



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110418652 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201780085900.2

(22)申请日 2017.11.16

(30)优先权数据

62/455651 2017.02.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/061953 2017.11.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/147915 EN 2018.08.16

(71)申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 D.D.哈里森 E.C.夏 L-L.金

K.H.卢

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书92页

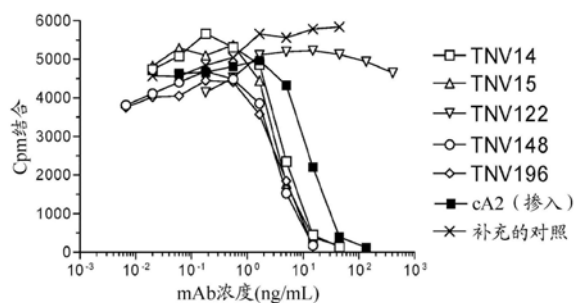
序列表19页 附图17页

(54)发明名称

用于治疗活动性强直性脊柱炎的抗TNF抗体、组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及利用具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)的抗TNF抗体的组合物和方法,用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎(AS)。



1. 一种组合物, 包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂, 所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC), 所述组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎, 其中所述组合物经由IV输注施用, 并且其中用所述组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

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

3. 根据权利要求1至2所述的组合物, 还包括在有或没有甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)的情况下施用所述组合物。

4. 一种组合物, 包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂, 所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC), 所述组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎, 其中所述组合物经由IV输注施用, 并且其中在治疗的第16周时, 用所述抗TNF抗体治疗的患者在选自以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36MCS = 6.5 ± 9.1 SD和ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD。

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

6. 根据权利要求4至5所述的组合物, 还包括在有或没有甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)的情况下施用所述组合物。

7. 至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体, 所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC), 用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎, 其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用, 并且其中 $\geq 65\%$ 的接受所述治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS 20。

8. 根据权利要求7所述的抗TNF抗体, 其中在治疗的第16周时达到ASAS 20的所述 $\geq 65\%$ 的患者治疗差异(与安慰剂相比改善) $\geq 45\%$ 。

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

10. 根据权利要求7至8所述的抗TNF抗体, 其中所述抗体在有或没有甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)的情况下施用。

用于治疗活动性强直性脊柱炎的抗TNF抗体、组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)的抗TNF抗体的组合物和方法,用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎(AS)。

背景技术

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

发明内容

[0014] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中用抗TNF抗体治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0015] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体通过静脉(IV)输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后的每8周(q8w)时在 30 ± 10 分钟内施用,并且其中用抗TNF抗体治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0016] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗体与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中用抗TNF抗体治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0017] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物经由IV施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0018] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)

时在30分钟±10分钟内施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0019] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且其中所述组合物经由IV施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0020] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0021] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30±10分钟内施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0022] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30±10分钟内施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)。

[0023] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中用该组合物治疗的患者在治疗4周或治疗2周时实现ASDAS无活动性疾病(<1.3),该方法还包括在所述(a)施用之前、同时或之后施用包含有效量的选自以下中的至少一者的至少一种化合物或蛋白质的至少一种组合物:可检测标签或报告基因、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉药、非类固醇抗炎药(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗菌剂、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、促红细胞生成素、免疫、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药、β激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0024] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活

动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:巴斯强直性脊柱炎功能指数(BASFI) = -2.4 ± 2.1 标准差(SD),巴斯强直性脊柱炎计量指数(BASMI) = -0.4 ± 0.6 SD,36项短期健康调查生理成分汇总(SF-36PCS) = 8.5 ± 7.5 SD,36项短期健康调查心理成分汇总(SF-36MCS) = 6.5 ± 9.1 SD和强直性脊柱炎生活质量(ASQoL) = -5.4 ± 5.0 SD。

[0025] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后的每8周(q8w)时在 30 ± 10 分钟内施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自由以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36MCS = 6.5 ± 9.1 SD和ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD。

[0026] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且经由静脉内(IV)输注以2mg/kg的剂量施用抗TNF抗体,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自由以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36MCS = 6.5 ± 9.1 SD和ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD。

[0027] 本发明提供了包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自由以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36MCS = 6.5 ± 9.1 SD和ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD。

[0028] 本发明提供了包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在 30 ± 10 分钟内施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自由以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36MCS = 6.5 ± 9.1 SD和ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD。

[0029] 本发明提供了包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述组合物与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且该组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自由以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = $-0.4 \pm$

0.6SD, SF-36PCS=8.5±7.5SD, SF-36MCS=6.5±9.1SD和ASQoL=-5.4±5.0SD。

[0030] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物通过IV输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化: BASFI=-2.4±2.1SD, BASMI=-0.4±0.6SD, SF-36PCS=8.5±7.5SD, SF-36MCS=6.5±9.1SD和ASQoL=-5.4±5.0SD。

[0031] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物通过IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30±10分钟内施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化: BASFI=-2.4±2.1SD, BASMI=-0.4±0.6SD, SF-36PCS=8.5±7.5SD, SF-36MCS=6.5±9.1SD和ASQoL=-5.4±5.0SD。

[0032] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且其中该组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化: BASFI=-2.4±2.1SD, BASMI=-0.4±0.6SD, SF-36PCS=8.5±7.5SD, SF-36MCS=6.5±9.1SD和ASQoL=-5.4±5.0SD。

[0033] 本发明提供了用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性强直性脊柱炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物通过IV输注施用,并且其中在治疗的第16周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下项构成的组的一个或多个标准中实现自基线的平均变化: BASFI=-2.4±2.1SD, BASMI=-0.4±0.6SD, SF-36PCS=8.5±7.5SD, SF-36MCS=6.5±9.1SD和ASQoL=-5.4±5.0SD,该方法还包括在所述(a)施用之前、同时或之后施用包含有效量的选自以下中的至少一者的至少一种化合物或蛋白质的至少一种组合物:可检测标签或报告基因、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉药、非类固醇抗炎药(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗菌剂、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、促红细胞生成素、免疫、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药、β激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0034] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗或预防活动性强直性脊柱炎,其中将所述抗TNF抗体施用至患者并诱导选自下表中的响应的临床响应:

[0035]	第 16 周的疗效		
		安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg
	随机患者, n	103	105
	临床疗效		
	ASAS20, n (%)	27 (26.2%)	77 (73.3%)**
	ASAS40, n (%)	9 (8.7%)	50 (47.6%)**
	BASDAI 50, n (%)	15 (14.6%)	43 (41.0%)**
	ASAS 部分消退, n (%)	4 (3.9%)	17 (16.2%)*
* p < 0.01; **p ≤ 0.001 ASAS20/40, 强直性脊柱炎(ASAS)国际工作组标准的评估改善 ≥20%/40%; BASDAI, 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数			

[0036] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS20。

[0037] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS20,治疗差异(与安慰剂相比改善)≥45%。

[0038] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30±10分钟内施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS20。

[0039] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),用于安全且有效地治疗活动性强直性脊柱炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注,与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)一起施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS20。

[0040] 本发明提供了治疗TNF相关病症的方法,其中TNF相关病症是活动性强直性脊柱炎,该方法包括:

[0041] (a)施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中≥65%接受治疗的患者在治疗的第16周时达到ASAS20。

[0042] 本发明提供了治疗TNF相关病症的方法,其中TNF相关病症是活动性强直性脊柱炎,该方法包括:

[0043] (a)施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第16周时实现ASAS20,治疗差

异(与安慰剂相比改善) $\geq 45\%$ 。

[0044] 本发明提供了治疗TNF相关病症的方法,其中TNF相关病症是活动性强直性脊柱炎,该方法包括:

[0045] (a)施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在 30 ± 10 分钟内施用,并且其中 $\geq 65\%$ 接受治疗的患者在治疗的第16周时达到ASAS 20。

[0046] 本发明提供了治疗TNF相关病症的方法,其中TNF相关病症是活动性强直性脊柱炎,该方法包括:

[0047] (a)施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物与或不与甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺胺吡啶(SSZ)或羟氯喹(HCQ)经由IV输注施用,并且其中 $\geq 65\%$ 接受治疗的患者在治疗的第16周时达到ASAS20。

附图说明

[0048] 图1示出了显示TNV mAb在杂交瘤细胞上清液中抑制TNF α 结合至重组TNF受体的能力的测定的图示。将不同量的含有已知量TNV mAb的杂交瘤细胞上清液用固定浓度(5ng/ml)的 ^{125} I标记的TNF α 预温育。将混合物转移到已预先用p55-sf2(重组TNF受体/IgG融合蛋白质)包被的96孔光学板中。在洗去未结合的物质并使用 γ 计数器计数后,测定在mAb存在下与p55受体结合的TNF α 的量。尽管在这些实验中测试了8个TNV mAb样本,但为简单起见,这里未显示通过DNA序列分析显示的与其他TNV mAb之一相同的三种mAb(参见第5.2.2节)。对每个样本一式两份进行测试。所示的结果表示两次独立实验的结果。

[0049] 图2A至图2B示出了TNV mAb重链可变区的DNA序列。所示的种系基因是DP-46基因。“TNV”表示所示序列是TNV14、TNV15、TNV148和TNV196的序列。TNV序列中的前三个核苷酸限定翻译起始Met密码子。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前19个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示以成熟mAb起始的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系DNA序列(CDR3)中的缺口是由于种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb重链使用J6连接区。

[0050] 图3示出了TNV mAb轻链可变区的DNA序列。所示的种系基因是人 κ 种系可变区基因的Vg/38K家族的代表性成员。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前16个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示成熟mAb的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系DNA序列(CDR3)中的缺口是由于种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb轻链使用J3连接序列。

[0051] 图4示出了TNV mAb重链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸

序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。DP-46种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“TNV”表明所示序列涉及所有TNV mAb,除非显示了不同的序列。种系序列(CDR3)中的破折号表明该序列在种系基因中是未知的或不存在的。

[0052] 图5示出TNV mAb轻链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。Vg/38K型轻链种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“所有”表明所示序列涉及TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV186。

[0053] 图6示出了用于制备表达rTNV148B的C466细胞的重链和轻链表达质粒的示意图。p1783是重链质粒,并且p1776是轻链质粒。rTNV148B可变区和恒定区编码结构域显示为黑色框。J-C内含子中的免疫球蛋白增强子显示为灰色框。显示了相关的限制性位点。质粒显示为定向的,使得Ab基因的转录以顺时针方向进行。质粒p1783的长度为19.53kb,并且质粒p1776的长度为15.06kb。两种质粒的完整核苷酸序列是已知的。p1783中的可变区编码序列可通过替换BsiWI/BstBI限制性片段而容易地替换为另一个重链可变区序列。p1776中的可变区编码序列可通过替换SalI/AflIII限制性片段而替换为另一个可变区序列。

[0054] 图7示出了五种产生rTNV148B的细胞系的生长曲线分析的图示。培养开始于第0天,将细胞接种到T75烧瓶中的15Q+MHX培养基中,使30ml体积中的活细胞密度为 1.0×10^5 个细胞/ml。自执行转染和亚克隆以来,用于这些研究的细胞培养物一直处于连续培养中。在随后的几天,将T烧瓶中的细胞彻底重悬并移除培养物的0.3ml等分试样。当细胞计数降至 1.5×10^5 个细胞/ml以下时,终止生长曲线研究。通过台盼蓝排除法确定等分试样中活细胞的数量,并将等分试样的剩余部分储存用于稍后的mAb浓度测定。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0055] 图8示出了在不同浓度的MHX选择的存在下细胞生长速率的比較的图示。将细胞亚克隆C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM,5%FBS,2mM谷氨酰胺)中并再培养2天。然后将两种细胞培养物分成不含MHX、0.2X MHX或1X MHX的三种培养物。一天后,用培养物以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。使用SOP PD32.025中的公式计算前5天期间的倍增时间,并显示在条上方。

[0056] 图9示出了来自两个产生rTNV148B的细胞系的mAb产量随着时间的推移的稳定性的图示。自执行转染和亚克隆以来,一直处于连续培养中的细胞亚克隆用于在24孔培养皿中开始长期连续培养。在具有和不具有MHX选择的I5Q培养基中培养细胞。通过每4至6天分离培养物以维持新的活培养物而连续传代细胞,同时允许先前的培养物耗尽。在培养物耗尽后不久收集用过的细胞上清液的等分试样并储存直至测定mAb浓度。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0057] 图10示出了与实施例4中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或

本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。

[0058] 图11A-C示出了基于如实施例4所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周时依然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0059] 图12示出了与实施例5中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2、3和4周时对从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的免疫应答诱导和药代动力学清除率。

[0060] 图13A至图13C为表示基于关节炎指数的实施例5中疾病严重程度的进展的图。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差异。

[0061] 图14示出了与实施例6中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0062] 图15示出了基于如实施例6所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包

括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0063] 图16示出了与实施例7中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0064] 图17示出了基于如实施例7所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第8周)。TNV148治疗组和1mg/kg的cA2治疗组均在第4周时显示出AI的显著降低。尽管先前的研究(P-099-017)显示,在单次1mg/kg腹腔内推注后,TNV148在降低关节炎指数方面略有效,但本研究显示两种版本的TNV抗体治疗组的AI均略高。虽然(第6周除外)1mg/kg的cA2治疗组当与10mg/kg cA2组相比时没有显著增加,并且TNV148治疗组在第7周和第8周时显著较高,但在研究中的任何时间点,1mg/kg cA2、1mg/kg TNV148和1mg/kg TNV148B之间不存在AI的显著差异。

[0065] 图18示出了在患有活动性强直性脊柱炎(AS)的受试者中静脉内施用的Simponi(戈利木单抗)试验的研究设计图。

具体实施方式

[0066] 本发明提供了分离的、重组的和/或合成的抗TNF人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合的、人源化的或CDR-移植的抗体,其包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区和TNF抗独特型抗体,以及包含编码至少一种抗TNF抗体或抗独特型抗体的至少一种多核苷酸的组合物和编码核酸分子。本发明还包括但不限于,制备和使用此类核酸和抗体及抗独特型抗体的方法,包括诊断和治疗组合物、方法和装置。

