0259] 22) 在任何时候已接受用 CTLA4Ig 的治疗或 CTLA4Ig 的受试者。

[0260] 23) 在第 1 天给药的 28 天内（或小于 5 个终末消除半衰期）已接受用任何研究药物的治疗的受试者。

[0261] 24) 目前接受用免疫吸附柱（例如 Prosorba 柱）、霉酚酸酯 (CELLCEPT®)、环孢菌素、D-青霉胺或钙依赖磷酸酶抑制剂的治疗的受试者。

[0262] 25) 在筛选前用 DMARD 的先前治疗。

[0263] E. 其他排除标准

[0264] 26) 强迫拘留（非自愿监禁）用于治疗精神病或身体（例如传染病）疾病的囚犯或受试者必须不能入组到这个研究内。

[0265] 参加 MRI 评估的受试者

[0266] 在现场的 MRI 设施的放射学家负责确定受试者是否禁忌进行这个程序。下述是可能排除受试者进行手 / 腕 MRI 的一些常见条件列表。然而，这不应用作地方临床护理标准

的替代物。在这个研究中的个别受试者中执行 MRI 的最后决定取决于现场放射学家、研究人员和由地方伦理委员会 (local Ethics Committee) 设置的标准。

[0267] 1) 具有幽居恐怖症病史的受试者。

[0268] 2) 具有与适合磁体孔相关的身体限制的受试者 (即体重超过 250 磅或 113.4 千克)。

[0269] 3) 纹有眼线或具有直接在手或腕 (待成像区域) 上的纹身的受试者。

[0270] 4) 具有对造影剂的变态反应病史的受试者。

[0271] 5) 在 MRI 检查前 72 小时内已暴露于放射学造影剂的受试者。

[0272] 6) 具有待通过 MRI 检查评估的在腕中的融合关节或在手或腕中的关节置换术的受试者。

[0273] 7) 具有起搏器、心外膜起搏器导线、MRI 不相容性人工心脏瓣膜、小于 2 个月的 MRI 不相容性血管夹、或任何年限的 MRI 不相容性动脉瘤夹的受试者。

[0274] 8) 具有 MRI 不相容性耳蜗植入体的受试者。

[0275] 9) 具有脊神经刺激器的受试者。

[0276] 10) 具有输注泵的受试者。

[0277] 11) 在眼 / 眶中或在身体的脑或主要神经血管结构附近具有金属碎片的受试者, 具有涉及暴露于焊接的工作经历的受试者, 或在其体内任何地方具有弹片的受试者。

[0278] CTLA4Ig 或安慰剂的施用

[0279] 受试者将随机化至 2 个治疗组中的 1 个:

[0280] 组 1: CTLA4Ig 静脉内输注 (N = 25)。

[0281] 组 2: 安慰剂静脉内输注 (N = 25)。

[0282] 接受活性 CTLA4Ig 的受试者将基于其筛选就诊重量进行给药。称重 < 60kg 的受试者将接受 500mg, 称重 60-100kg 的受试者将接受 750mg, 并且称重 > 100kg 的受试者将接受 1 克。随机化至接受安慰剂的受试者将被给予在水或生理盐水 (NS) 中的 5% 葡萄糖。

[0283] 输注剂量将基于紧在第 1 天就诊前来自筛选就诊的受试者体重。中央随机化系统 (Central Randomization System) 将证实受试者的体重, 并且指定 CTLA4Ig 小瓶数目以配给就诊。受试者将在每一个治疗时间段就诊时 (第 1、15、29、57、85、113、141 和 169 天) 接受研究药疗法的给药。对于在第 15 和 29 天时的给药允许 +/-3 日窗口; 对于其后的给药允许 +/-7 日窗口。在研究持续时间自始至终, 输注应在每天大约相同时间发生。研究药疗法的所有给药将在 100ml 固定体积中以经过约 30 分钟的恒定流速静脉内施用。在输注结束时 IV 线必须用 25ml D5W 或 NS 溶液冲洗。输注溶液必须在未标识内容物的容器中提供给施用剂量的人员, 以便维持不知情。必须通过使不同的合格工作成员执行研究药疗法输注来使得临床评估者保持对治疗指定不知情。所有静脉内输注将在受试者处于坐姿的情况下进行。在治疗剂量水平或时间表中将不进行调整。受试者将就不利事件进行观察, 并且生命体征 (血压、心率、呼吸、体温) 将从每次输注开始 (给药前和 60 分钟) 进行监控。对于生命体征收集存在 +/-5 分钟窗口。受试者将从输注开始观察最低限度 1 小时。如果临床指示, 那么观察时间段应延长。

[0284] 在不存在不利事件的情况下的给药改变

[0285] 在不存在认为至少可能涉及研究药疗法治疗的不利事件的情况下, 受试者将完成

其如由规程开处的预定输注。受试者的预定给药可以在靶日期前或后 72 小时 (+/-3 天) 内施用,以为了第 15 和 29 天受试者和 / 或现场人员的方便做调整。对于其后的给药允许 +/-7 日窗口。

[0286] 在研究过程中的禁止和限制疗法

[0287] DMARDs (例如,氨甲蝶呤、经口或肠胃外金、柳氮磺吡啶、氯喹、羟氯喹、D- 青霉胺、硫唑嘌呤、来氟洛米、环孢菌素) 或生物制品 (例如,依那西普、阿达木单抗、阿那白滞素) 是不允许的。

[0288] 研究自始至终将允许受试者服用非类固醇抗炎药。研究自始至终将允许受试者服用稳定低剂量的经口皮质类固醇 (等价于每天  $\leq 10\text{mg}$  泼尼松)。随研究人员的意思,试验每 6 个月可以利用最高达 2 种下述高剂量的皮质类固醇:经口过程 (等价于  $20\text{mg}/\text{天}$  泼尼松,进行最多 2 周),或单次 IM (肌肉) 给药或单次 IA (关节内) 给药。

[0289] 在这个时间段过程中允许非类固醇抗炎药 (NSAIDs) 包括阿司匹林 (ASA) 的使用。

[0290] 应避免皮质类固醇的 IA 和 IM 注射。在关键功效评估的一个月 (即,第 169 天、第 12 个月和第 24 个月) 内不允许高剂量类固醇 AREs 的 IA 或 IM 注射。

[0291] 除在关节评估前 12 小时外,可以使用下述药疗法:

[0292] 对乙酰氨基酚 (扑热息痛)

[0293] 组合产物,包括对乙酰氨基酚和麻醉性镇痛药 (例如,对乙酰氨基酚与磷酸可待因、对乙酰氨基酚与萘磺酸丙氧芬、对乙酰氨基酚与盐酸羟可待酮、对乙酰氨基酚与重酒石酸二氢可待因酮等) 曲马多

[0294] 表 10

[0295] 研究程序和观察

[0296] A. 双盲研究药物治疗期

[0297]

| 就诊日                       | 第 1 天 <sup>a</sup> | 第 15 天<br>(+/-<br>3 天) | 第 29 天<br>(+/-<br>3 天) | 第 57 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 85 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 113 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 141 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 169 天<br>(+/-<br>7 天) |
|---------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 使受试者随机化和分级<br>(联系中央随机化中心) | X                  |                        |                        |                        |                        |                         |                         |                         |
| 功效评估                      |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 手和足的射线照片                  |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 手-腕的钆 MRI (仅欧洲场<br>所)     |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 压痛关节计数 <sup>b</sup>       | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 肿胀关节计数                    | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 受试者对疼痛的评价                 | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 受试者对疾病活动性的评<br>价          | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 医生对疾病活动性的全面<br>评价         | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 受试者对躯体功能的评价<br>(HAQ)      | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| SF-36                     | X                  |                        | X                      |                        | X                      |                         |                         | X                       |
| 受试者对治疗的应答                 |                    |                        |                        |                        | X                      |                         |                         | X                       |
| 安全评估                      |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         |                         |
| 不利事件监控                    | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 中期体格检查                    | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| ECG                       |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 生命体征                      | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 实验室                       |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         |                         |
| CBC                       | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| 化学作用实验对象组                 | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |

[0298]



| 就诊日                                               | 第 1 天 <sup>a</sup> | 第 15 天<br>(+/-<br>3 天) | 第 29 天<br>(+/-<br>3 天) | 第 57 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 85 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 113 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 141 天<br>(+/-<br>7 天) | 第 169 天<br>(+/-<br>7 天) |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 尿分析                                               |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 尿/血清妊娠测试 (仅<br>WOCBP) <sup>c</sup>                | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| CRP                                               | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |
| IgM RF                                            | X                  |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 生物标记 (IL-6、TNF $\alpha$ 、<br>IL-1 $\beta$ 、MMP-3) | X                  |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| HLA 分型                                            | X                  |                        |                        |                        |                        |                         |                         |                         |
| 免疫原性                                              | X                  |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 抗-CCP2                                            |                    |                        |                        |                        |                        |                         |                         | X                       |
| 给药                                                | X                  | X                      | X                      | X                      | X                      | X                       | X                       | X                       |

[0299] <sup>a</sup> 所有评价和结果必须在联系中央随机化中心前再检查。所有评价必须在给药前执行。

[0300] <sup>b</sup> 将进行 68/66 计数评价。

[0301] <sup>c</sup> 在就诊前 48 小时内应进行阴性妊娠测试。

[0302] B. 治疗后双盲观察

[0303]

| 就诊日 (对于第 9、15、18 和 21 个月允许+/- 7 天; 对于第 12 和 24 个月允许+/- 30 天) | 第 9 个月<br>(第 253 天) | 第 12 个月<br>(第 365 天) <sup>a</sup> | 第 15 个月<br>(第 449 天) | 第 18 个月<br>(第 533 天) | 第 21 个月<br>(第 617 天) | 第 24 个月<br>(第 729 天) | 早期终止 |
|--------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------|
| 功效评估                                                         |                     |                                   |                      |                      |                      |                      |      |
| 手和足的射线照片 <sup>b</sup>                                        |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    |      |
| 手-腕的钆 MRI (仅欧洲场所)                                            |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    |      |
| 压痛关节计数 <sup>c</sup>                                          | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 肿胀关节计数                                                       | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 受试者对疼痛的评价                                                    | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 受试者对疾病活动性的评价                                                 | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 医生对疾病活动性的全面评价                                                | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 受试者对躯体功能的评价 (HAQ)                                            | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| SF-36                                                        | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 受试者对治疗的应答                                                    | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 安全评估                                                         |                     |                                   |                      |                      |                      |                      |      |
| 不利事件监控                                                       | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 中期体格检查                                                       | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 完全体格检查                                                       |                     |                                   |                      |                      |                      |                      |      |
| 重量                                                           |                     |                                   |                      |                      |                      | X                    | X    |
| 生命体征                                                         | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 实验室                                                          |                     |                                   |                      |                      |                      |                      |      |
| CBC                                                          | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 化学作用实验对象组                                                    | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 尿分析                                                          |                     |                                   |                      |                      |                      | X                    | X    |
| 尿/血清妊娠测试 (仅 WOCBP)                                           | X <sup>d</sup>      | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| 乳腺癌筛选                                                        |                     |                                   |                      |                      |                      |                      |      |
| 一年一次/每年 (仅女性)                                                |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    | X    |
| CRP                                                          | X                   | X                                 | X                    | X                    | X                    | X                    | X    |
| IgM RF                                                       |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    |      |

[0304]

| 就诊日 (对于第 9、15、18 和 21 个月允许+/- 7 天; 对于第 12 和 24 个月允许+/- 30 天) | 第 9 个月<br>(第 253 天) | 第 12 个月<br>(第 365 天) <sup>a</sup> | 第 15 个月<br>(第 449 天) | 第 18 个月<br>(第 533 天) | 第 21 个月<br>(第 617 天) | 第 24 个月<br>(第 729 天) | 早期终止 |
|--------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------|
| 生物标记 (IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-3)                |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    |      |
| 免疫原性                                                         | X                   | X                                 |                      |                      |                      |                      |      |
| 抗-CCP2                                                       |                     | X                                 |                      |                      |                      | X                    |      |

[0305] <sup>a</sup> 如果受试者对于第 12 个月就诊没有来诊所,那么在第 12 个月时需要的所有评价将在下一次诊所就诊时进行。

[0306] <sup>b</sup> 如果射线照片在第 6 和 12 个月之间获得,并且受试者中断,那么射线照片应转交给集中读数器用于评价 Genant-modified Sharp 得分。

[0307] <sup>c</sup> 将进行 68/66 计数关节评价。

[0308] <sup>d</sup> 在就诊前 48 小时内应进行阴性妊娠测试。

[0309] 安全评价

[0310] 接受一剂研究药物的所有受试者将就安全和免疫原性测试进行评估。安全结果包括不利事件、生命体征中临床上显著的改变、和实验室测试异常。研究人员将每个不利事件的严重程度确定为轻度、中度、重度或极重度。基于实验室指导研究人员认为临床上相关的实验室发现应记录为不利事件。此外,研究人员将决定不利事件和研究药物施用的关系。

[0311] 完全和 / 或中期体格检查可以通过医学博士 (Doctor of Medicine) (MD)、骨病医生 (Doctor of Osteopathy) (DO)、医生助理 (Physician's Assistant) (PA) 或从业护士 (Nurse Practitioner) (NP) 执行。尽管中期体格检查可能不象初始全面检查那样全面,但中期检查的关键方面应评估如临床指示的重要身体系统。随检查者的意思,这些身体系统可以包括淋巴结、肝、脾和乳房。中期体格检查可能注意到自最后一次评价后受试者状况 (身体系统) 中的任何改变,且不排除如临床指示的身体系统中任何一种的检查。

[0312] 如果在获得书面知情同意书 6 个月内未执行,或如果在档案上无证明文件,那么需要在筛选就诊时的胸部 X 射线片。

[0313] 如果在获得书面知情同意书 6 个月内未执行,或如果在档案上无证明文件,那么需要 12 导联心电图 (ECG)。在治疗时间段结束时 (第 169 天),或如果受试者早期终止治疗时间段,那么在中断后 28 天时将重复 ECG。

[0314] 为了鉴定具有潜伏性结核 (TB) 的受试者,如果在筛选 6 个月内未执行,或如果在档案上没有在 6 个月内测试的证明文件,那么需要 PPD 测试 (纯化蛋白衍生物结核菌素皮肤测试)。所有受试者包括具有先前 BCG 接种疫苗的那些应就潜伏性 TB 进行评估。

[0315] PPD 皮肤测试应依照提供关于 PPD 测试和解释的建议的公开指导在下述受试者中进行:被考虑用于由生物制剂治疗的、具有类风湿性关节炎的受试者 (“Preliminary guidelines for diagnosing and treating tuberculosis in subjects with rheumatoid arthritis in immunosuppressive trials or being treated with biological agents”, Ann. Rheum. Dis., 61 (Supp.) : ii62-ii63 (2002), 并且还可以应用由医学学会认可的在具

有待用生物制品治疗的 RA 的受试者中关于 PPD 测试的 Ex US 场所,地方指导),免疫抑制的受试者(“Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection”, Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 161:S221-S247(2000) 和 “Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children”, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 161:1376-1395(2000)),和具有先前 BCG 接种疫苗史的受试者。

[0316] 在筛选时具有阳性 PPD 的受试者对于研究将不合格,除非活动性 TB 感染已排除,并且他们在入组时具有阴性胸部 X 射线片。等于或大于 10mm 的 PPD 应答应被视为阳性测试,尽管如通过临床环境和研究人员根据公开的指导和 / 或由医学学会认可的地方标准测定的,可以应用更低阈值 (5mm)。

[0317] 在进入这个研究内前,女性受试者需要具有年龄和 / 或危险因素合适的乳腺癌筛选。乳腺癌筛选应根据公开的指导和 / 或由国家癌症或医学学会 (National Cancer or Medical Society) 和 / 或卫生部认可的地方标准执行。此外,由研究场所利用的乳腺癌筛选指导应使得对地方 IRB/ 伦理委员会 (Ethics Committee) 可获得,并且在受试者的知情同意书中说明。

[0318] 在筛选 6 个月内执行的文件证明的乳腺癌筛选将被接受为满足这个要求。然而,如果在档案上没有来自筛选机构的证明文件,或在进入研究前超过 6 个月执行筛选检查,那么筛选将是需要的。

[0319] 基于关于乳腺癌筛选的研究进入标准,女性受试者需要具有一年一次或每年重复的乳腺癌筛选。

[0320] 对于合格受试者,在筛选时应获得手 / 腕和足的清晰射线照片。对合格受试者拍摄的射线照片 (在阳性抗 CCP2 测试证实后) 将送给集中读数器用于评价侵蚀的存在或不存在。关于侵蚀的信息将用于分级到研究内。手 / 腕和足的清晰射线照片还在 6、12 和 24 个月时获得,并且通过集中读数器针对 Genant-modified Sharp 得分进行评估。如果射线照片在第 6 和 12 个月之间获得,并且受试者中断,那么射线照片应转交给集中读数器用于评价。

[0321] 手 / 腕 (仅身体一侧) 的钆 MRI 应在随机化前对于仅在欧洲场所的所有受试者执行,其具有阳性抗 CCP2 测试和手或腕的 2 个或更多个关节的有症状临床滑膜炎。MRI 将通过集中读数器评价。相同手 / 腕的随访 MRI 也将在 6、12 和 24 个月时执行,并且通过集中读数器评价。将不进行足的 MRI。

[0322] 对于所有 WOCBP 在每次就诊前 48 小时内将执行尿或血清妊娠测试。如果任何女性受试者变得怀孕,那么她将立即终止研究。

[0323] 手和腕的钆 MRI

[0324] 在研究药疗法的第一次给药前 2 周内 (第 -14 天到第 -1 天) 使用 1.5Tesla 机器,对于仅在欧洲场所的所有受试者执行手和腕 (仅一侧) 的钆 MRI 研究,其具有阳性抗 CCP2 测试和手或腕的 2 个或更多个关节的有症状临床滑膜炎,并且在 6、12 和 24 个月时间点时重复。MR 图像数据将由中心机构的放射学家根据 OMERACT 6 方法以下述方式解释:

[0325] 腕和手中的侵蚀 / 水肿评分

[0326] 侵蚀和骨髓水肿将根据 OMERACT 6 分级方案分开评分。腕和手中的每根骨 (腕骨、

桡骨远端、尺骨远端、掌骨底和包括 MCP 关节的骨) 在 0-10 量表上分开评分, 如通过与评估的骨体积相比较的侵蚀的骨比例和水肿体积 (分开评分) 测定的。评分量表以 10% 增量测定, 其中得分 10 代表评估的骨被侵蚀或水肿损害 > 90%。

[0327] 腕和手中的滑膜炎评分

[0328] 滑膜炎在多个腕区域 (桡尺远侧关节、桡腕关节、腕间和腕掌关节以及第 2- 第 5 个 MCP 关节) 在 0-3 量表上进行评估。得分 3 代表具有包括 > 2/3 评估的滑膜区室的钆增强组织体积的严重级别。