[0067] 如本文所用,“抗肿瘤坏死因子 α 抗体”、“抗TNF抗体”、“抗TNF抗体部分”或“抗TNF抗体片段”和/或“抗TNF抗体变体”等包括任何这样的含蛋白质或肽的分子,该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,诸如但不限于,重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分,或TNF受体或结合蛋白质的至少一个可并入本发明抗体中的部分。此类抗体任选地还影响特异性配体,诸如但不限于此类抗体在体外、在原位和/或在体内调节、降低、提高、拮抗、激动、缓和、减轻、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种TNF活性或结合,或者干扰TNF受体活性或结合。作为非限制性示例,本发明的合适的抗TNF抗体、特定部分或变体可以结合至少一种TNF或其特定部分、变体或结构域。合适的抗TNF抗体、特定部分或变体还可任选地影响至少一种TNF活性或功能,诸如但不限于RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。术语“抗体”还旨在涵盖抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能片段包括结合哺乳动物TNF的抗原结合片段。例如,本发明涵盖能够结合TNF或其部分的抗体片段,包括但不限于,Fab片段(例如通过木瓜蛋白酶消化得到)、Fab'片段(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原得到)和F(ab')₂片段(例如通过胃蛋白酶消

化得到)、 facb 片段(例如通过纤溶酶消化得到)、 pFc' 片段(例如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化得到)、 Fd 片段(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原以及重聚集得到)、 Fv 或 scFv 片段(例如通过分子生物学技术得到)(参见,例如Colligan, Immunology, 出处同上)。

[0068] 此类片段可通过如本领域已知和/或如本文所述的酶裂解、合成或重组技术产生。也可使用抗体基因以多种截短形式产生抗体,其中一个或多个终止密码子已引入天然终止位点的上游。例如,可将编码 F(ab')_2 重链部分的组合基因设计成包括编码重链的 CH_1 结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的各个部分可通过常规技术周化学方法连接在一起,或可使用遗传工程技术制备为连续蛋白质。

[0069] 如本文所用,术语“人抗体”是指其中基本上蛋白质的每个部分(例如CDR、框架区、 C_L 结构域、 C_H 结构域(例如 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})、铰链区(V_L 、 V_H))在人类中基本上是无免疫原性的,仅具有小的序列改变或变化。类似地,指明属灵长类(猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类(小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠等)和其他哺乳动物的抗体表示此类种、亚属、属、亚科、科的特异抗体。此外,嵌合抗体包括上述的任何组合。这些改变或变异任选且优选相对于未经修饰的抗体而言保持或减少在人或其他物种中的免疫原性。因此,人抗体不同于嵌合抗体或人源化抗体。应当指出的是,人抗体可由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如, Fv 可包含连接重链可变区和轻链可变区的连接肽,例如2至约8个甘氨酸或其他氨基酸残基。此类连接肽被认为是人源的。

[0070] 还可以使用双特异性抗体、异种特异性抗体、异种缀合抗体或类似抗体,它们是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆的、优选人或人源化的抗体。在本情况中,结合特异性中的一种针对至少一种TNF蛋白质,另一种结合特异性针对任何其他抗原。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。通常,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuellar, Nature 305: 537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))产生可能的10种不同抗体分子的混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)相当繁琐,并且产物得率低。类似程序在例如以下文献中有所公开:WO 93/08829、美国专利6210668、6193967、6132992、6106833、6060285、6037453、6010902、5989530、5959084、5959083、5932448、5833985、5821333、5807706、5643759、5601819、5582996、5496549、4676980、WO 91/00360、WO 92/00373、EP 03089、Traunecker等人,EMBO J. 10:3655 (1991)、Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210 (1986),各自全文以引用方式并入本文。

[0071] 可用于本发明的方法和组合物中的抗TNF抗体(也称作TNF抗体)的特征可任选地在于与TNF高亲和力结合以及任选且优选地具有低毒性。具体地讲,本发明的抗体、特定片段或变体(其中各个组分,例如可变区、恒定区和构架区单独和/或共同地任选并优选具有低免疫原性)可用于本发明中。可用于本发明的抗体任选特征在于它们能长期用于治疗患者,可测量地减轻症状并具有低毒性和/或可接受的毒性。低的或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他合适的特性,可有助于实现治疗结果。“低免疫原性”在本文中定义为在低于约75%,或优选低于约50%的受治疗的患者中产生显著的HAHA、HACA或HAMA响应,和/或在受治疗的患者中引起低滴度(以双抗原酶免疫测定法测量小于约300,优选地小于约

100) (Elliott等人, Lancet, 第344卷: 第1125-1127页, 1994年, 其以引用方式并入本文)。

[0072] 效用: 本发明的分离核酸可用于产生至少一种抗TNF抗体或其特定变体, 其可以用于在细胞、组织、器官或动物(包括哺乳动物和人)中测量或实现, 以诊断、监控、调节、治疗、减轻、帮助预防至少一种TNF病症的发生或减轻其症状, 所述TNF病症选自但不限于免疫障碍或疾病、心血管障碍或疾病、感染性、恶性和/或神经性障碍或疾病中的至少一者。

[0073] 此类方法可包括向需要对症状、效果或机制进行此类调节、治疗、减轻、预防或减少的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的含有至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。该有效量可包括每单次施用(例如推注)、多次施用或连续施用约0.001mg/kg至500mg/kg的量, 或每单次施用、多次施用或连续施用实现0.01μg/ml至5000μg/ml的血清浓度, 或其中的任何有效范围或值, 该有效量使用如本文所述的或相关领域已知的已知方法进行施用和测定。引用。本文引用的所有出版物或专利都以引用方式全文并入本文中, 因为它们显示了本发明时的技术发展水平, 并且/或者提供了本发明的描述和实现。出版物是指任何科学出版物或专利公布、或可以任何媒体格式获得的任何其他信息, 该媒体格式包括所有记录格式、电子格式或印刷格式。以下参考以引用方式全文并入本文: Ausubel等人编辑, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow和Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan等人编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001)。

[0074] 本发明的抗体: 包含SEQ ID NO: 1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO: 4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的至少一种抗TNF抗体可任选地通过细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体来生产, 如本领域所熟知的。参见例如 Ausubel等人编辑, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow和Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan等人编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 各自以引用方式全文并入本文。

[0075] 可针对适当的免疫原性抗原产生对人TNF蛋白质或其片段特异的人抗体, 诸如分离的和/或TNF蛋白质和/或其部分(包括合成分子, 诸如合成肽)。可以类似地产生其他特异或一般性的哺乳动物抗体。使用任何适宜的技术可进行免疫原性抗原的制备和单克隆抗体的产生。

[0076] 在一种方法中, 杂交瘤是通过合适的无限增殖细胞系(如骨髓瘤细胞系, 例如但不限于, Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等, 或异型骨髓瘤(heteromyloma), 其融合产物, 或由其衍生的任何细胞或融合细胞, 或本领域已知的任何其他合适的细胞系, 参

见,例如www.atcc.org,www.lifetech.com.等)与产抗体细胞融合来产生,所述产抗体细胞为例如(但不限于)分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体细胞或其他免疫细胞或包含B细胞的细胞,或任何这样的其他细胞,它们将重链或轻链恒定序列或可变序列或构架序列或CDR序列表达为内源的或异源的核酸、为重组或内源的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、羊、灵长类动物、真核生物、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或它们的任何组合。参见,例如以引用方式全文并入本文中的Ausubel,同上,和Colligan,Immunology,同上,第2章。

[0077] 产抗体细胞还可从人或已用所关注的抗原免疫过的其他合适动物的外周血,或优选脾或淋巴结获得。任何其他合适的宿主细胞也可用于表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离,并且可通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可通过合适的测定法(例如ELISA)进行选择。

[0078] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于,从以下肽或蛋白质文库选择重组抗体的方法(例如,但不限于,噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA等展示文库;例如,购自Cambridge antibody Technologies,Cambridgeshire,UK;MorphoSys,Martinsreid/Planegg,DE;Biovation,Aberdeen,Scotland,UK;BioInvent,Lund,Sweden;Dyax,Enzon,Affymax/Biosite;Xoma,Berkeley,CA;Ixsys。参见例如EP 368,684;PCT/GB91/01134;PCT/GB92/01755;PCT/GB92/002240;PCT/GB92/00883;PCT/GB93/00605;US 08/350260 (5/12/94);PCT/GB94/01422;PCT/GB94/02662;PCT/GB97/01835;(CAT/MRC);W090/14443;W090/14424;W090/14430;PCT/US94/1234;W092/18619;W096/07754;(Scripps);EP 614 989 (MorphoSys);W095/16027 (BioInvent);W088/06630;W090/3809 (Dyax);US 4,704,692 (Enzon);PCT/US91/02989 (Affymax);W089/06283;EP 371 998;EP 550 400;(Xoma);EP 229 046;PCT/US91/07149 (Ixsys);或随机生成的肽或蛋白质-US 5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862、W0 86/05803、EP 590 689 (Ixsys,现为Applied Molecular Evolution (AME),各自以引用方式全文并入本文))或者依赖于转基因动物的免疫(例如SCID小鼠,Nguyen等人,Microbiol.Immunol.,41:901-907 (1997));Sandhu等人,Crit.Rev.Biotechnol.16:95-118 (1996);Eren等人,Immunol.93:154-161 (1998),各自以引用方式以及相关专利和申请全文并入本文)能够产生人类抗体的全部功能,如本领域已知和/或如本文所述。此类技术包括(但不限于)核糖体展示(Hanes等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:4937-4942 (1997年5月);Hanes等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:14130-14135 (1998年11月));单细胞抗体产生技术(例如,选择的淋巴细胞抗体方法("SLAM")(美国专利5,627,052,Wen等人,J.Immunol.17:887-892 (1987);Babcook等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7843-7848 (1996));凝胶微滴和流式细胞术(Powell等人,Biotechnol.8:333-337 (1990);One Cell Systems,Cambridge,MA;Gray等人,J.Imm.Meth.182:155-163 (1995);Kenny等人,Bio/Technol.13:787-790 (1995));B细胞选择(Steenbakkers等人,Molec.Biol.Reports 19:125-134 (1994);Jonak等人,Progress Biotech,第5卷,In Vitro Immunization in Hybridoma Technology,Borrebaeck编辑,Elsevier Science Publishers B.V.,Amsterdam,Netherlands (1988))。

[0079] 还可使用用于将非人或人抗体进行工程化或人源化的方法,这些方法是本领域所熟知的。一般来讲,人源化或工程化的抗体具有一个或多个来自非人来源的氨基酸残基,所述非人来源是例如(但不限于)小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基,它们一般取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。已知的人Ig序列是公开的,例如,www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;www.atcc.org/phage/hdb.html;www.sciquest.com/;www.abcam.com/;www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;www.antibodyresource.com/;mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/;pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;www.biotech.ufl.edu/~hcl/;www.pebio.com/pa/340913/340913.html;www.hal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;www.biodesign.com/table.asp;www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;www.isac-net.org/sites_geo.html;aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;imgt.cnusc.fr:8104/;www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;antibody.bath.ac.uk/;abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html;www.vryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;www.biosci.missouri.edu/smithgp/inndex.html;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;www.jerini.de/fr_products.htm;www.patents.ibm.com/ibm.html。Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Dept.Health(1983),以上网址公开内容和文献全文均以引用方式并入本文。

[0080] 如本领域已知的,此类输入序列可用于减少免疫原性,或减少、增强或修饰结合性、亲和力、结合率、解离率、亲和力、特异性、半衰期或任何其他合适的特征。一般来讲,保留部分或全部非人或人CDR序列,而可变区和恒定区的非人序列用人或其他氨基酸置换。抗体还可以任选地人源化为保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了达到这个目标,人源化抗体还可以任选使用亲本和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上的人源化产物的分析过程进行制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的并且是为本领域的技术人员所熟悉的。举例说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。这些展示的检测使得能分析在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中残基的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有和输入序列中选择和组合FR残基,从而能实现所需抗体特征,例如对靶抗原的增加的

亲和力。通常,CDR残基直接且基本上大多数涉及影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程化可使用任何已知方法执行,诸如但不限于以下中所描述的那些,Winter(Jones等人,Nature 321:522(1986);Riechmann et al.,Nature 332:323(1988)(Riechmann等人,《自然》,第332卷,第323页,1988年);Verhoeyen et al.,Science 239:1534(1988)(Verhoeyen等人,《科学》,第239卷,第1534页,1988年);Sims et al.,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901(1987)(Chothia和Lesk,《分子生物学杂志》,第196卷,第901页,1987年);Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:4285(1992);Presta et al.,J.Immunol.151:2623(1993),美国专利:5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5,766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539、4816567、PCT/US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246,各自以引用方式全文并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0081] 如本文所述和/或如本领域已知的,还可以通过能对产生全套人抗体的转基因动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等)进行免疫来任选地产生抗TNF抗体。可使用合适的方法,诸如本文描述的方法,从此类动物分离产生人抗TNF的抗体的细胞并使其无限增殖。

[0082] 产生能够产生与人抗原结合的人抗体库的转基因小鼠可以通过已知方法(例如,但不限于,美国专利:5,770,428、5,569,825、5,545,806、5,625,126、5,625,825、5,633,425、5,661,016和5,789,650,授予Lonberg等人,Jakobovits等人W0 98/50433,Jakobovits等人W0 98/24893,Lonberg等人W0 98/24884,Lonberg等人W0 97/13852,Lonberg等人W0 94/25585,Kucherlapate等人W0 96/34096,Kucherlapate等人EP 0463 151 B1,Kucherlapate等人EP 0710 719 A1,Surani等人美国专利5,545,807,Bruggemann等人W0 90/04036,Bruggemann等人EP 0438 474 B1,Lonberg等人EP 0814 259 A2,Lonberg等人GB 2 272 440 A,Lonberg等人Nature 368:856-859(1994),Taylor等人,Int.Immunol.第6卷第4期,第579-591页,1994年,Green等人,Nature Genetics,第7卷:第13-21页,1994年,Mendez等人,Nature Genetics,第15卷:第146-156页,1997年,Taylor等人,Nucleic Acids Research第20卷第23期:第6287-6295页,1992年,Tuailon等人,Proc Natl Acad Sci USA,第90卷第8期,第3720-3724页,1993年,Lonberg等人,Int Rev Immunol,第13卷第1期:第65-93页,1995年和Fishwald等人,Nat Biotechnol,第14卷第7期:第845-851页,1996年,其各自以引用方式全文并入本文中)。一般来讲,这些小鼠包含至少一种包含来自至少一个发生了功能性重排或可经历功能性重排的人免疫球蛋白基因座的DNA的转基因。此类小鼠中的内源免疫球蛋白基因座可以被破坏或缺失,以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0083] 可用肽展示文库方便地实现对与相似蛋白质或片段特异性结合的抗体的筛选。这种方法涉及在大型肽集合中筛选具有所需功能或结构的个别成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域熟知的。所展示的肽序列的长度可以为3至5000个或更多个氨基酸,常常长为5-100个氨基酸,通常长为约8-25个氨基酸。除用于产生肽文库的直接化学合成方法之外,有几种重组DNA方法也已得到描述。一种类型涉及在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞均含有编码具体展示的肽序列的核苷酸序列。这类方法描述于PCT专利申请91/

17271、91/18980、91/19818和93/08278。其他的用于产生肽文库的系统同时具有体外化学合成方法和重组方法的各方面。参见PCT专利公开文本92/05258、92/14843和96/19256。还可参见美国专利5,658,754;和5,643,768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从诸如Invitrogen (Carlsbad, CA) 和Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 的供应商商购获得。参见例如美国专利4704692、4939666、4946778、5260203、5455030、5518889、5534621、5656730、5763733、5767260、5856456, 转让给Enzon; 5223409、5403484、5571698、5837500, 转让给Dyax, 5427908、5580717, 转让给Affymax; 5885793, 转让给Cambridge antibody Technologies; 5750373, 转让给Genentech, 5618920、5595898、5576195、5698435、5693493、5698417, 转让给Xoma, Colligan, 出处同上; Ausubel, 出处同上; 或Sambrook, 出处同上, 以上专利和出版物中的每一者以引用方式全文并入本文。

[0084] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因动物或哺乳动物, 诸如山羊、奶牛、马、绵羊等, 也可以制备本发明的抗体, 所述转基因动物或哺乳动物能够在它们的奶中产生此类抗体。此类动物可用已知的方法提供。参见例如但不限于美国专利5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489等, 这些专利中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0085] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草和玉米), 也可以制备本发明的抗体, 所述转基因植物和培养的植物细胞在其植物部分或从植物部分培养得到的细胞中产生此类抗体、其特定部分或变体。举个非限制性例子, 表达重组蛋白质的转基因烟草叶已成功地用于提供大量重组蛋白质, 例如使用诱导型启动子来提供。参见, 例如Cramer等人, Curr. Top. Microbol. Immunol., 240:95-118 (1999), 以及其中引用的参考文献。同样, 转基因玉米也已用于以商业生产规模表达哺乳动物蛋白质, 其生物活性等同于在其他重组系统中生产或从天然来源纯化的那些哺乳动物蛋白质。参见, 例如Hood等人, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999), 以及其中引用的参考文献。也可由转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎) 大量生产抗体, 包括抗体片段, 诸如单链抗体(scFv)。参见, 例如Conrad等人, Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998), 以及其中引用的参考文献。因此, 本发明的抗体还可使用转基因植物根据已知方法进行生产。还可参见, 例如Fischer等人, Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999); Ma等人, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma等人, Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam等人, Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); 以及其中引用的参考文献。关于抗体的植物表达一般还可参见但不限于, 上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0086] 本发明的抗体可以广泛范围的亲和力(K_D) 结合人TNF。在一个优选的实施方案中, 本发明的至少一种人mAb可任选地以高的亲和力结合人TNF。例如, 人mAb可以等于或小于约 10^{-7} M, 诸如但不限于0.1-9.9(或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或值的 K_D 结合人TNF。

[0087] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何合适的方法通过实验确定。(参见例如Berzofsky等人, "Antibody-Antigen Interactions", Fundamental Immunology, Paul, W.E编辑, Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, NY (1992); 以及本文所述的方法)。如果在不同的条件(例如, 盐浓度、

pH) 下测量,则测得的特定抗体-抗原相互作用的亲和力会不同。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如 K_D 、 K_a 、 K_d)的测量优选地用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液(诸如本文所述的缓冲液)来进行。

[0088] 核酸分子。使用本文提供的信息,诸如编码SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8中的至少一者的至少70%-100%的邻接氨基酸的核苷酸序列、其特定片段、变体或共有序列,或者包含这些序列中的至少一者的经寄载体,可使用本文描述的或如本领域已知的方法获得编码包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的至少一种抗TNF抗体的本发明核酸分子。

[0089] 本发明的核酸分子可以是RNA的形式,例如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其他形式,或者为DNA的形式,包括但不限于,通过克隆或合成产生的cDNA和基因组DNA,或它们的任何组合。DNA可以为三链的、双链的或单链的或它们的任何组合。DNA或RNA的至少一条链的任何部分可以是编码链,也称为有义链,或其可以是非编码链,也称作反义链。

[0090] 本发明的分离核酸分子可包括具有开放阅读框(ORF),任选地具有一个或多个内含子的核酸分子,例如但不限于至少一个CDR的至少一个指定部分,如至少一条重链(例如SEQ ID NO:1-3)或轻链(例如SEQ ID NO:4-6)的CDR1、CDR2和/或CDR3;具有抗TNF抗体或可变区的编码序列的核酸分子(例如,SEQ ID NO:7、8);以及具有基本上不同于上述那些的核苷酸序列,但由于遗传密码的简并性,仍编码至少一种抗TNF抗体的核酸分子,如本文所述和/或如本领域已知的。当然,遗传密码是本领域熟知的。因此,对于本领域技术人员而言,应该可以按常规产生编码本发明的特异性抗TNF抗体的此类简并核酸变体。参见,例如Ausubel等人,出处同上,并且此类核酸变体包括在本发明中。本发明的分离的核酸分子的非限制性示例包括SEQ ID NO:10、11、12、13、14、15,分别对应于编码HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC可变区和LC可变区的核酸的非限制性示例。

[0091] 如本文所指出,本发明核酸分子包含编码抗TNF抗体的核酸,所述核酸可包括但不限于单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些核酸;整个抗体或其部分的编码序列;抗体、片段或部分的编码序列以及附加序列,诸如具有或不具有上述附加编码序列的至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列;诸如至少一个内含子;还包括附加非编码序列,包括但不限于非编码5'和3'序列,诸如在转录、mRNA加工(包括剪接和聚腺苷化信号(例如mRNA的核糖体结合和稳定))中发挥作用的转录、非翻译序列;编码另外的氨基酸,例如提供另外的功能的那些氨基酸的另外编码序列。因此,编码抗体的序列可以与标记序列例如编码肽的序列融合,所述肽可促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化。

[0092] 与本文所述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸。本发明提供在选择性杂交条件下与本文所公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因而,本实施例的多核苷酸可用于分离、检测和/或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可用于鉴定、分离或扩增寄存文库中的部分或全长克隆。在一些实施例中,多核苷酸是分离的基因组序列或cDNA序列,或与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA互补。

[0093] 优选地,cDNA文库包含至少80%全长序列,优选地至少85%或90%全长序列,更优选地至少95%全长序列。cDNA文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格杂交条件通常但不是唯一地用于与互补序列的序列同一性较低的序列。中等和高严格条件可任选用于同一性较高的序列。低严格条件可使具有约70%序列同一性的序列进行选择

杂交,并且可用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0094] 任选地,本发明的多核苷酸将编码由本文所述多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如Ausubel(出处同上);Colligan(出处同上),各自全文引用方式并入本文。

[0095] 核酸的构建。可使用本领域熟知的(a)重组方法、(b)合成技术、(c)纯化技术或它们的组合来制备本发明的分离的核酸。

[0096] 所述核酸可方便地包含除了本发明的多核苷酸之外的序列。例如,可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸中以帮助该多核苷酸的分离。此外,可以插入可翻译序列以帮助分离翻译出的本发明多核苷酸。例如,六组氨酸标记序列为纯化本发明的蛋白质提供了便利手段。本发明的核酸(编码序列除外)任选为用于克隆和/或表达本发明多核苷酸的载体、衔接子或接头。

[0097] 可将额外序列加入这些克隆和/或表达序列来优化它们在克隆和/或表达中的功能,以帮助分离所述多核苷酸,或改进该多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域熟知的。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上)。

[0098] 用于构建核酸的重组方法。本发明的分离的核酸组合物,例如RNA、cDNA、基因组DNA或它们的任何组合,可用多种本领域技术人员已知的克隆方法从生物学来源获得。在一些实施例中,将在严格条件下与本发明多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在cDNA或基因组DNA文库中鉴定所需序列。RNA的分离,以及cDNA和基因组文库的构建是本领域普通技术人员熟知的。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上)。

[0099] 核酸筛选和分离方法。cDNA或基因组文库可用基于本发明多核苷酸的序列(例如本文所公开的那些)的探针进行筛选。探针可用于与基因组DNA或cDNA序列杂交以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域的技术人员将会知道各种严格度的杂交可用于测定;并且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格,在探针和靶之间必须存在更高层次的互补性才能使双链体形成得以发生。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH和部分变性溶剂如甲酰胺的存在中的一者或多者加以控制。例如,通过(例如)在0%至50%的范围内操纵甲酰胺的浓度使反应物溶液的极性变化,从而方便地改变杂交的严格性。对于可检测结合所需的互补性程度(序列同一性)将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度将最佳为100%或70%-100%或其中的任何范围或数值。然而应当理解,探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0100] 扩增RNA或DNA的方法是本领域熟知的,并且基于本文呈现的教导和指导,无需过度实验即可根据本发明使用。

[0101] 已知的DNA或RNA扩增方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)和相关的扩增方法(参见例如授予Mullis等人的美国专利4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188;授予Tabor等人的4,795,699和4,921,794;授予Innis等人的5,142,033;授予Wilson等人的5,122,464;授予Innis的5,091,310;授予Gyllensten等人的5,066,584;授予Gelfand等人的4,889,818;授予Silver等人的4,994,370;授予Biswas的4,766,067;Ringold等人的4,656,134)以及使用靶序列的反义RNA作为双链DNA合成模板的RNA介导的扩增(授予Malek等人的美国专利5,130,238,其商品名为NASBA),这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。

(参见例如Ausubel, 出处同上; 或Sambrook, 出处同上。)

[0102] 例如, 可用聚合酶链反应 (PCR) 技术直接从基因组DNA或cDNA文库扩增本发明的多核苷酸和相关基因的序列。例如PCR和其他体外扩增方法也可用于克隆编码待表达的蛋白质的核酸序列、制备核酸以用作探针来检测样品中所需mRNA的存在, 用于核酸测序, 或用于其他目的。足以在整个体外扩增方法中指导技术人员的技术的示例可见于Berger (出处同上)、Sambrook (出处同上) 和Ausubel (出处同上), 以及Mullis等人的美国专利4,683,202 (1987); 以及Innis等人, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)。用于基因组PCR扩增的市售试剂盒是本领域已知的。参见例如, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech)。另外, 例如, T4 gene 32 protein (Boehringer Mannheim) 可用于提高长PCR产物的得率。

[0103] 用于构建核酸的合成方法。本发明的分离的核酸还可通过已知方法通过直接化学合成进行制备 (参见, 例如Ausubel等人, 同上)。化学合成一般会产生单链寡核苷酸, 其可以通过与互补序列杂交, 或通过用该单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合而转变成双链DNA。本领域技术人员将认识到, 虽然DNA的化学合成可能限制于约100个或更多个碱基的序列, 但较长的序列可以通过连接较短序列来获得。

[0104] 重组表达盒。本发明还提供包含本发明核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列, 例如编码本发明抗体的cDNA或基因组序列, 可用于构建可导入到至少一种所需宿主细胞中的重组表达盒。重组表达盒通常会包含与转录起始调节序列可操作地连接的本发明多核苷酸, 所述转录起始调节序列会引导所述多核苷酸在预定的宿主细胞中的转录。异源和非异源 (即内源) 启动子两者均可用于引导本发明核酸的表达。

[0105] 在一些实施方案中, 可在非异源形式的本发明多核苷酸的合适位置 (上游、下游或内含子中) 引入作为启动子、增强子或其他元件的分离核酸, 以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如, 可通过突变、缺失和/或置换在体内或体外改变内源启动子。

[0106] 载体和宿主细胞。本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用该重组载体进行遗传工程改造的宿主细胞以及通过本领域熟知的重组技术生产至少一种抗TNF抗体。参见例如Sambrook等人 (出处同上); Ausubel等人 (出处同上), 各自全文以引用方式并入本文。

[0107] 可将所述多核苷酸任选与含有可选择标记的载体连接, 以在宿主中增殖。一般来讲, 质粒载体在沉淀物例如磷酸钙沉淀物中, 或在与带电脂质的复合物中被导入。如果载体是病毒, 那么它可以使用合适的包装细胞系在体外进行包装且随后转导进宿主细胞内。

[0108] 应将DNA插入物与合适的启动子可操作地连接。表达构建体还会含有转录起始位点、终止位点以及在转录区中含有用于翻译的核糖体结合位点。该构建体表达的成熟转录物的编码部分将优选地包括在待翻译的mRNA开始处的翻译起始位点和在该mRNA末端适当位置的终止密码子 (例如, UAA、UGA或UAG), 对于哺乳动物或真核细胞表达优选UAA和UAG。

[0109] 表达载体将优选但任选包括至少一个可选择标记。此类标记包括 (例如但不限于): 对于真核细胞培养, 为甲氨蝶呤 (MTX)、二氢叶酸还原酶 (DHFR, 美国专利4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素 (G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶 (GS, 美国专利5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) 抗性基因, 对于大肠杆菌 (E.coli) 和其他细菌或原核生物培养, 为四环素或氨苄青霉素抗性基因 (以上专利全

文以引用方式并入本文)。用于上述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员来说将是显而易见的。载体构建体导入宿主细胞可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他已知方法来实现。此类方法已在本领域中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第1-4章和第16-18章;Ausubel(出处同上),第1、9、13、15、16章。

[0110] 本发明的至少一种抗体能够以修饰形式(例如融合蛋白)表达,并且可不仅包括分泌信号,而且还可包括额外的异源功能区。例如,可将额外的氨基酸(尤其是带电氨基酸)的区域加至抗体的N-端,以提高纯化期间或随后的处理和保藏期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可将肽部分加至本发明的抗体以帮助纯化。这些区域可在抗体或其至少一个片段的最终制备前除去。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第17.29-17.42章和第18.1-18.74章;Ausubel(出处同上),第16、17和18章。

[0111] 本领域技术人员可认识到许多表达系统可用于表达编码本发明蛋白质的核酸。

[0112] 或者,本发明的核酸可以在包含编码本发明抗体的内源DNA的宿主细胞中通过开启(通过操纵)在宿主细胞中进行表达。此类方法是本领域熟知的,例如,如美国专利5,580,734、5,641,670、5,733,746和5,733,761中所述,所述专利以引用方式全文并入本文中。