[0329] 关于基线和 12 个月图像数据可用的所有受试者的所有 MR 图像将通过对治疗分配和顺序不知情的受过训练的集中读数器进行读数。

[0330] HLA 分型

[0331] 待随机化的所有受试者在第 1 天时将抽取外周血用于 HLA 分型, 以测定与 RA 易感性 / 严重程度相关的等位基因 ( “共享的表位” 等位基因 HLA-DR0401 和 0404) 的存在或不存在。随机化的受试者将对于这些等位基因分类为无效、杂合、纯合或双杂合的。这个信息将进一步表征研究受试者对于发展严重 RA 的危险。

[0332] 实验室测试评价

[0333] 在所有就诊时在输注前将从进入这个研究的每个受试者中获得血液和 / 或尿样品。研究人员认为在临床上相关的任何实验室测试结果应在 CRF 的合适不利事件页上记录。

[0334] A. 血液学

[0335] 血红蛋白血细胞比容总 WBC 计数, 包括差异血小板计数 RBC

[0336] B. 血液化学

[0337] 钠肌酐钾血液尿素氮 (BUN) 氯化物总胆红素总蛋白质丙氨酸转氨酶 (ALT) 清蛋白天冬氨酸转氨酶 (AST) 钙  $\gamma$ - 谷氨酰转移酶 (GGT) 磷碱性磷酸酶尿酸葡萄糖

[0338] C. 尿分析

[0339] 尿沉降物的 pH 蛋白质葡萄糖血液显微镜术检查, 如果血液、蛋白质或葡萄糖在浸渍片上是阳性的话。

[0340] D. 肝炎筛选

[0341] ( 仅在筛选就诊时执行 ) 乙型肝炎表面抗原 ( 如果阳性, 那么核心抗体 ) 丙型肝炎抗体 ( 如果阳性, 那么 RIBA 或 PCR )

[0342] E. 妊娠测试

[0343] 尿或血清妊娠测试 ( 最低限度灵敏度 25IU/L HCG ) 必须在每次就诊前 48 小时内对于所有 WOCBP 执行, 直到第 9 个月就诊时。如果任何女性受试者变得怀孕, 那么她将终止研究。妊娠测试将在当地进行处理。

[0344] F. 药物动力学 (PD) 测试

[0345] IgM RFC- 反应蛋白 (CRP) 炎性细胞因子 (IL-6、TNF  $\alpha$  、IL-1  $\beta$  ) 基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 抗 CCP2

[0346] G. 免疫原性测定

[0347] 抗 CTLA4Ig 抗体

[0348] H. 其他

[0349] 人白细胞抗原 (HLA)

[0350] 此外,如果认为对于监控受试者安全需要,研究人员将获得样品用于另外实验室测试。

[0351] 免疫原性

[0352] CTLA4Ig 的免疫原性潜力将基于抗 CTLA4Ig 抗体水平进行评估。

[0353] 完成研究药物治疗阶段的受试者将具有在就诊第 1、169、253 天和第 365 天时获得的血清样品,以测定抗 CTLA4Ig 抗体的存在。

[0354] 未完成研究的研究药物治疗阶段的受试者将具有在下述时间收集的血清样品:在第 1 天时以及在研究药疗法最后一次给药后的第 28、56 和 85 天时。样品将就抗 CTLA4Ig 抗体的存在进行测定。

[0355] 经验证灵敏的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法将用于测量血清中的抗 CTLA4Ig 抗体和血清中的抗 CCP-2 的效价。

[0356] 功效评估

[0357] A. 手和足的 X 射线片

[0358] 手和足的 X 射线片将在筛选、第 169 天、第 12 个月和第 24 个月时对具有阳性抗 CCP2 测试的所有受试者执行。所有中心将需要满足技术要求。手和足的射线照相术将进行标准化,以确保用于评估类风湿性关节炎的射线照相术进展的足够图像质量。基于设备的技术能力以及 X 射线技术人员的能力和执照,放射学机构和人员将有资格参加试验。射线照相技术将通过书面射线照相术程序手册的使用和 X 射线技术人员的训练进行协调。此外,胶片-屏幕系统将进行标准化,以确保用于评估侵蚀和关节间隙变窄的足够分辨率。收集的试验的射线照片将送给集中读数设施用于由在类风湿性关节炎的评分中受过训练且有经验的放射学家通过 Genant-modified Sharp 分级方案进行质量控制和集中评估(以不知情方式)。将指定主要读数和备用读数。通过一组测试病例的评估和读数器之间一致的评估,来证明读数器对于研究是合格的。读数器对时间点次序将是不知情的。

[0359] B. 手-腕的钆增强的 MRI

[0360] 手-腕的钆增强的 MRI 将对于具有阳性抗 CCP2 测试的所有随机化受试者执行,所述受试者在筛选、第 169 天、第 12 个月和第 24 个月时具有手的有症状临床滑膜炎。应最初选择通过临床评估具有更多滑膜炎的受试者的手-腕且用于所有后续评估。如果手/腕是无症状的,或如果通过临床评估不存在滑膜炎,那么不应执行基线 MRI(和所有随访 MRI 研究)。

[0361] MRI 检查将进行标准化,以确保用于评估类风湿性关节炎的射线照相术进展的足够图像质量。基于设备的技术能力以及技术人员的能力和执照,放射学机构和人员将有资格参加试验。射线照相技术将通过书面射线照相术程序手册的使用和技术人员的训练进行协调。收集的试验的 MRI 数据将送给集中读数设施用于质量控制和集中评估。功效评估将仅通过集中读数器进行。

[0362] C. 关节计数评估

[0363] 应答测量将由研究工作人员在研究会议或其他讨论会上进行再检查和讨论,作为标准化研究工作人员之间的分级的方法。关于关节计数评估的训练和说明书将在研究人员的会议上或在专题讨论会上进行讨论。

[0364] 关节计数评估可以通过下述人员执行:MD、DO、PA、NP 或 RN。理想地,关节计数应在执行任何其他评估或程序前进行。

[0365] 必须采取每一努力以确保一个或多个相同评估者将完成对每个受试者的评估。就诊应考虑一个或多个评估者的可用性来确定时间。如果一个或多个评估者不能完成评估,那么具有重叠经验的合格个体可以执行评估。谁执行评估的证明文件在来源注解中记录。

[0366] D. 临床评估

[0367] 在研究持续时间自始至终,应答的临床评估应通过一个或多个相同评估者且在一日的大约相同时间进行。一个或多个临床评估者应是施用研究药疗法输注不同的人。

[0368] 临床评估者将以其自身的笔迹完成 CRFs 的全面评价和关节计数页。这些页将是用于研究的源文件。

[0369] 受试者将以其自身的笔迹完成 CRFs 的 HAQ 和 SF-36 页。这些页将是用于研究的源文件。

[0370] 得自中央实验室的 CRP 将用于计算全 DAS。

[0371] E. 药物动力学评估

[0372] 在这个研究中收集的药动力学数据将包括由连续变量组成的实验室值。将收集关于类风湿性关节炎中的免疫调谐或炎症的生物标记,包括 IgM RF、CRP 和抗 CCP2。

[0373] CRP 将在双盲研究药物治疗阶段、治疗后双盲观察阶段、以及 2 个阶段中的早期终止过程中在每次就诊时收集。

[0374] 类风湿因子 (IgM RF) 和生物标记将在第 -21 天、第 1 天、第 169 天、以及第 12 个月和第 24 个月时收集。

[0375] 抗 CCP2 将在筛选、第 169 天、第 12 个月和第 24 个月时收集。

[0376] 另外,将贮存在每次就诊时收集的部分血清,并且将分析下述生物标记:促炎细胞因子 (IL-6、TNF  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$ ) 和基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)。

[0377] 结果研究评估

[0378] A. 躯体功能

[0379] 躯体功能将使用完全健康评定问卷 (HAQ) 的能力丧失部分进行评估 (Fries, J.F. 等人,“Measurement of Subject Outcome in Arthritis”, Arthritis Rheum., 23: 137-145 (1980))。这个部分包括 20 个问题以评估在 8 个领域中的躯体功能:穿衣、起身、进食、步行、卫生学、伸手、抓握和常见活动。问题在 4 点量表上进行评估:0 = 无任何困难,1 = 具有一些困难,2 = 很困难,和 3 = 无法进行。越高的得分指示越大的功能障碍。能力丧失指数将通过将每个领域中的最差得分加和且除以回答的领域数目进行计算。

[0380] B. 健康相关的生活质量

[0381] SF-36 将用于测量健康相关的生活质量 (Birrell, F.N. 等人,“How does the Short Form 36 Health Questionnaire (SF-36) in Rheumatoid Arthritis (RA) Relate to RA Outcome Measures and SF-36 Population Values? A Cross-Sectional Study”, Clin. Rheumatol., 19:195-199 (2000); Keller, S.D. 等人,“The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI):II. Tests of validity in four clinical trials”, Med. Care, 37 (5 Suppl.):MS51-60 (1999 年 5 月); Ware, J.E. 等人,“The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI):I. Development and cross-validation of

scoring algorithms”, Med. Care, 37 (5Suppl.) :MS40-50 (1999 年 5 月) ;和 Kosinski, M. 等人, “The SF-36 Health Survey as a generic outcome measure in clinical trials of subjects with osteoarthritis and rheumatoid arthritis: relative validity of scales in relation to clinical measures of arthritis severity”, Med. Care, 37 (5 Suppl.) :MS23-39 (1999 年 5 月) )。将计算个别子量表 (subscale) 得分和 2 个总得分: (1) 躯体组分概括 (PCS), 其包括躯体功能、因躯体问题引起的角色限制、身体疼痛和一般健康; (2) 心理组分概括 (MCS), 其包括生命力、社会功能、因情绪问题引起的角色限制和心理健康。SF-36 由 FDA 推荐为测量 RA 受试者中的健康相关的生活质量的验证的工具 (Guidance for Industry, Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological Products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Evaluation and Research (1999 年 2 月) )。

[0382] 药物产品信息

[0383] 不在其他方面与研究进行有关的, 在现场的药剂师或合格人员将重构药物用于静脉内 (IV) 施用。

[0384] 所有重构和稀释必须使用聚丙烯非硅化处理注射器 (由德国的 Henke Sass Wolf 制造的 Norm-Ject 进行)。

[0385] 注意: 对于重构的每个小瓶必须使用分开的针和注射器。

[0386] 小瓶在真空下进行密封。如果发现无这个真空的任何小瓶, 那么它们应被分离且不使用。这些小瓶必须保留直至通过你们的研究药物监控员 (Study Drug Monitor) 核对。

[0387] 注意: 小瓶在重构前不应通气。为了避免在 SWFI 添加后的泡沫形成, 应使小瓶轻轻形成涡漩直至内容物完全溶解。在冻干粉末完全溶解后, 小瓶应随后用针通气, 以使可能存在的任何泡沫消散。

[0388] 用于注射的 CTLA4Ig 药物产品的每个小瓶, 250mg/ 小瓶, 应该用 10mL SWFI (不含制菌剂) 重构, 以产生 25mg/mL 的浓度。为了使泡沫形成降到最低, 应将 SWFI 流导向小瓶侧。

[0389] 将足够过量的 CTLA4Ig 药物产品掺入每个小瓶中, 以解决取出 (withdrawl) 损失, 从而使得包含 250mg 的 10mL 重构溶液可以取出用于肠胃外施用。在产品重构后, 溶液必须用 D5W 或 0.9% 氯化钠 (NS = “生理” 盐水) 进一步稀释。

[0390] 在施用连续输注溶液时必须使用线内、无菌、无致热原、低蛋白质结合的具有 1.2  $\mu$ m 孔径的过滤器进行过滤。这个输注应在约 30 分钟的时间段内施用。输注溶液的任何未使用部分不应贮存用于再次使用。

[0391] 关于 CTLA4Ig 药物产品与其他静脉内物质的相容性没有可用数据。每当可能时 CTLA4Ig 药物产品都应在分开的静脉内线中施用, 并且不与其他药物混合。如果通过相同线顺次施用其他药物, 那么确保在任何其他原料药之间的足够和合适冲洗。

[0392] 未观察到与玻璃瓶或聚氯乙烯袋和施用装置的不相容性。

[0393] 必须小心以确保制备的溶液的无菌性, 因为药物产品不包含任何抗微生物防腐剂或制菌剂。

[0394] 用于注射的 CTLA4Ig 药物产品小瓶, 250mg/ 小瓶, 应于冷冻下 (2-8°C) 贮存, 并且避免其长期暴露于光。完整小瓶对于在这些条件下至少一年是稳定的。用于注射的 CTLA4Ig



药物产品的所有稀释物必须在原始小瓶重构后 12 小时内使用。

[0395] 用于每次稀释的具体稳定性指导如下：

[0396] 用于注射的重构的 CTLA4Ig 药物产品, 25mg/mL, 可以在原始小瓶中于 15-25℃ 的温度和室内光下或在冷冻下 (2-8℃) 贮存最高达 6 小时。

[0397] 在聚氯乙烯 (PVC) 或非 PVC IV 袋中在 NS 中的 10mg/mL 用于注射的重构的 CTLA4Ig 药物产品稀释物, 从最初重构时起可以于 15-25℃ 温度和室内光下或在冷冻下 (2-8℃) 贮存不超过 12 小时。

[0398] 用于注射的 CTLA4Ig 药物产品的稀释溶液与标准 PVC IV 输注装置相容。

[0399] 结果

[0400] 在所有随机化受试者完成第 12 个月就诊或过早中断后进行计划的中期分析, 以查看 RA 发展的初级功效终点。51/56 个随机化患者是可评估的 (平均年龄 : 45 岁 ; 症状平均持续时间 : 7 个月 [ 范围 1-18 个月 ] ; 平均 CRP 水平 : 1.1mg/dL) ; 80% 具有寡关节炎, 50% 具有侵蚀。到 1 年时, 12/27 (44%) 用 CTLA4Ig 治疗的患者发展 RA, 与 16/24 (67%) 安慰剂治疗的患者比较 (23% 差异 ; 95% 置信区间 -6 至 +48)。由于 RA 发展的中断时间显示于图 2 中。

[0401] 结论

[0402] CTLA4Ig 延缓具有 UA 的患者中至确定性 RA 的进展。CTLA4Ig 治疗的疾病减轻作用在疗法结束后维持 6 个月。

[0403] 实施例 IV

[0404] 关于实施例 III 中所述研究的 2 年数据呈现于下文。数据包括关于具有 UA 的成年人的功效、安全和药物动力学 (PD) 标记活性数据, 所述成年人接受最高达 6 个月用 CTLA4Ig 或安慰剂的双盲治疗。在双盲研究治疗 6 个月后具有持续 UA 但未满足 RA 标准的受试者脱离研究药疗法就 RA 后续发展监控最高达另外 18 个月。

[0405] 研究群体

[0406] 筛选了总共 184 个受试者, 其中 57 个入组且以 1 : 1 比随机化至用 CTLA4Ig (N = 29) 或安慰剂 (N = 28) 的双盲治疗。未能满足研究合格标准是受试者进行筛选但未随机化的最常见原因。

[0407] 除 1 个外的所有随机化受试者接受研究药疗法的至少 1 次给药。由于在随机化后但在施用任何研究药物前检测出侵蚀的存在, 分配至 CTLA4Ig 组的 1 个受试者被取出。因此, 总共 56 个受试者, 每个治疗组中 28 个, 随机化且接受研究药物的至少 1 次给药。

[0408] 在随机分配至治疗的受试者中, 39 个 (22 个 CTLA4Ig, 17 个安慰剂) 完成 6 个月研究药物治疗时间段且进入 18 个月观察时间段。在这些中, 28 个在完成观察时间段前过早撤出 (15 个在 CTLA4Ig 组中, 13 个在安慰剂组中)。这 28 个受试者中的十六 (16) 个 (每个治疗组中 8 个) 在第 12 个月前中断。CTLA4Ig 组中总共 7 个 (25.0%) 受试者和安慰剂组中总共 4 个受试者 (14.3%) 完成 24 个月研究。

[0409] 功效的缺乏是在研究药物治疗时间段过程中过早中断的最常见原因, 其中与 CTLA4Ig 组 (n = 3, 10.7%) 相比较, 在安慰剂组 (n = 8, 28.5%) 中超过 2 倍的受试者由于这个原因中断。功效缺乏也是关于从观察时间段撤出的最常见原因。在这个 18 个月时间段过程中, 由于这个原因中断的进入观察时间段的受试者比例再次对于安慰剂组 (12/17,

70.6%) 而言高于 CTLA4Ig 组 (11/22, 50.0%)。在观察时间段过程中由于功效缺乏中断的 23 个受试者中, 14 个 (7 个 CTLA4Ig, 7 个安慰剂) 在第 12 个月前撤出。

[0410] 不利事件导致在研究药物治疗时间段过程中在 CTLA4Ig 组中的 1 个受试者和在观察时间段过程中在安慰剂组中的 1 个受试者的过早中断。

[0411] CTLA4Ig 和安慰剂组就年龄、重量、性别分布和种族分布的人口统计学特征而言进行平衡。56 个随机化且治疗的受试者的平均年龄是 44.8 岁 (范围: 23-74 岁)。大多数受试者是白人 (85.7%) 和女性 (71.4%)。尽管 2 个治疗组中的大多数受试者在欧洲场所入组 (对于 CTLA4Ig 组 60.7%, 对于安慰剂组 75.0%), 但在 CTLA4Ig 组中更高百分比的受试者在南美场所入组 (17.9%, 与对于安慰剂组的 7.1% 比较)。

[0412] CTLA4Ig 和安慰剂组一般就基线疾病特征而言进行平衡。除 5 个外的所有受试者具有涉及至少 2 个关节的疾病; 每个治疗组中的 2 个受试者具有仅涉及 1 个关节的疾病, 并且 CTLA4Ig 组中的 1 个受试者在筛选或基线 (第 1 天) 时不具有滑膜炎。这个后面一个受试者入组是因为她满足 RA 的 3 个诊断标准 (ARA 1987 标准), 但由于这个相关的规程偏差排除在初级功效分析之外。其余受试者满足 1-3 个 RA 诊断标准, 其中大多数受试者 (58.9%) 满足 3 个标准。在所有受试者中, 炎性关节炎 (IA) 的平均持续时间是 7.9 个月, 并且在 CTLA4Ig 组中 (8.8 个月) 略微长于安慰剂组中 (7.1 个月)。平均 CRP 水平在 CTLA4Ig 和安慰剂组中是相似的 (分别 11.2mg/L 和 10.7rag/L), 在基线时具有侵蚀的射线照相术证据的受试者百分比也如此 (分别 53.5% 和 57.1%)。