[0113] 可用于生产抗体、其特定部分或变体的细胞培养物的实例是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式,但也可使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。在本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的合适宿主细胞系,包括COS-1(例如ATCC CRL 1650)、COS-7(例如ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如ATCC CRL-10)、CHO(例如ATCC CRL 1610)和BSC-1(例如ATCC CRL-26)细胞系,Cos-7细胞、CHO细胞、hep G2细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293细胞、HeLa细胞等,它们可容易地从例如美国典型培养物保藏中心(Manassas,Va(www.atcc.org))获得。优选的宿主细胞包括淋巴样来源的细胞,例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是P3X63Ag8.653细胞(ATCC登记号CRL-1580)和SP2/0-Ag14细胞(ATCC登记号CRL-1851)。在尤其优选的实施例,重组细胞是P3X63Ab8.653或SP2/0-Ag14细胞。

[0114] 这些细胞的表达载体可包括以下的表达控制序列中的一者或多者,例如但不限于:复制起点;启动子(例如,晚期或早期SV40启动子、CMV启动子(美国专利5,168,062;5,385,839)、HSV tk启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利5,266,491)、至少一种人免疫球蛋白启动子;增强子和/或加工信息位点例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点(例如SV40大T Ag聚A添加位点)和转录终止子序列。参见例如Ausubel等人(出处同上);Sambrook等人(出处同上)。可用于产生本发明的核酸或蛋白质的其他细胞也是已知的和/或可例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org)或其他已知的来源或商业来源得到。

[0115] 当使用真核宿主细胞时,通常会将多腺苷酸化或转录终止序列整合进载体内。终止序列的例子是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的例子是来自SV40的VP1内含子(Sprague,et al.,J.Virol.45:773-781(1983))。此外,如本领域所知,可将控制在宿主细胞中的复制的基因序列整合进载体内。

[0116] 抗体的纯化。抗TNF抗体可通过熟知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化,所述方法包括但不限于蛋白质A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷

酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱(“HPLC”)也可以用于纯化。参见,例如Colligan,Current Protocols in Immunology或Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 例如第1、4、6、8、9、10章,各自以引用方式全文并入本文中。

[0117] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成操作的产物和通过重组技术从真核宿主产生的产物,所述真核宿主包括(例如)酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。根据重组生产方法中所采用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,糖基化的是优选的。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook,出处同上,第17.37-17.42部分;Ausubel,出处同上,第10、12、13、16、18和20章,Colligan,Protein Science,出处同上,第12-14章,所有均以引用方式全文并入本文。

[0118] 抗TNF抗体

[0119] 包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的分离的抗体包含本文所公开的由任何合适的多核苷酸编码的抗体氨基酸序列,或任何分离的或制备的抗体。优选地,人抗体或抗原结合片段结合人TNF,从而部分或基本上中和该蛋白质的至少一种生物学活性。部分或优选地基本上中和至少一种TNF蛋白质或片段的至少一种生物学活性的抗体或其特定部分或变体可结合该蛋白质或片段,从而抑制通过TNF与TNF受体的结合或通过其他TNF依赖性的或介导的机制所介导的活性。如本文所用,术语“中和抗体”是指取决于测定法,可以使TNF依赖性活性被抑制约20%-120%的抗体,优选地至少约10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多。抗TNF抗体抑制TNF依赖性活性的能力,优选地通过至少一种如本文所述和/或如本领域已知的合适的TNF蛋白质或受体测定法来进行评估。本发明的人抗体可以是任何类型(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD等)或同种型,并且可包含K或 λ 轻链。在一个实施例中,人抗体包含IgG重链或确定的片段,例如,同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的至少一者。这类抗体可如本文所述和/或如本领域已知通过采用转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物来制备,所述动物包含至少一种人轻链(例如IgG、IgA)和IgM(例如 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4)转基因。在另一个实施方案中,抗人TNF人抗体包含IgG1重链和IgG1轻链。

[0120] 本发明的至少一种抗体结合至少一个特定表位,该表位对至少一种TNF蛋白质、亚基、片段、部分或它们的任何组合是特异性的。该至少一个表位可包含至少一个抗体结合区,该抗体结合区包含所述蛋白质的至少一部分,该表位优选地由所述蛋白质的至少一个细胞外的、可溶性的、亲水的、外部的或胞质的部分构成。该至少一个特定表位可包含这样的至少一种氨基酸序列的任何组合,所述至少一种氨基酸序列为SEQ ID NO:9的邻接氨基酸的至少1-3个氨基酸至整个特定部分。

[0121] 一般来讲,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含这样的抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个人互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)或至少一个重链可变区的变体以及至少一个人互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)或至少一个轻链可变区的变体。作为非限制性示例,抗体或抗原结合部分或变体可包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3和/或具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3中的至少一者。在一个具体实施方案中,抗体或抗原结合片段可具有抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个重链CDR(即,CDR1、CDR2和/或

CDR3)的至少一部分,该重链CDR具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:1、2和/或3)。在另一个具体实施方案中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有抗原结合区,所述抗原结合区包含具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:4、5和/或6)的至少一个轻链CDR(即CDR1、CDR2和/或CDR3)的至少一部分。在一个优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段的三个重链CDR和三个轻链CDR具有如本文所述的mAb TNV148、TNV14、TNV15、TNV196、TNV118、TNV32、TNV86中的至少一种的对应CDR的氨基酸序列。此类抗体可通过如下方法制备:使用常规技术将抗体的各个部分(CDR和构架区)化学连接在一起,使用重组DNA技术的常规技术或通过使用任何其他合适的方法制备并表达编码该抗体的(一种或多种)核酸分子。

[0122] 抗TNF抗体可包含具有确定氨基酸序列的重链或轻链可变区中的至少一者。例如,在一个优选的实施方案中,包含任选地具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个重链可变区,和/或任选地具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的至少一个轻链可变区的抗TNF抗体,结合到人TNF并且包含限定的重链或轻链可变区的抗体可使用合适的方法制备,诸如噬菌体展示(Katsube,Y.等人,Int J Mol.Med,1(5):863-868(1998))或采用转基因动物的方法制备,如本领域已知和/或如本文所述。例如,可以用人TNF或其片段,对包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因和包含来自可经历功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的DNA的转基因的转基因小鼠进行免疫,以引发抗体的产生。如果需要,可以对产生抗体的细胞进行分离,并且可以如本文所述和/或如本领域所知制备杂交瘤或其他无限增殖化的产生抗体的细胞。另选地,可以利用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达抗体、特定部分或变体。

[0123] 本发明还涉及其包含的氨基酸序列基本上与本文所述的氨基酸序列相同的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和CDR。优选地,此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或CDR的抗体可以高的亲和力(例如小于或等于约 10^{-9} M的 K_D)结合人TNF。与本文所述序列基本相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸置换以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸置换是指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸,所述第二种氨基酸具有的化学和/或物理特性(例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)与第一种氨基酸相似。保守置换包括在以下组中用一种氨基酸置换另一种氨基酸:赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H);天冬氨酸(D)和谷氨酸(E);天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)、K、R、H、D和E;丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)和甘氨酸(G);F、W和Y;C、S和T。

[0124] 氨基酸代码。构成本发明的抗TNF抗体的氨基酸通常采用缩写。可通过氨基酸的单字母代码、三字母代码或者三核苷酸密码子来表示氨基酸,由此指示氨基酸名称,这是本领域众所周知的(参见Alberts,B.等人,Molecular Biology of The Cell,第三版,Garland Publishing,Inc.,New York,1994):

[0125]

单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
A	Ala	丙氨酸	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	半胱氨酸	UGC, UGU
D	阿司匹林	天冬氨酸	GAC, GAU
E	Glu	谷氨酸	GAA, GAG
F	Phe	苯丙氨酸	UUC, UUU
G	Gly	甘氨酸	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	组氨酸	CAC, CAU
I	Ile	异亮氨酸	AUA, AUC, AUU
K	Lys	赖氨酸	AAA, AAG
L	Leu	亮氨酸	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	甲硫氨酸	AUG
N	Asn	天冬酰胺	AAC, AAU
P	Pro	脯氨酸	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	谷氨酰胺	CAA, CAG

[0126]

R	Arg	精氨酸	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	丝氨酸	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	苏氨酸	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	缬氨酸	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	色氨酸	UGG
Y	Tyr	酪氨酸	UAC, UAU

[0127] 如本文所说明的,本发明的抗TNF抗体可包括一个或多个来自天然突变或来自人工操纵的氨基酸置换、缺失或添加。

[0128] 当然,技术人员可进行的氨基酸置换数目取决于许多因素,包括上文所述的那些。如本文所说明的,一般来讲,任何给定的抗TNF抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个,诸如1-30个或其中的任何范围或值。

[0129] 可通过本领域已知的方法来鉴定本发明的抗TNF抗体中对于功能而言必需的氨基酸,所述方法诸如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如Ausubel,出处同上,第8、15章;Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085(1989))。后一方法在分子的每个残基处引入单个丙氨酸突变。然后对所产生的突变分子测试生物学活性,诸如但不限于至少一种TNF中和活性。抗体结合至关重要的位点也可以通过结构分析进行鉴定,例如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith,et al.,J.Mol.Biol.224:899-904(1992)以及de Vos等人,Science 255:306-312(1992))。

[0130] 本发明的抗TNF抗体可包括但不限于选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6中的至少一个的1至所有邻接氨基酸的至少一部分、序列或组合。

[0131] 抗TNF抗体还可任选地包含SEQ ID NO:7、8中的至少一者的70%-100%的邻接氨基酸中的至少一者的多肽。

[0132] 在一个实施方案中,免疫球蛋白链或其部分(例如可变区、CDR)的氨基酸序列与SEQ ID NOS:7、8中的至少一者的对应链的氨基酸序列具有约70%-100%的同一性(例如70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或其中的任何范围或值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:8的序列进行比较,或者重链CDR3的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:7进行比较。优选地,用本领域已知的合适计算机算法确定出70-100%氨基酸同一性(即90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或者其中的任何范围或值)。

[0133] 在SEQ ID NO:7、8中提供了示例性重链和轻链可变区序列。本发明的抗体,或其特定变体可包含任何数目的来自本发明抗体的邻接氨基酸残基,其中该数目选自抗TNF抗体中邻接残基数目的10%-100%的整数。任选地,该邻接氨基酸亚序列长度为至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或更多个氨基酸,或其中的任何范围或数值。此外,所述亚序列的数目可以为选自1至20的任何整数,例如至少2、3、4或5。

[0134] 技术人员将会知道,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体的比活性为天然(非合成)的、内源性或相关的和已知的抗体比活性的至少20%、30%或40%,并且优选地为至少50%、60%或70%,并且最优选地为至少80%、90%或95%-1000%。测定和定量酶促活性和底物特异性的量度的方法是本领域技术人员熟知的。

[0135] 在另一方面,本发明涉及通过共价连接有机部分进行修饰的、如本文所述的人抗体和抗原结合片段。此类修饰可以产生具有改善的药代动力学特性(例如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或支化的亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在具体实施例中,亲水聚合基团可以具有约800至约120,000道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约8至约40个碳原子。

[0136] 本发明的经修饰的抗体和抗原结合片段可包含一个或多个与抗体直接或间接共价键合的有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段键合的每个有机部分可独立地是亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”涵盖单羧酸和二羧酸。“亲水聚合基团”,该术语在本文中使用时是指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价连接聚赖氨酸来修饰的抗体包括在本发明内。适用于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是直链或支链的,并且包括(例如)聚链烷二醇(例如PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG等)、碳水化合物(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚环氧链烷(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水聚合物作为单独的分子实体具有约800至约150,000道尔顿的分子量。例如可使用PEG₅₀₀₀和PEG_{20,000},其中下标是聚合物的平均分子量(道尔顿)。亲水性聚合物基团可用1至约6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可通过采用合适的方法制备。例如,可将包含胺基的聚合物与脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸根偶联,且可将脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧酸根(如用N,N-羰基二咪唑活化)与聚合物上的羟基偶联。

[0137] 适用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可含有一个或多个不饱和单位。适用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括例如正十二烷酸酯(C₁₂,月桂酸酯)、正十

四烷酸酯 (C₁₄, 肉豆蔻酸酯)、正十八烷酸酯 (C₁₈, 硬脂酸酯)、正二十烷酸酯 (C₂₀, 花生酸酯)、正二十二烷酸酯 (C₂₂, 山嵛酸酯)、正三十烷酸酯 (C₃₀)、正四十烷酸酯 (C₄₀)、顺式- Δ 9-十八烷酸酯 (C₁₈, 油酸酯)、全顺式- Δ 5,8,11,14-二十烷酸酯 (C₂₀, 花生四烯酸酯)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链的低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可包含1至约12个, 优选1至约6个碳原子。

[0138] 修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备, 例如通过与一种或多种修饰剂反应来制备。如本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的合适有机基团 (例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团, 它们可在合适条件下与第二化学基团反应, 由此在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键。例如, 胺反应性活化基团包括亲电子基团, 例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素 (氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS) 等。可以与硫醇反应的活化基团包括, 例如, 马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基 (acryloyl)、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇 (TNB-硫醇) 等。可将醛官能团与含胺或酰肼的分子偶联, 并且可将叠氮基可与三价磷基团反应以形成磷酰胺酯或磷酰亚胺键。将活化基团引入分子的合适方法是本领域已知的 (参见例如 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996))。可将活化基团直接键合到该有机基团 (例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯), 或者通过接头部分来键合, 所述接头部分例如二价 C₁-C₁₂ 基团, 其中一个或多个碳原子可被杂原子诸如氧、氮或硫取代。合适的接头部分包括例如四乙烯乙二醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH-和-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-。包含连接部分的修饰剂可 (例如) 通过如下产生: 在存在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 的情况下, 使单-Boc-烷基二胺 (如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷) 与脂肪酸反应, 以在游离胺和脂肪酸羧酸根之间形成酰胺键。可通过用三氟乙酸 (TFA) 处理从产物除去Boc保护基以暴露出伯胺, 后者可偶联到另一羧酸酯 (如所描述), 或者可与马来酸酐反应并且所得的产物环化以产生脂肪酸的活化马来酰亚胺基衍生物。(参见例如 Thompson 等人的 WO 92/16221, 该专利的全部教导内容以引用方式并入本文。)

[0139] 本发明的经修饰抗体可通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。例如, 有机部分可以通过使用胺反应性改性剂 (例如 PEG 的 NHS 酯) 以非位点特异性方式结合至抗体。经修饰的人抗体或抗原结合片段还可通过使抗体或抗原结合片段的二硫键 (例如链内二硫键) 还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可与硫醇反应性修饰剂反应, 以产生本发明的经修饰抗体。包含与本发明抗体特定位点键合的有机部分的修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备, 所述方法诸如为逆向蛋白水解作用 (Fisch 等人, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen 等人, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran 等人, *Protein Sci.* 6 (10):2233-2241 (1997); Itoh 等人, *Bioorg. Chem.*, 24 (1):59-68 (1996); Capellas 等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4):456-463 (1997)), 以及在 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996) 中所描述的方法。