[0413] 一般的医疗史发现与活动性炎性疾病一致, 并且对于 2 个组一般是相似的。2 个治疗组中的大多数受试者 (> 75%) 接受在第 1 天时的抗风湿药疗法 (CTLA4Ig 中 78.6%, 安慰剂 89.3%), 其中 NSAIDs 是最常用的抗风湿药物。

[0414] 十四 (14) 个受试者, 包括分配至 CTLA4Ig 组的 9 个和分配至安慰剂组的 5 个, 在第 1 天时接受经口或可注射皮质类固醇药物。对于分配至 CTLA4Ig 组的 4 个受试者 (14.3%) 和分配至安慰剂组的 2 个受试者 (7.1%), 在第 1 天时的伴随治疗由低经口皮质类固醇剂量 ( $\leq 10\text{mg/天}$  泼尼松等价物) 组成。

[0415] 暴露程度

[0416] 尽管在安慰剂组中来自研究药物治疗时间段的较高过早中断率, 但 CTLA4Ig 和安慰剂组中的大多数受试者 (分别 89.3% 和 75.0%) 接受 6 个月的治疗, 并且接受研究药物的预定 8 次输注 (分别 75.0% 和 71.4%)。CTLA4Ig 组中的一 (1) 个受试者 (3.6%) 和安慰剂组中的 5 个受试者 (17.9%) 接受研究药物的 3 次或更少输注。没有受试者接受研究药物的超过 8 次输注, 或具有超过 6 个月的研究治疗。

[0417] 所有治疗的分析群体中的大多数受试者在研究药物治疗时间段过程中未错过 CTLA4Ig (85.7%) 或安慰剂 (92.9%) 的预定输注, 并且在任一治疗组中没有受试者错过超过 1 次预定输注。

[0418] 就使用这些药物的受试者百分比 (每个组中  $n = 5$ , 17.9%) 和在这些时间点时的平均皮质类固醇剂量而言, 在研究药物治疗时间段过程中低剂量皮质类固醇的使用是低的, 并且在 ITT 分析群体中对于 CTLA4Ig 和安慰剂组是相似的。对于观察时间段同样如此, 其中 22 个在 CTLA4Ig 组中进入这个时间段的受试者中的 5 个, 以及安慰剂组中的 17 个受试者中的 7 个具有用低剂量皮质类固醇的治疗。

[0419] 用于意向治疗 (ITT) 分析群体的在研究药物治疗时间段过程中的高剂量皮质类固醇使用的过程数目对于 2 个组也是相似的:CTLA4Ig 组中 (在 2 个受试者中) 的 3 个过程和安慰剂组中 (在 4 个受试者中) 的 4 个过程。在研究药物治疗时间段过程中的高剂量皮质类固醇使用由肌肉 (IM) 或关节内 (IA) 皮质类固醇组成;任一组中没有受试者在研究药物治疗时间段过程中接受  $\geq 10\text{mg/天}$  的经口皮质类固醇剂量。

[0420] 在 18 个月观察时间段过程中,高剂量皮质类固醇的过程数目在 CTLA4Ig 组中是 9,并且在安慰剂组中是 6。对于每个治疗组中的 2 个受试者,高剂量皮质类固醇由经口剂量  $\geq 10\text{mg/天}$  组成。任一治疗组中没有受试者在研究药物治疗时间段或观察时间段过程中接受超过 2 个过程的高剂量皮质类固醇。

[0421] CTLA4Ig 组中的所有受试者和安慰剂组中的大多数受试者 (96.4%) 在研究药物观察时间段过程中接受至少 1 种伴随药物。镇痛药对乙酰氨基酚和双氯芬酸钠是最常用的伴随药物,各自由 CTLA4Ig 组中的 7 个 (25.0%) 受试者和安慰剂组中的 9 个 (32.1%) 受试者服用。

#### [0422] 功效结果

[0423] 这个研究的结果显示用 CTLA4Ig 的 6 个月治疗延缓具有 UA 的受试者中至确定性 RA 的进展。到第 12 个月时,与安慰剂组中具有 UA 的 24 个受试者中的 16 个 (66.7%) 相比较,在 CTLA4Ig 组中具有 UA 的 26 个受试者中的 12 个 (46.2%) 发展 RA。对于初级功效终点有利于 CTLA4Ig 的在 20.5% 治疗组差异周围的 95% CI 是 (-47.4, 7.8)。到第 24 个月时,与安慰剂组 (21/24, 87.5%) 相比较,在 CTLA4Ig 组中发展 RA 的具有 UA 的受试者比例 (17/23, 73.9%) 也更低,尽管治疗差异量级 (-13.6%; 95% CI: -37.6, 10.8) 小于在第 12 个月时可见的那种。

[0424] 与无基线侵蚀的亚组相比较,CTLA4Ig 在延缓至确定性 RA 的进展中的功效看起来在基线时具有侵蚀的射线照相术证据的受试者亚组中更显著。

[0425] 根据 1987ARA 标准,在起始研究药疗法 1 年内,与安慰剂组 (16/24, 66.7%) 相比较,发展 RA 的具有 UA 的受试者比例对于 CTLA4Ig 组 (12/26, 46.2%) 较低 (-20.5% 差异; 95% CI: -47.4, 7.8)。

[0426] 包括在功效 ITT 分析群体中包括的 55 个随机化且治疗的受试者的每一个的初级功效终点的预先指定的 (prespecified) 灵敏度分析提供了有利于 CTLA4Ig 的相似结果。在灵敏度分析中,与对于安慰剂组的 59.3% (16/27 个受试者) 相比较,在起始研究药疗法 1 年内发展 RA 的具有 UA 的受试者比例对于 CTLA4Ig 组 (12/28 个受试者) 是 42.9% (-16.4% 治疗组差异, 95% CI: -42.3, 11.0)。

[0427] 到第 24 个月时,与分配至安慰剂治疗的受试者 (21/24, 87.5%) 相比较,随机分配至 6 个月 CTLA4Ig 治疗的具有 UA 的更少受试者 (17/23, 73.9%) 发展使用 1987ARA 标准定义的 RA。在第 24 个月时在发展 RA 中的治疗组差异是 -13.6% (95% CI: -37.6, 10.8)。尽管研究治疗在第 6 个月未施用,但受试者和研究人员对已施用的研究治疗的特性仍不知情直至 18 个月观察时间段结束 (第 24 个月)。

[0428] 基于足和手的射线照片,研究显示在第 12 个月时与安慰剂组相比较,在 CTLA4Ig 组中较少的结构进展,如通过侵蚀和 JSN 得分中较小的平均改变反映的。此外,21 个受试者亚群中腕和手的钆增强的 MR 图像指出在研究药物治疗时间段结束时在 CTLA4Ig 组中关于

疾病进展的最低限度证据,而在安慰剂组中在 MRI 侵蚀、水肿和滑膜炎得分中在第 6 个月时距离基线的平均改变指示疾病恶化。MRI 得分中的治疗组差异在研究治疗已结束后持续 6 个月。

[0429] 在筛选或第 1 天时间点需要滑膜炎的存在以入组在研究中。与安慰剂 (12/12, 100%) 相比较,在第 6 个月时具有持续有症状临床滑膜炎的具有 UA 的受试者比例在用 CTLA4Ig 治疗的受试者 (4/5, 80%) 中更少。在研究组之间在具有持续有症状临床滑膜炎的受试者比例中的差异是 -20.0% (95% CI: -71.5, 15.21)。在第 12 个月时,具有持续临床滑膜炎的受试者比例是对于 CTLA4Ig 组 11 个受试者中的 10 个,并且对于安慰剂组 7 个受试者中的 7 个。

[0430] CTLA4Ig 组中的总共 11 个受试者和安慰剂组中的 10 个具有手和腕的钆增强的 MRI 评估;通过规程设计, MRI 仅对于在欧洲研究场所入组的受试者执行。在研究药物治疗时间段结束时 (第 6 个月),手和腕的 MRI 骨侵蚀和滑膜炎得分中距离基线的平均改变指示 CTLA4Ig 组中最低限度的疾病进展 (平均改变分别为 0.45 和 0.27),而改变在安慰剂组中更大且指示疾病恶化 (平均改变分别为 1.20 和 1.60)。在第 6 个月时在 MRI 水肿得分中距离基线的平均改变指示用 CTLA4Ig 的改善 (平均改变 -1.64),但用安慰剂恶化 (平均改变 1.40)。

[0431] 在第 12 个月时可见就 MRI 得分而言的相似结果模式,其中在 CTLA4Ig 和安慰剂组中分别地 9 和 6 个受试者具有在基线时和在研究中 1 年后执行的 MRI。在第 12 个月时,相对于在 CTLA4Ig 组中的基线值,可见 MRI 骨侵蚀、水肿和滑膜炎得分中的小改变 (平均改变分别为 0.0、0.22 和 0.22),而持续疾病进展在安慰剂组中是明显的 (平均改变分别为 5.00、6.67 和 2.33)。

[0432] 仅 7 个受试者 (5 个 CTLA4Ig, 2 个安慰剂) 具有在基线和第 24 个月时的 MRI 评估。在未进展至 RA 且因此保留在这个研究中的欧洲受试者的这个小亚群中,平均基线 MRI 得分小 (一般 < 1.0),并且显示在第 24 个月时的小改变。

[0433] 在研究药物治疗时间段结束时 (第 6 个月),相对于基线,在 CTLA4Ig 组中具有 UA 的受试者具有疾病活动性 (DAS 28[CRP] 得分) 中的减少以及躯体功能 (HAQ-DI 得分) 和健康相关的生活质量 (SF-36 的 PCS 和 MCS 得分) 中的改善,而关于这些功效变量的平均得分在安慰剂组中未改变。在未治疗的观察时间段的第 12 和 24 个月时,治疗组差异较小。

[0434] 在研究药物治疗时间段结束时,相对于 CTLA4Ig 组中的基线,如使用 DAS 28(CRP) 得分评估的疾病活动性减少 (平均改变, -1.13),但在安慰剂组中未改变 (平均改变, 0.01)。在第 6 个月时,与安慰剂组中具有基线和第 6 个月得分的 20 个受试者中的 4 个 (20%) 相比较,在 CTLA4Ig 组中具有基线和第 6 个月得分的 20 个受试者中的 8 个 (40%) 中观察到临床上显著改善 (在 DAS 28 得分中距离基线减少至少 1.2 的值)。与这些发现一致,与安慰剂组 (分别 45.0% 和 35.0%) 相比较,在 CTLA4Ig 组 (分别 81.0% 和 71.4%) 中在第 6 个月时可见更高比率的低疾病活动性 (DAS 28 得分  $\leq$  3.2) 或疾病减轻 (DAS 28 得分 < 2.6)。

[0435] 与安慰剂组相比较,对于 CTLA4Ig 组,在第 12 和 24 个月时的 DAS 28(CRP) 数据评估继续显示疾病活动性中的更大改善,但治疗组差异在未治疗观察时间段过程中更小。在具有基线和第 12 个月 DAS 28 得分的 CTLA4Ig 组中的 18 个受试者中,平均改变得分在第 12

个月时是 -0.50, 并且约三分之二 (68.4%) 的受试者具有低疾病活动性。在 2 个时间点上具有 DAS 28 数据的安慰剂组中的 13 个受试者中, 与基线相比较在第 12 个月时在疾病活动性中基本上无改变 (平均改变, -0.05), 并且 53.9% 受试者具有低疾病活动性。在第 24 个月时具有 DAS 28 得分的 11 个受试者中, 在 7 个 CTLA4Ig 受试者的 4 个和 4 个安慰剂受试者的 2 个中可见疾病减轻。

[0436] 在研究药物治疗时间段过程中, 如通过距离基线的更大平均改变和具有改善的受试者百分比反映的, 与安慰剂组相比较, 疾病活动性中的更大改善对于 CTLA4Ig 组早在第 29 天时就很明显。

[0437] 在第 6、12 和 24 个月时, 在躯体功能中具有临床上有意义改善 (定义为在 HAQ-DI 得分中距离基线  $\geq 0.3$  减少) 的受试者比例对于 CTLA4Ig 组比安慰剂组更大。在研究药物治疗时间段结束时, 与安慰剂组中 24.0% 的那些相比较, 在 CTLA4Ig 组中 61.5% 的随机化且治疗的受试者具有 HAQ-DI 中的临床上有意义改善 (37.5% 的治疗组差异 [95% CI :9.9, 61.4])。在未治疗的随访的 6 和 12 个月后具有临床上有意义改善的 CTLA4Ig 组中的受试者比例 (在第 12 个月时 36.0% 和在第 24 个月时 14.3%) 小于在 6 个月治疗后可见的那种, 然而, 在数字上仍大于在第 12 和 24 个月时在安慰剂组中具有临床上有意义改善的比例 (分别为 12.0% 和 4.2%)。

[0438] 在第 6、12 和 24 个月时, 与安慰剂组相比较, 对于 CTLA4Ig 组观察到 SF-36 的躯体和心理组分概括测量中距离基线的更大平均改善。在研究药物治疗时间段结束时 (第 6 个月), 在 CTLA4Ig 组中, 距离基线的平均改善对于 PCS 得分是 10.23, 并且对于 MCS 得分是 2.54。在安慰剂组中, 在第 6 个月时, 在躯体组分概括 (PCS) 和心理组分概括 (MCS) 得分中的平均改变是小的 (分别为 1.95 和 -0.30)。

[0439] 在未治疗观察时间段过程中保留在研究中的 CTLA4Ig 组中的受试者中, 在第 12 和 24 个月时的平均改善对于 PCS 得分分别是 3.83 和 2.46, 并且对于 MCS 得分分别是 2.50 和 3.75。在安慰剂组中, PCS 和 MCS 得分在 18 个月未治疗观察时间段过程中恶化, 如通过对于这些终点在第 12 和 24 个月时距离基线值的平均阴性平均改变反映的。

[0440] 基线射线照相术得分指示在随机化受试者中最低限度的骨侵蚀或关节间隙变窄, 与受试者在研究进入时不具有 RA 诊断的研究合格标准一致。在 6 个月研究药物治疗时间段过程中, 相对于基线存在射线照相术侵蚀、JSN 或总得分中的小改变, 如通过在第 6 个月时关于所有 3 个终点在 CTLA4Ig 中  $\leq 0.13$  和在安慰剂组中  $\leq 0.47$  的平均改变得分反映的。在第 12 个月时, 与安慰剂组相比较, 在 CTLA4Ig 组中存在更少结构进展的暗示, 其中总得分中的平均改变在 CTLA4Ig 组中是 0.02, 并且在安慰剂组中是 1.11。

[0441] 在研究药物治疗时间段结束后 6 和 12 个月后 (即在第 12 和 24 个月时), 与安慰剂组 (1.21 和 2.13) 相比较, 在 CTLA4Ig 组 (总得分中 0.29 和 0.02 的平均改变) 中, 归因于射线照相术侵蚀和 JSN 得分分析的结果显示更小的平均改变, 指示更少的结构进展。

[0442] 在 CTLA4Ig 组中的受试者显示在研究药物治疗时间段过程中在个别 ACR 组分中的平均百分比改善。在第 6 个月时, 在压痛关节、肿胀关节和受试者评价的疼痛的评价中的平均百分比改善分别是 64.91%、57.34% 和 70.03%。比较起来, 在安慰剂组中的受试者显示在研究药物治疗时间段过程中在 ACR 个别核心组分中的恶化, 其中在压痛关节、肿胀关节和受试者评价的疼痛的评价中的平均百分比改善分别为 -63.3%、-10.5% 和 -83.4%。

[0443] 一旦在保留在研究中的受试者中停止研究治疗,就不维持在研究药物治疗时间段过程中,对于 CTLA4Ig 组可见的在 ACR 核心组分中的平均百分比改善。

[0444] 对于基于在研究进入时侵蚀的存在或不存在(即随机化分级)限定的亚组,分别检查初级和相关次级功效终点,以及人口统计学和基线疾病特征。

[0445] 人口统计学特征在基线时具有侵蚀的射线照相术证据的 31 个受试者的亚群中和在基线时不具有侵蚀的射线照相术证据的 25 个受试者的亚群中是相似的。基线疾病特征对于这 2 个亚组也是相似的,除了平均和中值射线照相术侵蚀得分对于具有基线侵蚀的亚组高于不具有基线侵蚀的亚组。

[0446] 在基线时具有侵蚀的射线照相术证据的受试者亚组中,在起始研究药疗法 1 年内,发展根据 1987 ARA 标准的 RA 的具有 UA 的受试者比例对于 CTLA4Ig 组 (4/13, 30.8%) 低于安慰剂组 (9/14, 64.3%)。在基线时不具有侵蚀的射线照相术证据的受试者亚组中,在 CTLA4Ig 组中 61.5% 的受试者 (8/13) 和在安慰剂组中 70.0% 的受试者 (7/10) 到第 12 个月时发展 RA。

[0447] 仅在基线时具有侵蚀的射线照相术证据的受试者中,到第 24 个月时发展 RA 的具有 UA 的受试者比例对于 CTLA4Ig 组低于安慰剂组(对于 CTLA4Ig, 50.0% [6/12 个受试者];对于安慰剂, 85.7% [12/14 个受试者])。在基线时不具有侵蚀的射线照相术证据的受试者亚组中,在 CTLA4Ig 组中 100% 的受试者 (11/11) 和在安慰剂组中 90% 的受试者 (9/10) 到第 24 个月时已发展 RA。

#### [0448] 安全

[0449] 以 10mg/kg 的重量分级剂量每月 IV 施用一次进行最高达 6 个月的 CTLA4Ig,在具有 UA 的成年人治疗中一般是良好耐受的。在研究过程中未报告死亡。在研究药物治疗时间段过程中,对于 CTLA4Ig 组中的 1 个受试者(基底细胞癌)和安慰剂组中的 1 个受试者(坐骨神经痛)报告了 SAEs。2 个 SAEs 都通过研究人员评估为与研究治疗无关。CTLA4Ig 和安慰剂组中各一(1)个受试者在研究药物治疗时间段过程中由于 AE 而中断治疗。对于在每个治疗组中的 1 个受试者报告了急性输注 AEs(在起始研究药物输注 1 小时内报告);在 CTLA4Ig 组中的急性输注 AE(呼吸困难)在第一次输注过程中发生,并且导致治疗中断。在研究药物治疗时间段过程中在 CTLA4Ig(35.7%)和安慰剂(39.3%)组中以相似受试者百分比报告了感染或侵染。在 CTLA4Ig 组中报告的感染无一在强度中是重度的。在研究药物治疗时间段过程中,报告了 CTLA4Ig(64.3%)和安慰剂(71.4%)组中相似百分比的受试者的 AEs。CTLA4Ig 组中的所有 AEs 在强度中都是轻度或中度的。根据实验室或生命体征数据评估未出现安全问题。