[0140] 针对抗 Tnf 抗体组合物的抗独特型抗体。除了单克隆或嵌合的抗 TNF 抗体之外, 本发明还涉及对本发明的此类抗体有特异性的抗独特型 (抗 Id) 抗体。抗 Id 抗体是能识别通常与另一抗体的抗原结合区相关的独特决定簇的抗体。抗 Id 可以通过用该抗体或其包含 CDR

的区域免疫与Id抗体来源相同的物种和遗传类型(例如小鼠品系)的动物来进行制备。被免疫动物将识别免疫抗体的独特型决定簇且对其应答,从而产生抗Id抗体。抗Id抗体还可以用作“免疫原”以在另一动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗-抗Id抗体。

[0141] 抗Tnf抗体组合物。本发明还提供至少一种抗TNF抗体组合物,其包含如本文所述和/或如本领域已知的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多种抗TNF抗体,它们以非天然存在的组合物、混合物或形式提供。此类组合物包括非天然存在的组合物,所述非天然存在的组合物包含抗TNF抗体氨基酸序列的至少一个或两个全长序列、C-端和/或N-端缺失的变体、结构域、片段或特定变体,所述抗TNF抗体氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8的70%-100%的邻接氨基酸,或其特定片段、结构域或变体。优选的抗TNF抗体组合物包含至少一个或两个全长序列、片段、结构域或变体作为至少一个含CDR或LBR部分,所述含CDR或LBR部分来自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%的抗TNF抗体序列或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%或其特定片段、结构域或变体中的至少一者的40%-99%。此类组合物百分数按照液体或无水溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、摩尔浓度或重量摩尔浓度计算,如本领域已知或本文所描述的。

[0142] 本发明的抗TNF抗体组合物还可包含任何合适和有效量的组合物或药物组合物中的至少一种,该组合物或药物组合物包含至少一种给予需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者的抗TNF抗体,任选地还包含至少一种选自以下的药剂:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或片段、它们的融合蛋白质、或者小分子TNF拮抗剂)、抗风湿剂(例如甲氨蝶呤、金诺芬、金硫葡糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾类抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、镇咳剂、止吐剂、抗溃疡剂、缓泻剂、抗凝血剂、促红细胞生成素(例如红细胞生成素 α)、非格司亭(例如G-CSF、优保津)、沙格司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药物、抗焦虑药物、催眠剂、拟交感神经药物、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(百慕时)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性示例包括但不限于IL-1至IL-23中的任一者。合适的剂量是本领域众所周知的。参见例如Wells等人编辑,Pharmacotherapy Handbook,第二版,Appleton and Lange,Stamford,CT(2000);PDR Pharmacopoeia,Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000,Deluxe编辑,Tarascon Publishing,Loma Linda,CA(2000),上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0143] 此类抗癌药或抗感染药还可包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同配制或共同给予的毒素分子。毒素可任选起到选择性杀死病理性细胞或组织的作用。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。此类毒素可以是(但不限于)纯化或重组毒素或包含毒素的至

少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段,例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一种。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组型细菌或病毒产生的内毒素和外毒素,其可在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况,包括毒素休克,这可导致死亡。此类毒素可包括但不限于肠产毒性大肠杆菌热不稳定肠毒素(LT)、热稳定肠毒素(ST)、志贺氏菌属(*Shigella*)细胞毒素、气单胞菌属(*Aeromonas*)肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌(*Staphylococcal*)肠毒素A(SEA)、B(SEB)或C(SEC)、链球菌(*Streptococcal*)肠毒素等。此类细菌包括但不限于下列细菌的菌株:肠产毒性大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(例如,血清型O157:H7菌株)、葡萄球菌属(例如,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))、酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*))、志贺氏菌属(例如,痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)和宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*))、沙门氏菌(*Salmonella*)属(例如,伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholera-suis*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*))、梭菌(*Clostridium*)属(例如,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*))、弯曲菌(*Camphlobacter*)属(例如,空肠弯曲菌(*Camphlobacter jejuni*)、胎儿弯曲菌(*Camphlobacter fetus*))、螺杆菌(*Helicobacter*)属(例如,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))、气单胞菌(*Aeromonas*)属(例如,温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*))、类志贺邻单胞菌(*Pleisomonas shigelloides*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersina enterocolitica*)、弧菌(*Vibrio*)属(例如,霍乱弧菌(*Vibrios cholerae*)、副溶血弧菌(*VibrioS parahemolyticus*))、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)属、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aerugmosa*)和链球菌(*Streptococci*)。参见例如Stein编辑,NTERNAL MEDICINE,第3版,第1-13页, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans等人编辑, Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 第2版, 第239-254页, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell等人, Principles and Practice of Infectious Diseases, 第3版, Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow等人编辑, The Merck Manual, 第16版, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood等人, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack等人, Science, 248:705-711 (1990)), 这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0144] 本发明的抗TNF抗体化合物、组合物或组合还可包含任何合适辅助剂中的至少一种,诸如但不限于稀释剂、粘结剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。可药用辅助剂是优选的。制备此类无菌溶液的非限制性示例和方法是本领域公知的,诸如但不限于Gennaro编辑, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。可按常规方式选择适合于抗TNF抗体、片段或变体组合物的施用方式、溶解性和/或稳定性的药学上可接受的载体,如本领域所公知或如本文所述。

[0145] 用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括(但不限于):蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和低聚糖;衍生糖例如糖醇、醛糖酸、酯化糖等等;以及多糖或糖聚合物),药物赋形剂和添加剂可以单独或组合的方式存在,其单独或组合具有1-99.99重量%或体积%。示例性的蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,诸如

人血清白蛋白 (HSA)、重组人白蛋白 (rHA)、明胶、酪蛋白等。还可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0146] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括 (例如) 单糖, 如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等; 二糖, 如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等; 多糖, 如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等等; 以及糖醇, 如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇 (葡糖醇)、肌醇等等。用于本发明的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

[0147] 抗TNF抗体组合物还可包含缓冲剂或pH调节剂; 通常, 缓冲剂是从有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐, 例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐; 盐酸三羟甲基氨基甲烷或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组合物的优选缓冲剂是有机酸盐, 例如柠檬酸盐。

[0148] 此外, 本发明的抗TNF抗体组合物可包含聚合物赋形剂/添加剂, 诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖 (聚合糖)、葡萄糖结合剂 (例如环糊精, 诸如2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂 (例如聚山梨醇酯, 诸如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质 (例如磷脂、脂肪酸)、类固醇 (例如胆固醇) 和螯合剂 (例如EDTA)。

[0149] 适合在根据本发明的抗TNF抗体、部分或变体组合物中使用的这些和附加已知的药物赋形剂和/或添加剂是本领域已知的, 例如, 如在以下文献中列出的: “Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 第19版, Williams & Williams, (1995) 和 “Physician's Desk Reference”, 第52版, Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 所述参考文献的公开内容以引用方式全文并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物 (例如糖和醛醇) 和缓冲剂 (例如柠檬酸盐) 或聚合物试剂。

[0150] 制剂。如上面指出, 本发明提供适于药用或兽医用途的稳定制剂, 其优选地为具有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液, 以及含有防腐剂的防腐溶液和制剂, 以及多用途防腐制剂, 所述制剂包含可药用制剂中的至少一种抗TNF抗体。防腐制剂包括至少一种已知的防腐剂或任选地选自至少一种溶于含水稀释剂的苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯代丁醇、氯化镁 (例如六水合物)、烷基苯甲酸酯 (甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。可以使用本领域已知的任何合适的浓度或混合物, 例如0.001%–5%或其中的任何范围或值, 例如但不限于: 0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9, 或其中的任何范围或值。非限制性示例包括: 无防腐剂、0.1%–2%间甲酚 (例如0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.1%–3%苄醇 (例如0.5%、0.9%、1.1%、1.5%、1.9%、2.0%、2.5%)、0.001%–0.5%硫柳汞 (例如0.005%、0.01%)、0.001%–2.0%苯酚 (例如0.05%、0.25%、0.28%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.0005%–1.0%对羟基苯甲酸烷基酯 (例如0.00075%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.005%、0.0075%、0.009%、

0.01%、0.02%、0.05%、0.075%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.75%、0.9%、1.0%)等。

[0151] 如上文指出的,本发明提供了包括包装材料和至少一个小瓶的制品,所述小瓶包含至少一种抗TNF抗体与规定的缓冲剂和/或防腐剂的溶液(任选地溶于水性稀释剂中),其中所述包装材料包括标签,该标签标明此类溶液可以在1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72小时或更长时间段内保存。本发明还包括制品,该制品包括包装材料、包含冻干的至少一种抗TNF抗体的第一小瓶和包含规定缓冲剂或防腐剂的水性稀释剂的第二小瓶,其中所述包装材料包括标签,该标签指导患者在水性稀释剂中重构所述至少一种抗TNF抗体以形成可以在24小时或更长时间段内保存的溶液。

[0152] 根据本发明使用的至少一种抗TNF抗体可以通过重组手段制备,包括从哺乳动物细胞或转基因制品制备,或者可以从其他生物来源纯化,如本文所述或如本领域已知的。

[0153] 如果在湿润/干燥系统中,那么本发明产品中的至少一种抗TNF抗体的范围包括重构后产生约1.0 μ g/ml至约1000mg/ml的浓度的量,但是更低和更高的浓度是可行的并且取决于预期的递送介质,例如溶液制剂将不同于透皮贴剂、经肺、跨粘膜或渗透或微量泵方法。

[0154] 优选的是,水性稀释液还任选包含可药用防腐剂。优选的防腐剂包括选自以下的那些:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。在制剂中使用的防腐剂的浓度是足以产生抗微生物作用的浓度。该浓度取决于所选防腐剂且容易由技术人员确定。

[0155] 其他辅药例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、增强剂可任选并优选加入稀释剂中。等渗剂例如甘油常常以已知的浓度使用。优选加入生理学耐受的缓冲剂以提供改善的pH控制。制剂可以覆盖宽的pH范围,例如约pH 4至约pH 10,优选的范围是约pH 5至约pH 9,最优选的范围是约6.0至约8.0。优选本发明的制剂具有约6.8至约7.8的pH。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂,最优选磷酸钠,特别是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0156] 其他添加剂,诸如可药用的增溶剂,比如Tween 20(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯)、Tween 40(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯)、Tween 80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)、Pluronic F68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和PEG(聚乙二醇)或者非离子型表面活性剂诸如聚山梨醇酯20或80或者泊洛沙姆184或188、Pluronic®多元醇、其他嵌段共聚物,以及螯合物诸如EDTA和EGTA,可任选地添加到制剂或组合物中以减少聚集。如果使用泵或塑料容器来给予制剂,则这些添加剂是特别有用的。可药用表面活性剂的存在减轻了蛋白质聚集的倾向。

[0157] 本发明的制剂可通过这样的方法制备,该方法包括将至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合,该防腐剂选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合。为了制备合适的制剂,例如,将缓冲液中的测定量的至少一种抗TNF抗体与所需的防腐剂在缓冲液中以一定量组合,所述量足以提供所需浓度的蛋白质和防腐剂。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,组分添加的顺序、是否使用另

外的添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的给药浓度和方式进行最优化的因素。

[0158] 受权利要求书保护的制剂可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构,所述第二小瓶容纳水、防腐剂和/或赋形剂,优选地磷酸盐缓冲液和/或盐水和所选的盐。单个溶液小瓶或需要复水的双小瓶都可以多次再次使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,且因此可以提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0159] 本发明受权利要求书保护的制品可用于在即刻给予至24小时或更长时间段内给予。因此,本发明受权利要求书保护的制品能给患者提高明显优点。本发明的制剂可以任选安全地贮存于约2℃至约40℃的温度下,并且在长的时间内保持蛋白质的生物活性,从而使包装标签能标明溶液可在6、12、18、24、36、48、72或96小时或更长的时间段内保持和/或使用。如果使用防腐稀释剂,则该标签可说明使用期可长达1-12个月、半年、一年半和/或两年。

[0160] 本发明的至少一种抗TNF抗体的溶液可通过包括将至少一种抗体在水性稀释剂中混合的方法来制备。混合是用常规的溶解和混合程序来进行。为了制备合适的稀释液,例如,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体以一定量合并,所述量足以提供蛋白质和任选的防腐剂或缓冲剂成所需的浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,组分添加的顺序、是否使用另外的添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的给药浓度和方式进行最优化的因素。

[0161] 受权利要求书保护的产品可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要复水的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,因而提供比目前可用治疗方案的更方便的治疗方案。

[0162] 受权利要求书保护的产品可通过给药房、门诊或其他此类机构和单位提供澄清的溶液或双小瓶来间接地提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,该抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。在这种情况下澄清溶液剂的容积大小可以最多为1升或甚至更大,从而提供大的贮存库,从中可以一次或多次取出较小部分的至少一种抗体溶液用于转移到较小的小瓶内,且通过药房或门诊提供给它们的顾客和/或患者。

[0163] 包括这些单个小瓶系统的识别装置包括用于递送溶液的那些笔式注射器装置,诸如BD Pens、BD Autojector[®]、Humaject[®]、NovoPen[®]、B-D[®]Pen、AutoPen[®]、知OptiPen[®]、GenotropinPen[®]、Genotronorm Pen[®]、Humatro Pen[®]、Reco-Pen[®]、Roferon Pen[®]、Biojector[®]、Iject[®]、J-tip Needle-Free

Injector[®]、Intraject[®]、Medi-Ject[®]、Smartject,例如,如由以下制作或开发的:Becton Dickensen(Franklin Lakes,NJ,www.bectondickenson.com);Disetronic(Burgdorf,Switzerland,www.disetronic.com);Bioject,Portland,Oregon(www.bioject.com);National Medical Products,Weston Medical(Peterborough,UK,www.weston-medical.com);Medi-Ject Corp(Minneapolis,MN,www.mediject.com)。公认的包括双小瓶

系统的装置包括那些用于在筒中将经冻干的药物进行重构的笔式注射器系统,而该筒用于递送该重构溶液,诸如 HumatroPen[®]。

[0164] 本发明受权利要求书保护的产品包括包装材料。包装材料除了提供管理机构要求的信息之外,还提供本产品可得以使用的条件。对于双小瓶、湿润/干燥产品,本发明的包装材料提供指导患者在水性稀释剂中重构至少一种抗TNF抗体以形成溶液,以及在2-24小时或更长时间段内使用溶液的说明书。对于单小瓶溶液产品,标签标明此类溶液可以在2-24小时或更长时间段内使用。本发明受权利要求书保护的产品可用于人药物产品用途。