[0450] 总之,在研究药物治疗时间段过程中或在研究药疗法的最后一次输注的 56 天内,对于用 CTLA4Ig 治疗的 18 个(64.3%)受试者和用安慰剂治疗的 20 个(71.4%)受试者报告了 AEs。不利事件频率对于 CTLA4Ig 和安慰剂组一般是相似的。由系统器官类别(system organ class)(SOC)划分的最频繁报告的 AEs 是感染和侵染(35.7% CTLA4Ig ;39.3% 安慰剂),胃肠道(21.4% CTLA4Ig ;25.0% 安慰剂),以及呼吸、胸和纵隔病症(17.9% CTLA4Ig ;21.4% 安慰剂)。在研究治疗时间段过程中由任一治疗组中至少 10% 受试者报告的不利事件是腹泻(14.3% CTLA4Ig ;10.7% 安慰剂)、头痛(10.7% CTLA4Ig ;7.1% 安慰剂)、鼻咽炎(10.7% CTLA4Ig ;7.1% 安慰剂)、泌尿道感染(7.1% CTLA4Ig ;10.7% 安慰剂)、咽喉疼痛

(3.6% CTLA4Ig ;14.3%安慰剂)和胃肠炎(0% CTLA4Ig ;10.7%安慰剂)。在研究治疗时间段过程中在任一治疗组中未报告自身免疫病症。

[0451] 在安慰剂组中具有严重强度 AEs 的受试者比例是 10.7% (坐骨神经痛、病毒感染、咽水肿的单一重度 AEs)。在 CTLA4Ig 组中没有受试者在研究药物治疗时间段过程中具有根据研究人员在强度中视为重度或极重度的 AE。

[0452] 在研究药物治疗时间段过程中,相关 AEs 的频率对于 CTLA4Ig 组是 50% ( $n = 14$ ),并且对于安慰剂组是 35.7% ( $n = 10$ )。最常见的个别相关 AE 是头痛,对于 CTLA4Ig 组中的 3 个受试者 (10.7%) 和安慰剂组中的 2 个受试者 (7.1%) 报告。湿疹是由  $> 1$  个 CTLA4Ig 治疗受试者报告的唯一其他相关 AE,并且对于 2 个受试者报告 (7.1%)。

[0453] 临床实验室数据一般是不显著的,并且在具有 UA 的这个群体中未鉴定出安全问题。

[0454] 在研究药物治疗时间段过程中,满足发起人定义的显著异常 (MA) 标准的血液学和血液化学参数频率在 CTLA4Ig 和安慰剂组中很小且相似。对于每个血液学和血液化学参数,对于任一治疗组中的 2 个或更少个受试者鉴定出 MAs。

[0455] 在研究药物治疗时间段和观察时间段过程中注意到在血液学和血液化学参数中距离基线 (第 1 天) 的小改变,并且这些改变显示跨越 2 个组相当大的变异并且没有一致模式。

[0456] 此外,在整个研究时间段过程中,血液嗜中性粒细胞、ALT 和 AST 水平在用 CTLA4Ig 治疗后保持稳定。任一治疗组中的受试者在任何测量时间点都不具有  $> 3 \times \text{ULN}$  (正常上限) 的 ALT 或 AST 值,或  $< 0.5 \times 10^9$  细胞 /L 或  $> 15 \times 10^9$  细胞 /L 的嗜中性粒细胞计数值。

[0457] 在研究药物治疗时间段过程中,2 个受试者具有报告为 AE 的实验室异常。增加的肝酶在 CTLA4Ig 组中在第 141 天时受试者中报告为 AE,并且在消退前持续 120 天。这个受试者中的肝酶值无一满足 MA 标准。血小板减少症在安慰剂组中的 1 个受试者中报告为 AE,并且导致中断研究治疗。关于这个受试者的血小板计数值在基线时是  $284 \times 10^9/\text{c/L}$ ,并且在研究过程中稳定下降,并且在第 169 天时是  $86 \times 10^9/\text{c/L}$ ,并且在第 319 天时最后一次记录值是  $22 \times 10^9/\text{c/L}$ 。

[0458] 在研究药物治疗时间段自始至终,在 CTLA4Ig 和安慰剂组中关于所有生命体征参数的平均值保持稳定。

[0459] 2 个治疗组中的大多数受试者在基线时和在研究药物治疗时间段结束时再次具有正常 ECG。其 ECG 在基线时正常但在第 169 天时 (或在早期终止时) 异常的受试者比例对于 CTLA4Ig (1/24, 4.2%) 和安慰剂 (2/23, 8.7%) 组是相似的。

[0460] 药物动力学结果

[0461] 用 CTLA4Ig 的治疗与在 IL-6 ( $-4.49 \text{ pg/mL}$ )、TFN- $\alpha$  ( $-1.70 \text{ pg/mL}$ )、IL-1 $\beta$  ( $-0.12 \text{ pg/mL}$ ) 和 MMP-3 ( $-2.29 \text{ ng/mL}$ ) 中在第 6 个月时距离基线的平均减少相关。比较起来,对于 IL-6 ( $1.08 \text{ pg/mL}$ )、TFN- $\alpha$  ( $0.07 \text{ pg/mL}$ )、IL-1 $\beta$  ( $-0.09 \text{ pg/mL}$ ) 和 MMP-3 ( $14.34 \text{ ng/mL}$ ),在第 6 个月时在安慰剂组中可见相对于基线小的平均增加或无改变。

[0462] 无研究治疗的 6 个月后,与安慰剂组相比较,对于这些细胞因子中的大多数,CTLA4Ig 组仍具有较大的平均下降。在第 12 个月时,对于 CTLA4Ig 和安慰剂组距离基线的平均改变对于 IL-6 分别是  $-0.14$  和  $6.37 \text{ pg/mL}$ ;对于 TFN- $\alpha$  分别是  $-0.50$  和  $-0.10 \text{ pg/mL}$ ;

并且对于 MMP-3 分别是 -2.55 和 25.34ng/mL。在第 12 个月时,对于 IL-1 $\beta$  在距离基线的平均改变中在 2 个组之间未看出差异 (-0.09 和 -0.24pg/mL);然而,具有基线和第 12 个月数据的受试者数目小(在安慰剂组中 n = 7,并且在 CTLA4Ig 组中 n = 13)。

[0463] 仅在 CTLA4Ig 组中的 5 个受试者和在安慰剂组中的 3 个具有基线和第 24 个月细胞因子数据。IL-6 和 TFN- $\alpha$  中的平均减少在未发展 RA 的 CTLA4Ig 治疗的受试者的这个小亚群中仍是明显的(分别为 -3.44pg/mL 和 -0.82pg/mL)。

[0464] 在第 1 天时所有受试者对于抗 CCP2 抗体是阳性的,与研究合格标准一致。在安慰剂组中,具有可评估数据的所有受试者在第 6、12 和 24 个月时保持阳性。比较起来,对于抗 CCP2 抗体阳性的具有 UA 的受试者百分比在 CTLA4Ig 组中在第 6 个月时下降至 90.9% (20/22 个受试者),在第 12 个月时下降至 86.7% (13/15 个受试者),并且在第 24 个月时下降至 83.3% (5/6 个受试者)。

[0465] 这些数据与关于抗 CCP2 抗体血清水平的结果一致。在 CTLA4Ig 组中,在第 6 个月时 (-94.5U/L) 和在第 12 个月时 (-6.46U/L) 可见抗 CCP2 抗体距离基线的平均减少。在安慰剂组中,在第 6 个月时(平均改变,16.32U/L) 和在第 12 个月时 (149.5U/L),相对于基线值,抗 CCP2 抗体水平增加。仅 CTLA4Ig 组中的 6 个受试者和安慰剂组中的 3 个具有基线和第 24 个月抗 CCP2 数据。这些 CTLA4Ig 受试者中的一 (1) 个对于抗 CCP2 抗体是阴性的。

[0466] 在基线(第 1 天)时,CTLA4Ig 组中 85.7% 的受试者和安慰剂组中 71.4% 的受试者是 RF 阳性的。在 CTLA4Ig 组中,这个百分比在研究药物治疗时间段结束时(第 6 个月)下降至 59.1%。在未治疗的随访的 6 和 18 个月后,保留在研究中的 RF 阳性的受试者比例在第 12 个月时是 15 个中的 11 个 (73.3%),和在第 24 个月时 6 个中的 3 个 (50.0%)。比较起来,在安慰剂组中 RF 阳性的受试者比例随着 24 个月研究增加(在第 6 个月时 20 个中的 14 个 [70.0%] 到在第 24 个月时 3 个中的 3 个 [100%])。

[0467] 在第 6、12 或 24 个月时,在 CTLA4Ig 组中的受试者不具有阳性 RF 血清转变。在安慰剂组中,在基线时 RF 阴性的 7 个评估受试者中的 2 个在第 6 个月时是阳性的,并且在基线时 RF 阴性的 2 个可评估受试者中的 1 个在第 12 个月时是阳性的。

[0468] 在基线(第 1 天)时,从其中检测出共享表位等位基因 HLA-DRB10401、HLA-DRB10404 和 HLA-DRB10101 的受试者百分比对于 CTLA4Ig (46.4% [13/28]) 和安慰剂 (39.3% [11/28]) 组是相似的。

[0469] 免疫原性

[0470] 免疫原性数据对于 CTLA4Ig 组中 28 个随机化且治疗的受试者中的总共 23 个可获得。在 24 个月研究时间段过程中在任何时间没有受试者对于抗 CTLA4Ig 抗体(对于分子的 IgG 部分特异)是血清反应阳性的。