[0165] 本发明的制剂可通过这样的方法制备,该方法包括将至少一种抗TNF抗体和所选的缓冲剂混合,所述缓冲剂优选地为含有盐水或所选盐的磷酸缓冲液。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗体和缓冲剂在水性稀释剂中混合。例如,为了制备合适的制剂,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体与所需缓冲剂在一定量的水中混合,所述量足以提供所述蛋白质和缓冲剂成所需浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,组分添加的顺序、是否使用另外的添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的给药浓度和方式进行最优化的因素。

[0166] 可以将受权利要求书保护的稳定或防腐的制剂以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂中的防腐剂或缓冲剂和赋形剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要复水的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,因而提供比目前可用治疗方案的更方便的治疗方案。

[0167] 在本文所述的稳定或保存制剂或溶液中的至少一种抗TNF抗体可根据本发明经由多种递送方法施用给患者,所述递送方法包括SC或IM注射;经皮、肺部、经粘膜、植入物、渗透泵、药液筒、微型泵或其他技术人员知道的工具,如本领域众所周知的。

[0168] 治疗应用。本发明还提供使用至少一种本发明的双整联蛋白抗体调节或治疗如本领域已知或本文所述的细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法。

[0169] 本发明还提供用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法,所述疾病包括但不限于肥胖症、免疫相关疾病、心血管疾病、传染性疾病、恶性疾病或神经疾病中的至少一者。

[0170] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法,这些免疫相关疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性发作的青少年类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性脉管炎/韦格纳肉芽肿病、结节病、睾丸炎/输精管切除术逆向程序(vasectomy reversal procedures)、变应性/特应性疾病、哮喘、变应性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、超敏感性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主病、全身性炎性反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌性脓毒症、嗜中性白细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤/出血、灼伤、电离射线暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病理状态、结节病、克隆氏病理状态、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性鼻炎、枯草热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、

荨麻疹、全身性过敏反应、皮炎、恶性贫血、溶血病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入物排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体移植排斥、抗受体超敏反应、格雷夫斯病、雷诺病、B型胰岛素抗性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型超敏反应、全身性红斑狼疮、POEMS综合征 (多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合型结缔组织病、特发性艾迪生病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、白癜风、脉管炎、MI后心切术综合征、IV型超敏反应、接触性皮炎、超敏感性肺炎、同种异体移植排斥、胞内生物导致的肉芽瘤、药物敏感性、新陈代谢/特发性、威尔逊病、血色素沉着、 α -1抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病性视网膜病、桥本甲状腺炎、骨质疏松症、原发性胆汁性肝硬变、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病质、囊性纤维变性、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、家族性噬血细胞淋巴瘤组织细胞增生症、皮肤病症、牛皮癣、秃头、肾病综合征、肾炎、肾小球性肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、先兆子痫、okt3疗法、抗cd3疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法 (例如包括但不限于无力、贫血、恶病质等)、慢性水杨酸中毒等。参见,例如Merck Manual, 第12-17版, Merck&公司, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells等人 (编辑), 第二版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 各自全文以引用方式并入。

[0171] 本发明还提供调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法, 所述心血管疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种: 心肌顿抑综合征、心肌梗塞、充血性心脏衰竭、中风、缺血性中风、出血、急性冠状动脉综合征、动脉硬化、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病性动脉硬化疾病、高血压、动脉高血压、肾血管性高血压、昏厥、休克、心血管系统的梅毒、心脏衰竭、肺心病、原发性肺高血压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房颤动 (持续或阵发性)、后灌注综合征、心肺旁路炎症反应、混乱性或多源性房性心动过速、规则窄QRS心动过速、特异性心律失常、心室颤动、希氏束心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性疾病、冠心病、心绞痛、心肌梗塞、心肌病、扩张型充血性心肌病、限制型心肌病、心脏瓣膜病、心内膜炎、心包疾病、心脏肿瘤、主动脉和外周动脉瘤、主动脉剥离、主动脉的炎症、腹主动脉及其分支的闭塞、周围血管疾病、动脉闭塞性疾病、外周动脉硬化性疾病、血栓闭塞性脉管炎、功能外周动脉疾病、雷诺氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓、静脉曲张、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定型心绞痛、再灌注损伤、后泵综合征、缺血再灌注损伤等等。此类方法可任选地包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。

[0172] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种传染病的方法, 所述传染病包括但不限于以下疾病中的至少一种: 急性或慢性细菌感染, 急性和慢性寄生或传染过程, 包括细菌、病毒和真菌感染、HIV感染/HIV神经病、脑膜炎、肝炎 (甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌0157:h7、溶血尿毒症综合征/溶解血栓性血小板减少性紫癜、疟疾、登革出血热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综

合征、链球菌性肌炎、气性坏疽、结核分枝杆菌、细胞内鸟分枝杆菌、卡氏肺囊虫性肺炎、骨盆炎症性疾病、睾丸炎/附睾炎、军团杆菌、莱姆氏病、a型流行性感冒、EB病毒、病毒性脑炎/无菌性脑膜炎等。

[0173] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述恶性疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:白血病,急性白血病,急性成淋巴细胞性白血病(ALL),B-细胞、T细胞或FAB ALL,急性髓细胞样白血病(AML),慢性髓细胞性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),毛细胞性白血病,骨髓异常增生综合征(MDS),淋巴瘤,何杰金病,恶性淋巴瘤,非何杰金淋巴瘤,Burkitt氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,卡波西肉瘤,结肠直肠癌,胰腺癌,鼻咽癌,恶性组织细胞增多症,恶性肿瘤的肿瘤相关综合征/高血钙综合征,实体瘤,腺癌,肉瘤,恶性黑素瘤,血管瘤,转移性疾病,癌症相关的骨再吸收,癌症相关的骨痛等。

[0174] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法,所述神经疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:神经退行性疾病、多发性硬化症、偏头痛、艾滋病痴呆综合征、脱髓鞘疾病,诸如多发性硬化症和急性横贯性脊髓炎;锥体束外和小脑失调,例如皮质脊髓系统病灶;基底神经节失调或小脑失调;多发性运动失调,诸如亨廷顿氏舞蹈症和老年性舞蹈症;药源性运动失调,诸如阻断CNS多巴胺受体的药物诱发的失调;运动减少性失调,诸如帕金森氏病;渐进性核上性麻痹;小脑结构性病灶;脊髓小脑的退化,诸如脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia)、小脑皮层退化、多发性系统退化(Mencel症、Dejerine-Thomas症、Shi-Drager症和Machado-Joseph症);全身失调(雷弗素姆氏病、无 β 脂蛋白血症、共济失调、毛细管扩张和线粒体多系统失调);脱髓鞘核失调,诸如多发性硬化症、急性横向脊髓炎;以及运动单元的失调,诸如神经源性肌萎缩(前角细胞退化,诸如肌萎缩侧索硬化症、婴儿型骨髓性肌萎缩症和幼年型骨髓性肌萎缩症);阿尔茨海默病;中年唐氏综合征;弥漫性路易体病;老年痴呆路易体型;韦尼克-科尔萨科夫综合征;慢性酒精中毒;克雅二氏症;亚急性硬化性全脑炎、哈勒沃登-施帕茨病(Hallerrorden-Spatz disease);以及拳击员痴呆等等。此类方法可以任选包括将有效量的包含至少一种TNF抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。参见,例如Merck Manual,第16版,Merck&Company, Rahway, NJ (1992)

[0175] 本发明的任何方法都可包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病,其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿剂(例如,甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部用麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐

剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如,阿法依伯汀)、非格司亭(例如,G-CSF、优保津)、沙莫司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药剂、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β -激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。合适的剂量是本领域众所周知的。参见例如Wells等人编辑,Pharmacotherapy Handbook,第二版,Appleton and Lange,Stamford,CT(2000);PDR Pharmacopoeia,Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000,Deluxe编辑,Tarascon Publishing,Loma Linda,CA(2000),上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0176] 适用于本发明的组合物、联合疗法、共同施用、装置和/或方法的TNF拮抗剂(进一步包含本发明的至少一种抗体、其特定部分和变体)包括但不限于抗TNF抗体、其抗原结合片段和与TNF特异性结合的受体分子;预防和/或抑制TNF合成、TNF释放或其对靶细胞的作用的化合物,诸如沙利度胺、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(例如己酮可可碱和咯利普兰)、A2b腺苷受体激动剂和A2b腺苷受体增强剂;预防和/或抑制TNF受体信号传导的化合物,诸如有丝分裂原活化蛋白质(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜TNF切割的化合物,诸如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制TNF活性的化合物,诸如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(例如,卡托普利);以及阻断和/或抑制TNF产生和/或合成的化合物,诸如MAP激酶抑制剂。

[0177] 如本文所用,“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF抗体”、“TNF α 抗体”或片段等可降低、阻断、抑制、消除或干扰体外、原位和/或优选地体内的TNF α 活性。例如,本发明的合适的TNF人抗体可结合TNF α 并且包括抗TNF抗体、其抗原结合片段以及其特异性结合TNF α 的特定突变体或结构域。合适的TNF抗体或片段也可以降低、阻断、消除、干扰、防止和/或抑制TNF RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。

[0178] 嵌合抗体cA2由高亲和力中和小鼠抗人TNF α IgG1抗体的抗原结合可变区(称作A2)和人IgG1 κ 免疫球蛋白的恒定区组成。人IgG1 Fc区域可改善同种异体抗体效应子功能,增加循环血清半衰期和减小抗体的免疫原性。嵌合抗体cA2的亲合力和表位特异性来源于鼠抗体A2的可变区。在具体实施例中,编码鼠抗体A2的可变区的核酸的优选来源是A2杂交瘤细胞系。

[0179] 嵌合A2(cA2)以依赖剂量的方式中和天然的和重组的人TNF α 的细胞毒性效应。根据嵌合抗体cA2和重组人TNF α 的结合测定,计算出嵌合抗体cA2的亲合力常数为 $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的优选方法可见于Harlow等人,antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1988年;Colligan等人编辑,Current Protocols in Immunology,Green Publishing Assoc.and Wiley Interscience,New York,1992-2000年;Kozbor等人,Immunol.Today,4:72-79(1983);Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York(1987-2000);以及Muller,Meth.Enzymol.,92:589-601(1983),这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0180] 在一个具体实施例中,通过标号为c134A的细胞系产生鼠单克隆抗体A2。由标号为

c168A的细胞系产生嵌合抗体cA2。

[0181] 可用于本发明的单克隆抗TNF抗体的附加示例描述于本领域中(参见,例如,美国专利5,231,024; Möller, A.等人, Cytokine 2 (3):162-169 (1990); 美国申请07/943,852 (提交于1992年9月11日); Rathjen等人, 国际公布W0 91/02078 (公布于1991年2月21日); Rubin等人, EP0专利公布0218868 (公布于1987年4月22日); Yone等人, EP0专利公布0 288 088 (1988年10月26日); Liang等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854 (1986); Meager等人, Hybridoma, 第6卷:第305-311页, 1987年; Fendly等人, Hybridoma, 第6卷:第359-369页, 1987年; Bringman等人, Hybridoma, 第6卷:第489-507页, 1987年; 以及 Hirai等人, J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987), 这些参考文献以引用方式全文并入本文)。

[0182] TNF受体分子。可用于本发明的优选TNF受体分子是以高亲和力结合TNF α 的那些(参见,例如, Feldmann等人, 国际公布W0 92/07076 (公布于1992年4月30日); Schall等人, Cell 61:361-370 (1990); 以及 Loetscher等人, Cell 61:351-359 (1990), 这些参考文献以引用方式全文并入本文), 并且任选地具有低免疫原性。具体地讲, 55kDa (p55 TNF-R) 和 75kDa (p75TNF-R) TNF细胞表面受体可用于本发明。这些受体的包含受体的细胞外结构域(ECD)或其功能部分的截短形式(参见,例如 Corcoran等人, Eur. J. Biochem. 223:831-840 (1994))也可用于本发明。已在尿和血清中检测到TNF受体的含有ECD的截短形式为30kDa和40kDa的TNF α 抑制性结合蛋白质(Engelmann, H.等人, J. Biol. 纯应用化学 265:1531-1536 (1990))。TNF受体多聚体分子和TNF免疫受体融合分子及其衍生物和片段或部分,是可用于本发明的方法和组合物的TNF受体分子的另外的例子。可用于本发明的TNF受体分子的特征在于它们能够长时间治疗患者,能很好地或极好地减轻症状,且毒性低。低免疫原性和/或高亲和力,以及其他未确定的性质,可有助于所实现的治疗结果。

[0183] 可用于本发明的TNF受体多聚体分子包含经由一种或多种多肽接头或其他非肽接头(如聚乙二醇(PEG))连接的两个或多个TNF受体的ECD的全部或功能部分。该多聚体分子还可包含分泌蛋白的信号肽以引导该多聚体分子的表达。这些多聚体分子和它们的制备方法已经在美国专利申请08/437,533 (提交于1995年5月9日)中有所描述,其内容以引用方式全文并入本文。

[0184] 可用于本发明方法和组合物的TNF免疫受体融合分子包含一种或多种免疫球蛋白分子的至少一部分和一种或多种TNF受体的全部或功能部分。这些免疫受体融合分子可装配成单体或异型多聚体或同型多聚体。免疫受体融合分子也可以是单价的或多价的。这种TNF免疫受体融合分子的例子是TNF受体/IgG融合蛋白。TNF免疫受体融合分子及它们的制备方法已经在本领域有所描述(Lesslauer等人, Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Peppel等人, J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler等人, Cytokine 6 (6):616-623 (1994); Baker等人, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler等人, 美国专利5,447,851; 以及美国专利申请08/442,133 (提交于1995年5月16日), 上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文)。制备免疫受体融合分子的方法也可见于Capon等人, 美国专利5,116,964; Capon等人, 美国专利5,225,538; 以及Capon等人, Nature 337:525-531 (1989), 这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0185] TNF受体分子的功能等价物、衍生物、片段或区域指TNF受体分子的部分或编码TNF

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

[0186] 细胞因子包括任何已知的细胞因子。参见例如CopewithCytokines.com。细胞因子拮抗剂包括(但不限于)任何抗体、片段或模拟物、任何可溶受体、片段或模拟物、任何小分子拮抗剂或它们的任何组合。

[0187] 医疗性治疗。本发明的任何方法可包括用于治疗TNF介导的障碍的方法,包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用安全且有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病,其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿剂(例如,甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部用麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如,阿法依伯汀)、非格司亭(例如,G-CSF、优保津)、沙莫司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药剂、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β -激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0188] 如本文所用,当涉及用本发明的抗TNF抗体(例如,抗TNF抗体戈利木单抗)的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时,术语“安全”是指与护理标准或另一种比较剂诸如其他抗TNF药剂相比,具有不良事件(AE)和严重不良事件(SAE)的可接受频率和/或可接受严重程度的有利风险:效益比。不良事件是在施用药品的患者中发生的不良医学事件。具体地,当涉及用本发明的抗TNF抗体的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时,安全是指不良事件的可接受频率和/或可接受严重程度,包括例如输注反应、肝胆实验室异常、包括TB在内的感染,以及恶性肿瘤。

[0189] 如本文所用,在组合物、剂量、给药方案、治疗或方法的上下文中使用的术语“疗效”和“有效”是指用本发明的抗TNF抗体(例如,抗TNF抗体戈利木单抗)的特定组合物、剂量、剂型、治疗或方法的效果。疗效可基于病程响应于本发明药剂发生的变化进行测量。例

如,将本发明的抗TNF抗体以足以诱导至少一种反映所治疗疾病严重程度的指标的改善,优选地持续改善的量和时间施用至患者。可评估反映受试者的病、疾病或病症程度的各种指标,以确定治疗的量和时间是否足够。此类指标包括例如临床上公认的疾病严重程度、症状或所考虑病症的表现的指标。改善程度一般由医师或其他受过充分训练的个体确定,他们可基于体征、症状、活组织检查或指示临床症状改善的其他测试结果或任何其他疾病活动度量来确定。例如,可施用本发明的抗TNF抗体以实现与强直性脊柱炎(AS)相关的患者病症的改善。可以使用一个或多个标准评估患者与AS相关的病症的改善,包括例如,强直性脊柱炎疾病活动评分(ASDAS)、巴斯强直性脊柱炎功能指数(BASFI)、巴斯强直性脊柱炎计量指数(BASMI)、36项短期健康调查生理成分汇总(SF-36 PCS)、36项短期健康调查心理成分汇总(SF-36 MCS)和/或强直性脊柱炎生命质量(ASQoL)调查问卷的结果。ASDAS是用于AS的疾病活动评分(DAS),由国际脊柱关节炎学会评估开发。ASDAS使用具有评估的公式计算,这些评估包括例如总背痛、晨僵持续时间、外周疼痛/肿胀和患者总体评估。BASFI是受试者的自我评估,表示为10个问题的平均值,其中8个与受试者的功能解剖学有关,其中2个与受试者应对日常生活的能力有关。BASMI是通过将评估转换为5个评估的评分而计算的总分,包括侧向腰椎侧屈、耳壁距、腰椎屈曲、踝间距和颈椎旋转角度。SF-36是由8个多项评分量表组成的问卷,并且SF-36PSA和SF-36MCS是来自SF-36的汇总评分,允许比较不同疾病的相对负担和不同治疗的相对有益效果。ASQoL是自我管理的患者报告结果工具,由18个项目组成,要求回答与疼痛对睡眠、情绪、动机、应对能力、日常生活活动、独立性、关系和社交生活的影响相关的问题。

[0190] 通常,对病理状况的治疗是通过施用安全且有效量或剂量的至少一种抗TNF抗体组合物来实现,取决于组合物中具有的比例活性,所述组合物总计为平均每剂量每千克患者至少约0.01毫克至500毫克的至少一种抗TNF抗体,优选地至少约0.1毫克至100毫克抗体/千克患者/单次或多次施用。另选地,有效血清浓度可包括0.1 μ g/ml-5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用。合适的剂量是医学从业者已知的,当然要取决于具体疾病状态、待给予组合物的比例活性,以及接受治疗的具体患者。在一些情况下,为了实现所需治疗量,可能有必要提供重复施用,即重复单独施用特定的监控剂量或计量剂量,其中单独施用可以重复直至实现所需日剂量或效果。

[0191] 优选剂量可任选地包括0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500mg/kg/施用,或其任何范围、数值或分数,或实现以下血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500和/或5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用,或其任何范围、数值或分数。

[0192] 另选地,施用的剂量可根据已知的因素而变化,诸如特定试剂的药效特性及其施用方式和途径;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度、同时治疗的种类、治疗的频率以及期望的效果。通常活性成分的剂量可以是约0.1至100毫克/千克体重。通常0.1至50、优选0.1至10毫克/千克/给予或以缓释形式给予能有效获得所需效果。

[0193] 作为一个非限制性示例,人或动物的治疗可以在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52周中的至少一周,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20年中的至少一年,或它们的任何组合,使用单次、输注或重复给药,作为0.1mg/kg至100mg/kg的一次或定期给药的至少一种本发明抗体提供,诸如0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg。

[0194] 适合于内部施用的剂型(组合物),每单位或容器一般容纳约0.1毫克至约500毫克的活性成分。在这些药物组合物中,基于组合物总重量,活性成分一般会以约0.5至99.999重量%的量存在。

[0195] 对于肠胃外施用,抗体可以被配制成溶液剂、混悬剂、乳剂或冻干粉剂,它们与可药用肠胃外介质联合或分开提供。此类介质的例子是水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和1%-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性介质,诸如固定油。介质或冻干粉末可含有维持等渗性的添加剂(例如氯化钠、甘露糖醇)和维持化学稳定性的添加剂(例如缓冲剂和防腐剂)。可通过已知的或合适的技术对制剂进行灭菌。

[0196] 合适的药用载体在Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol的最近版本(该领域的标准参考文本)中有描述。

[0197] 另选的施用。可根据本发明使用许多已知的和开发的施用方式来施用药学有效量的至少一种根据本发明的抗TNF抗体。尽管在下文描述中使用的是经肺给予,但其他给予方式也可根据本发明使用,得到合适的结果。

[0198] 本发明的TNF抗体可使用适用于通过吸入方式或本文所述或本领域已知的其他方式施用的多种装置和方法中的任一种,在载体中作为溶液剂、乳剂、胶体或混悬剂递送或作为干粉剂递送。

[0199] 肠胃外用制剂及施用。用于肠胃外给予的制剂可含有作为普通赋形剂的无菌水或盐水、聚亚烷基二醇例如聚乙二醇、植物来源的油、氢化萘等。注射用水性或油性混悬剂可通过使用合适的乳化剂或湿润剂和悬浮剂根据已知方法来制备。注射用药剂可以是无毒的、非经口施用的稀释剂,诸如溶于溶剂的水溶液剂或无菌注射液或混悬剂。作为可用的介质或溶剂,允许使用水、林格氏溶液、等渗盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌不挥发油。为了这些目的,可以使用任何种类的不挥发性油和脂肪酸,包括天然的或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然的或合成的或半合成的甘油单酯或甘油二酯或甘油三酯。胃肠外给予是本领域知道的,包括但不限于常规形式的注射、如美国专利5,851,198中所述的气压式无针注射装置和如美国专利5,839,446中所述的激光穿孔器装置。

[0200] 可替代的递送方式。本发明还涉及通过以下方式施用至少一种抗TNF抗体：肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速浓注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮方式。可制备至少一种抗TNF抗体组合物用于肠胃外（皮下、肌肉内或静脉内）或任何其他施用，特别是以液体溶液或悬浮液的形式；用于阴道或直肠施用，特别是半固体形态，诸如但不限于乳膏和栓剂；用于口腔或舌下施用，诸如但不限于片剂或胶囊剂形式；或鼻内，诸如但不限于粉末、滴鼻剂或气溶胶或某些药剂的形式；或透皮，诸如但不限于凝胶、软膏、乳液、悬浮液或贴剂输送系统，该贴片输送系统含有化学增强剂诸如二甲基亚砷以改变皮肤结构或增加透皮贴剂中的药物浓度（Junginger等人，“Drug Permeation Enhancement”；Hsieh, D.S. 编辑，第59-90页，(Marcel Dekker, Inc. New York 1994, 以引用方式全文并入本文)，或含有氧化剂，其使得含有蛋白质和肽的制剂能够应用于皮肤上（WO 98/53847），或应用电场以产生瞬间转运途径，诸如电穿孔，或增加带电药物通过皮肤的运动性，诸如离子电渗疗法，或应用超声，诸如透皮吸收超声波（美国专利4,309,989和4,767,402）（上述出版物和专利以引用方式全文并入本文）。

[0201] 经肺/鼻施用。对于经肺施用，优选地至少一种抗TNF抗体组合物以可有效到达肺下部气道或窦的粒度递送。根据本发明，至少一种抗TNF抗体可通过本领域已知用于通过吸入施周治疗剂的多种吸入装置或鼻装置中的任一种来递送。这些能够在患者的窦腔或肺泡中沉积气溶胶化制剂的装置包括定量吸入器、雾化器、干粉产生器、喷雾器等等。其他适用于引导抗体的经肺或鼻施用的装置也是本领域已知的。所有此类装置都可以使用适合于以气溶胶形式分配抗体进行施用的制剂。此类气溶胶可由溶液（水性或非水性）或固体颗粒构成。定量吸入器如 **Ventolin[®]** 定量吸入器通常利用推进气体并且要求在吸气期间启动（参见，例如WO 94/16970、WO 98/35888）。干粉吸入器如Turbuhaler[™]（Astra）、Rotahaler[®]（Glaxo）、Diskus[®]（Glaxo）、Spiros[™]吸入器（Dura）、Inhale Therapeutics公司销售的装置以及 Spinhaler[®] 粉末吸入器（Fisons），都采用呼吸来驱动混合粉末（US 4668218（Astra）、EP 237507（Astra）、WO 97/25086（Glaxo）、WO 94/08552（Dura）、US 5458135（Inhale）、WO 94/06498（Fisons），所有这些专利都以引用方式全文并入本文）。雾化器如AERx[™] Aradigm、Ultravent[®] 雾化器（Mallinckrodt）和Acorn II[®] 雾化器（Marquest Medical Products）（US 5404871 Aradigm、WO 97/22376）（以上参考文献都以引用方式全文并入本文）从溶液产生气溶胶，而计量剂量吸入器、干粉吸入器等则产生小颗粒气溶胶。市售吸入装置的这些具体例子旨在代表适用于实施本发明的具体装置，并且无意于限制本发明的范围。优选地，包含至少一种抗TNF抗体的组合物通过干粉吸入器或喷雾器递送。对于施用本发明的至少一种抗体，吸入装置需具有若干期望特征。例如，有利地，通过吸入装置进行的递送是可靠的、可再现的和准确的。吸入装置可任选地递送小的干燥颗粒，例如小于约10 μ m，优选地约1 μ m-5 μ m，以便容易呼吸。

[0202] TNF抗体组合物作为喷雾施用。通过施压使至少一种抗TNF抗体的悬浮液或溶液通过喷嘴，可以产生包含TNF抗体组合物蛋白质的喷雾。可以选择喷嘴大小和构造、所施加的

压力和液体加料速率来实现所需的输出和粒子大小。例如,通过电场结合毛细管或喷嘴加料,可产生电喷雾。有利地,通过喷雾器递送的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μ m的粒度,优选地粒度在约1 μ m至约5 μ m的范围内,最优选地在约2 μ m至约3 μ m的范围内。

[0203] 适合与喷雾器一起使用的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的制剂通常包含以如下浓度存在于水性溶液中的抗体组合物:约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质/ml溶液或mg/gm,或其中的任何范围或数值,例如但不限于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/ml或mg/gm。该制剂可包括诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂,并且优选包括锌。该制剂还可包含用于稳定抗体组合物蛋白质的赋形剂或试剂,诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质(bulk protein)或碳水化合物。可用于配制抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制抗体组合物蛋白质的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白质制剂还可包含表面活性剂,其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的抗体组合物蛋白质聚集。可以采用多种常规表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。以制剂的重量计,用量将通常在0.001%至14%之间。对于本发明的目的而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等等。用于蛋白质,诸如TNF抗体,或特定部分或变体的配制的本领域已知的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0204] 通过雾化器施用TNF抗体组合物。抗体组合物蛋白质可通过雾化器,诸如喷射雾化器或超声雾化器施用。通常,在喷射式雾化器中,用压缩空气源通过孔口产生高速喷气流。在气体通过喷嘴膨胀时,会产生低压区,其通过连接液体贮液器的毛细管吸取抗体组合物蛋白质溶液。来自毛细管的液体流在其离开管时被剪切成不稳定的细丝或小滴,从而产生气溶胶。可以采用一系列构造、流速和挡板类型从给定的喷射式雾化器产生所需性能特征。在超声波雾化器中,用高频率电能产生振动机械能量,通常使用压电转换器。该能量被直接地或通过耦合流体传递至抗体组合物蛋白质的制剂,从而产生包含该抗体组合物蛋白质的气溶胶。有利地,通过雾化器递送的抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μ m的粒度,优选地粒度在约1 μ m至约5 μ m的范围内,最优选地为约2 μ m至约3 μ m。

[0205] 适于与雾化器(喷射雾化器或超声雾化器)一起使用的至少一种抗TNF抗体的制剂通常包括约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体蛋白质/ml溶液的浓度。该制剂可包括诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂,并且优选包括锌。该制剂还可包含用于使至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质稳定的赋形剂或试剂,诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质或碳水化合物。可用于配制至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制至少一种抗TNF抗体的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗TNF抗体制剂还可包含表面活性剂,其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的至少一种抗TNF抗体的聚集。可以采用多种常规表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。以制剂的重量计,用量将通常在0.001至4%之间的范围内。对于本发明而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等等。本领域已

知的用于蛋白质诸如抗体蛋白质的配制的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0206] 通过定量吸入器施用TNF抗体组合物。在定量吸入器(MDI)中,推进剂、至少一种抗TNF抗体以及任何赋形剂或其他添加剂作为包括液化压缩气体的混合物容纳在罐中。计量阀的致动将混合物释放为气溶胶,优选地含有尺寸范围小于约10 μ m,优选地约1 μ m至约5 μ m,最优选地约2 μ m至约3 μ m的颗粒。所需气溶胶粒度可通过采用通过本领域技术人员已知的各种方法(包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点冷凝等)制备的抗体组合物蛋白质的制剂来获得。优选的定量吸入器包括由3M或Glaxo生产并采用氢氟烃推进剂的那些吸入器。