[0471] 23 个受试者中的四 (4) 个 (17.4%) 在抗 CTLA4-T 测定 (Tip) 中是血清反应阳性的。在这 4 个受试者中,抗 CTLA4-T 抗体在最后一次给药后 3 个月时(第 9 个月样品)未检测出,但在最后一次给药后 6 个月(第 12 个月样品)检测出。这些受试者中的效价是低的(范围:65-98;测定灵敏度是 25)。在这 4 个样品中,2 个包含中和抗体并且 2 个不包含。

[0472] 阳性抗体血清转变应答的存在看起来不影响安全。在受试者中或在受试者中暂时接近于阳性血清转变应答中未报告 AEs。在 1 个受试者中,报告了腱鞘炎,其在第 384 天时发作,在研究药物 (CTLA4Ig) 最后一次给药后约 6 个月时且接近阳性血清转变应答时间。这



个 AE 评估为与研究治疗不太可能相关并且在强度中是中等的,并且报告为持续。

**[0473] 总结论**

**[0474]** 关于这个研究中的初级和相关关键次级功效终点的结果暗示以 10mg/kg IV 的重量分级剂量作为单一疗法施用 6 个月的 CTLA4Ig,延缓具有 UA 的受试者中至确定性 RA 的进展,并且在药物停止后 6 和 18 个月观察到 CTLA4Ig 的疾病减轻作用。在具有 UA 的受试者中,与用安慰剂相比较,在用 CTLA4Ig 治疗 6 个月后可见躯体功能、医生报告的疾病活动性和健康相关的生活质量中更大的改善。手和足的射线照相术评估指出在接受 CTLA4Ig 的受试者中在研究药物治疗时间段过程中最低限度的疾病进展;在 CTLA4Ig 组中在药物停止后 6 个月结构性伤害的进展小于安慰剂组中。腕和手的 MRI 评估更有限但显示相似的趋势。与安慰剂相比较,用 CTLA4Ig 的治疗与抗 CCP2 抗体血清水平中的更大减少,和对于抗 CCP2 抗体和 RF 阳性的受试者百分比中的下降相关。以 10mg/kg 的重量分级剂量每月 IV 施用一次进行 6 个月的 CTLA4Ig,由具有 UA 的受试者良好耐受。免疫原性比率(药物诱导的阳性血清转变)是低的,并且针对 CTLA4Ig 或 CTLA4-T 的抗体的存在与这个探索性研究中的任何临床安全发现无关。

[0001]

## 序列表

<110> Bristol-Myers Squibb Company  
Vratsanos, George

<120> 预防具有未分化关节炎的受试者中类风湿性关节炎发展的方法

<130> 11268 NP

<150> 61/050, 336

<151> 2008-05-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1223

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1159)

<400> 1

agcttcacca atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg 49  
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu  
1 5 10

gtc ctt gca ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg 97  
Val Leu Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val  
15 20 25

gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt 145  
Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe  
30 35 40 45

gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc egg gtg aca 193  
Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr  
50 55 60

gtg ctt egg cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc 241  
Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr  
65 70 75

tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg 289  
Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr  
80 85 90

ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg 337  
Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg  
95 100 105

gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca 385  
Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro  
110 115 120 125

[0002]

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att<br>Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile<br>130 135 140     | 433  |
| gat cca gaa ccg tgc cca gat tet gat cag gag ccc aaa tet tet gac<br>Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp<br>145 150 155     | 481  |
| aaa act cac aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga<br>Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly<br>160 165 170     | 529  |
| tgc tea gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc<br>Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile<br>175 180 185     | 577  |
| tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa<br>Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu<br>190 195 200 205 | 625  |
| gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat<br>Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His<br>210 215 220     | 673  |
| aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt<br>Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg<br>225 230 235     | 721  |
| gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag<br>Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys<br>240 245 250     | 769  |
| gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag<br>Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu<br>255 260 265     | 817  |
| aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac<br>Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr<br>270 275 280 285 | 865  |
| acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg<br>Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu<br>290 295 300     | 913  |
| acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg<br>Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp<br>305 310 315     | 961  |
| gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg<br>Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val<br>320 325 330     | 1009 |
| ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac<br>Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp<br>335 340 345     | 1057 |
| aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat                                                                                       | 1105 |

[0003]

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 350 355 360 365  
 gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1153  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 370 375 380  
 ggt aaa tgagtgcgac ggccggcaag ccccgctccc cgggctctcg cggtcgcacg 1209  
 Gly Lys  
 aggatgcttc taga 1223  
 <210> 2  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <400> 2  
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro  
 20 25 30  
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg  
 50 55 60  
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met  
 65 70 75 80  
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser  
 85 90 95  
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp  
 100 105 110  
 Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140  
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His

[0004]

| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val | 165 | 170 | 175 |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr | 180 | 185 | 190 |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu | 195 | 200 | 205 |
| Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys | 210 | 215 | 220 |
| Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser | 225 | 230 | 235 |
| Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys | 245 | 250 | 255 |
| Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile | 260 | 265 | 270 |
| Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro | 275 | 280 | 285 |
| Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu | 290 | 295 | 300 |
| Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn | 305 | 310 | 315 |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser | 325 | 330 | 335 |
| Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg | 340 | 345 | 350 |
| Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu | 355 | 360 | 365 |
| His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys     | 370 | 375 | 380 |

图 1

```

587  CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
      P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  H  E

626  GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
      D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V

665  GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
      E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q

704  TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
      Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V

743  CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
      L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C

782  AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA
      K  V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K

821  ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
      T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q
                        |
                        |  人IgG1 CH3结构域 →
                        |
860  GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
      V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K

899  AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
      N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y

938  CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
      P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q

977  CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
      P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D

1016 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
      S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V

1055 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
      D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C

1094 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
      S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q

1133 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTGCGACG
      K  S  L  S  L  S  P  G  K  -

1172 GCCGGCAAGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTTCGCAC GAGGATGCTT
1222 CTAGA

```

图1(续)

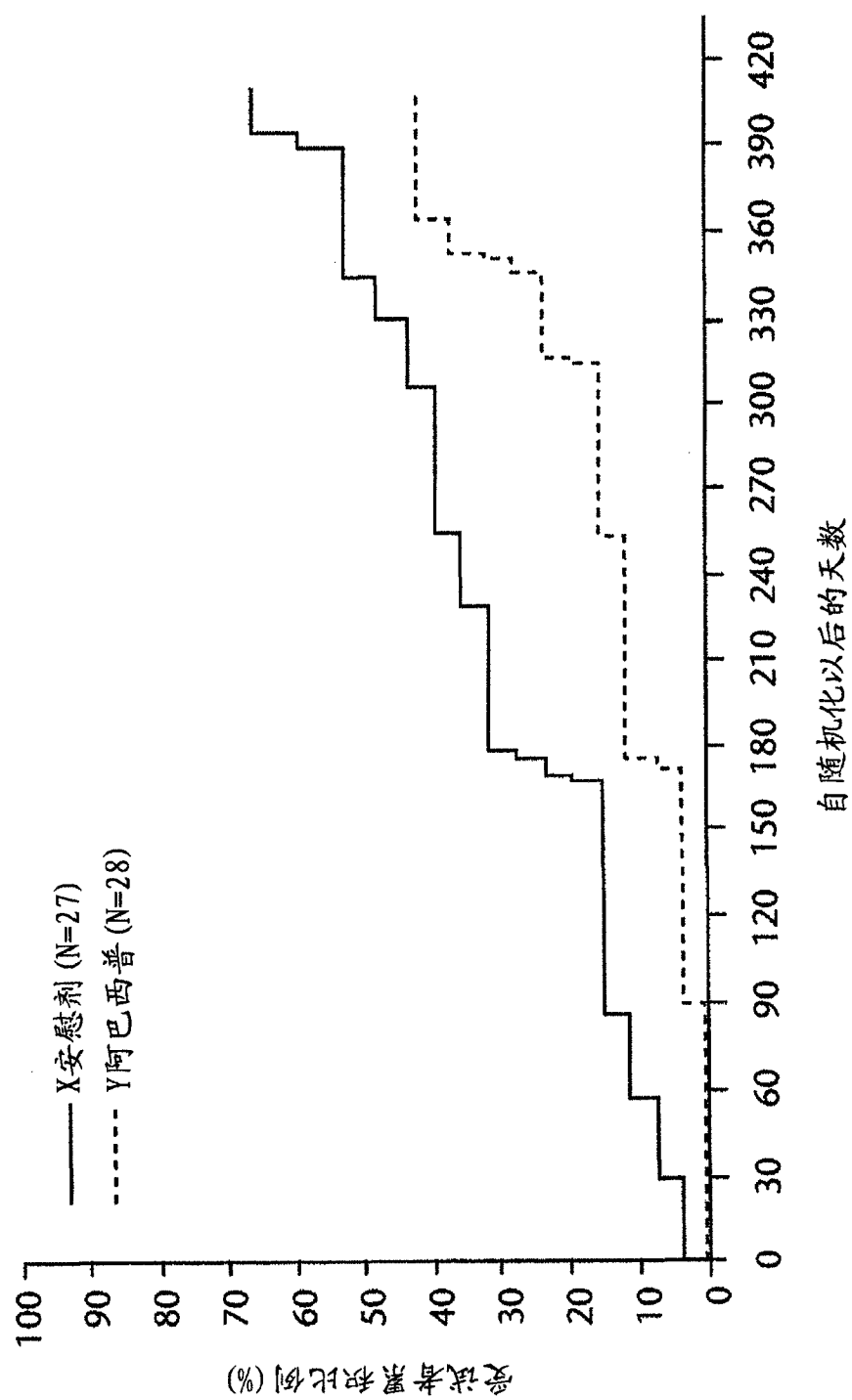


图 2