[0207] 供用于定量吸入器装置的至少一种抗TNF抗体的制剂通常会包括含有至少一种抗TNF抗体的微细粉末在非水性介质中作为悬浮液,例如,在表面活性剂的帮助下悬浮在推进剂中。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料,例如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a(氢氟烷烃-134a)、HFA-227(氢氟烷烃-227)在内的烃类。优选的是,推进剂为氢氟烃。可选择表面活性剂来使所述至少一种抗TNF抗体在推进剂中作为悬浮液而得到稳定,保护活性剂免受化学降解等。适宜的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等等。在一些情况下,使用诸如乙醇之类的溶剂的溶液气溶胶是优选的。另外的本领域已知用于配制蛋白质的物剂也可包含在该制剂中。

[0208] 本领域普通技术人员会认识到,本发明的方法可通过经由本文中未描述的装置经肺施用至少一种抗TNF抗体组合物来实现。

[0209] 口服制剂及施用。口服制剂依赖于共同给予佐剂(如,间苯二酚和非离子型表面活性剂例如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚)以人工增加肠壁的渗透性,以及共同给予酶抑制剂(如,胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸(DFF)和抑肽酶(trasylo1))以抑制酶促降解。可将供口服的固体型剂型的活性组分化合物与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露糖醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、几丁质、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成的或半合成的聚合物和甘油酯。这些剂型还可含有其他类型的添加剂,例如无活性稀释剂、润滑剂诸如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂诸如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚、抗氧化剂诸如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、甜味剂、矫味剂、香味剂等。

[0210] 片剂和丸剂可进一步加工成肠溶衣包衣制剂。供口服的液体制剂包括可允许用于医学用途的乳剂、糖浆剂、酏剂、混悬剂和溶液制剂。这些制剂可以含有常用于所述领域的无活性稀释剂,例如水。脂质体作为胰岛素的药物递送系统已有描述(美国专利4,239,754)。最近,混合氨基酸的人工聚合物(类蛋白)的微球体已用于递送药物(美国专利4,925,673)。此外,美国专利5,879,681和美国专利5,587,753中描述的载体化合物用于经口递送生物活性剂是本领域已知的。

[0211] 粘膜用制剂及施用。为了透过粘膜表面吸收,施用至少一种抗TNF抗体的组合物和方法包括乳剂,其包含许多亚微米颗粒、粘膜粘附性大分子、生物活性肽和水性连续相,其通过实现乳剂颗粒的粘膜粘附来促进透过粘膜表面的吸收(美国专利5,514,670)。适于施用本发明的乳剂的粘膜表面可包括角膜、结膜、口腔、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠给予途径。用于阴道和直肠给予的制剂,如栓剂,可含有例如聚亚烷基二醇、凡士林、可可脂等作为赋形剂。鼻内给予制剂可以是固体并且含有例如乳糖作为赋形剂,或可以是鼻滴剂的水

性或油性溶液。对于口腔施用,赋形剂包括糖类、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等(美国专利5,849,695)。

[0212] 透皮制剂及施用。对于透皮施用,将该至少一种抗TNF抗体包囊在递送装置诸如脂质体或聚合型纳米颗粒、微粒、微胶囊或微球体(统称为微粒,除非特别指出)中。有多种合适的装置是已知的,包括由合成聚合物和天然聚合物制成的微颗粒,所述合成聚合物诸如聚羧基酸(诸如聚乳酸、聚乙醇酸以及它们的共聚物)、聚原酸酯、聚酸酐和聚磷腈,所述天然聚合物诸如胶原、聚氨基酸、白蛋白和其他蛋白质、海藻酸盐和其他多糖以及它们的组合(美国专利5,814,599)。

[0213] 长期施用及制剂。通过一次给予在长时间周期内,例如一周到一年内将本发明化合物递送给受试者,有时候可能是期望的。可以利用多种缓释剂型、储库(depot)剂型或植入剂型。例如,剂型可含有化合物的药学上可接受的无毒盐,该盐在体液中具有低溶解度,例如,(a)与多元酸诸如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、双羟萘酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘单磺酸或二磺酸、聚半乳酸等的酸加成盐;(b)具有多价金属阳离子诸如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等的盐,或者具有由例如N,N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的有机阳离子的盐;或(c)(a)和(b)的组合,例如鞣酸锌盐。此外,可将本发明的化合物或,优选地,相对难溶的盐例如上面所述的那些盐在适于注射的凝胶中,例如,在具有例如芝麻油的单硬脂酸铝凝胶中配制。尤其优选的盐为锌盐、鞣酸锌盐、双羟萘酸盐等等。用于注射的另一种类型的缓释储库型制剂含有经分散以在缓慢降解、无毒、非抗原性聚合物中包囊的化合物或盐,所述聚合物为例如美国专利3,773,919中描述的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。还可将化合物或优选地,相对难溶的盐例如上面所述的那些盐配制成胆固醇基质硅橡胶丸,尤其为了用于动物。附加缓释、储存或植入制剂,例如气体或液体脂质体在文献(美国专利5,770,222,以及“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,N.Y.,1978)中是已知的。

[0214] 已总体地描述了本发明,通过参考下面的实例将更容易理解本发明,所述实例仅以示例的方式给出并且无意于作为限制。

[0215] 实施例1:TNF抗体在哺乳动物细胞中的克隆和表达。

[0216] 典型的哺乳动物表达载体含有至少一个启动子元件,其介导mRNA和抗体编码序列的转录起始,所述表达载体还含有转录物的转录终止和多腺苷酸化所需的信号。其他元件包括增强子、Kozak序列以及侧接有助于RNA剪接的供体和受体位点的间插序列。高效率的转录可以使用下列序列来实现:来自SV40的早期启动子和晚期启动子,来自逆转录病毒例如RSV、HTLV、HIV的长末端重复序列(LTR),和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的合适表达载体包括例如诸如下面的载体:pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN或pLNCX(Clontech Labs,Palo Alto,CA)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen)、PSVL和PMSG(Pharmacia,Uppsala,Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)和pBC12MI(ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人Hela 293、H9和Jurkat细胞、小鼠NIH3T3和C127细胞、Cos 1、Cos7和CV 1、quail QC1-3细胞、小鼠L细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞。

[0217] 另选地,基因可以在含有整合进染色体内的所述基因的稳定细胞系中表达。与选

择标记例如dhfr、gpt、新霉素或潮霉素共转染可使得能鉴定和分离转染的细胞。

[0218] 还可以扩增所转染的基因以大量表达所编码的抗体。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记可用于开发携带几百或甚至几千拷贝的所关注基因的细胞系。另一种可用的选择标记是谷氨酰胺合酶(GS)(Murphy等人,Biochem.J.227:277-279(1991);Bebbington等人,Bio/Technology 10:169-175(1992))。使用这些标记,将哺乳动物细胞在选择培养基中生长,具有最高抗性的细胞得以选择。这些细胞系含有整合至染色体内的扩增基因。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和NS0细胞通常用于生产抗体。

[0219] 表达载体pC1和pC4含有Rous肉瘤病毒的强启动子(LTR)(Cullen等人,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985))和CMV-增强子的片段(Boshart等人,Cell 41:521-530(1985))。多克隆位点,例如,具有限制性内切酶切割位点BamHI、XbaI和Asp718的多克隆位点,有助于所关注基因的克隆。载体另外含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子、多腺苷酸化和终止信号。

[0220] 在CHO细胞中的克隆和表达。将载体pC4用于表达TNF抗体。质粒pC4是质粒pSV2-dhfr(ATCC登记号37146)的衍生物。该质粒含有在SV40早期启动子控制下的小鼠DHFR基因。用这些质粒转染的缺乏二氢叶酸活性的中国仓鼠卵巢细胞或其他细胞,可通过使细胞在补充有化学治疗剂甲氨蝶呤的选择培养基(例如alpha minus MEM,Life Technologies,Gaithersburg,MD)中生长进行选择。DHFR基因在对甲氨蝶呤(MTX)具有抗性的细胞中的扩增已得到充分记载(参见,例如,F.W.Alt等人,J.Biol.纯应用化学253:1357-1370(1978);J.L.Hamlin和C.Ma,Biochem.et Biophys.Acta 1097:107-143(1990);以及M.J.Page和M.A.Sydenham,Biotechnology9:64-68(1991))。在浓度渐增的MTX中生长的细胞由于DHFR基因扩增造成超量产生靶酶DHFR而发展出对药物的抗性。如果第二基因与DHFR基因连接,那么它通常被共扩增和过表达。本领域已知的是,该方法可用于开发携带超过1,000个拷贝的扩增基因的细胞系。随后,当甲氨蝶呤被取出时,获得含有整合到宿主细胞的一个或多个染色体内的扩增基因的细胞系。

[0221] 为了表达所关注的基因,质粒pC4含有Rous肉瘤病毒长末端重复序列(LTR)的强启动子(Cullen等人,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985))和从人巨细胞病毒(CMV)即刻早期基因的增强子分离的片段(Boshart等人,Cell 41:521-530(1985))。启动子的下游是使基因能整合的BamHI、XbaI和Asp718限制性内切酶切割位点。在这些克隆位点之后,该质粒含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子和多腺苷酸化位点。其他高效率的启动子也可以用于表达,例如人 β -肌动蛋白启动子、SV40早期或晚期启动子或来自其他逆转录病毒例如HIV和HTLVI的长末端重复序列。Clontech的Tet-Off和Tet-On基因表达系统和类似系统可以用于在哺乳动物细胞中以受调控的方式表达TNF(M.Gossen和H.Bisard,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992))。对于mRNA的多腺苷酸化,也可以使用(例如)来自人生长激素或珠蛋白基因的其他信号。携带整合至染色体中的所关注基因的的稳定细胞系也可以在与选择标记例如gpt、G418或潮霉素共转染时进行选择。有利的是在开始时使用不止一种选择标记,例如,G418加上甲氨蝶呤。

[0222] 将质粒pC4用限制性内切酶消化,然后通过本领域已知的方法用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从1%琼脂糖凝胶分离载体。

[0223] 然后将编码所述分离的可变区和恒定区的DNA与该去磷酸化的载体用T4DNA连接

酶连接。然后转化大肠杆菌HB101或XL-1Blue细胞,并使用例如限制性内切酶分析来鉴定含有插入到质粒pC4中的片段的细菌。

[0224] 将缺乏活性DHFR基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞用于转染。使用脂质体将5 μ g表达质粒pC4与0.5 μ g质粒pSV2-neo共转染。质粒pSV2-neo含有显性选择标记即来自Tn5的neo基因,其编码赋予对包括G418在内的一组抗生素的抗性的酶。将细胞接种在补充有1 μ g/ml G418的alpha minus MEM中。2天后,将细胞用胰蛋白酶处理并接种在杂交瘤克隆板(Greiner, Germany)中的补充有10ng/ml、25ng/ml或50ng/ml甲氨蝶呤加1 μ g/ml G418的alpha minus MEM中。约10-14天后,将单一克隆用胰蛋白酶处理并接种在6孔培养皿或10ml瓶中,其中使用不同浓度的甲氨蝶呤(50nM、100nM、200nM、400nM、800nM)。然后将在最高浓度甲氨蝶呤下生长的克隆转移到容纳更高浓度甲氨蝶呤(1mM、2mM、5mM、10mM、20mM)的新的6孔板。重复相同的步骤直到获得在100-200mM浓度下生长的克隆。例如,通过SDS-PAGE和蛋白质印迹或通过反相HPLC分析,可对所需基因产物的表达进行分析。

[0225] 实施例2:使用转基因小鼠产生与人TNF反应的高亲和力人IgG单克隆抗体。

[0226] 总结。已经使用了含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生高亲和力的、完全人的单克隆抗体,该抗体可在治疗上用于抑制TNF治疗一种或多种TNF介导的疾病的作用。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J $\times$ C57/BL6/J)F₂杂交小鼠用人重组TNF免疫(Taylor等人, Intl. Immunol. 6:579-591 (1993); Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996); Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996))。几次融合产生了一组或多组完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。全部均为IgG1 κ 。发现此类抗体具有介于 1×10^9 和 9×10^{12} 之间的亲和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们成为用于在TNF相关疾病、病理或失调中的治疗应用的合适候选物。

[0227] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹腔内注射;IV-静脉注射;Mab-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0228] 材料和方法。

[0229] 动物。可表达人抗体的转基因小鼠是本领域已知的(并且可商购获得(例如,来自GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Freemont, CA等),其表达人免疫球蛋白而不是小鼠IgM或Ig κ 。例如,此类转基因小鼠含有人序列转基因,该人序列转基因经历V(D)J连接、重链类转换和体细胞突变,以产生全套人序列免疫球蛋白(Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994))。轻链转基因可例如部分来自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 区。另外,重链转基因可编码人 μ 和人 γ 1(Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996))和/或 γ 3恒定区两者。来源于适当基因型谱系的小鼠可用于免疫和融合过程以产生针对TNF的完全人单克隆抗体。

[0230] 免疫。一个或多个免疫程序可用于生成抗TNF人杂交瘤。前几次融合可在以下示例性免疫方案之后执行,但是也可使用其他类似的已知方案。用1 μ g-1000 μ g重组人TNF对几只14-20周龄雌性和/或手术阉割的转基因雄性小鼠IP和/或ID免疫,该重组人TNF用等体积的

TITERMAX或完全弗氏佐剂乳化,最终体积为100 μ L-400 μ L(例如,200)。每只小鼠还可任选地在2个SQ位点中的每一个处接受溶于100 μ L生理盐水的1 μ g-10 μ g。然后可在1-7、5-12、10-18、17-25和/或21-34天后用TNF对小鼠进行IP(1 μ g-400 μ g)和SQ(1 μ g-400 μ g $\times$ 2)免疫,TNF用等体积的TITERMAX或不完全弗氏佐剂乳化。小鼠可在12-25和25-40天后通过眼眶后穿刺进行放血而不采用抗凝血剂。然后允许血液在室温下凝结1小时,收集血清并根据已知方法使用TNF EIA测定法滴定。当重复注射不会导致滴度增加时,执行融合。此时,可给小鼠提供在100 μ L生理盐水中稀释的1 μ g-400 μ g TNF的最终IV加强注射。三天后,通过颈椎脱位对小鼠实施安乐死,将脾无菌取出并浸于含有100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和0.25 μ g/mL两性霉素B(PSA)的10mL冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。通过用PSA-PBS无菌灌注脾脏来收获脾细胞。用冷PSA-PBS洗涤细胞一次,用台盼蓝染料排除法计数细胞,并将细胞重悬于含有25mM Hepes的RPMI 1640培养基中。

[0231] 细胞融合。根据已知方法,例如本领域已知的方法,可将小鼠骨髓瘤细胞与活脾细胞以1:1至1:10的比例进行融合。作为非限制性示例,可将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。然后经过30秒,将沉淀物于37 $^{\circ}$ C下缓慢重悬于1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液(PEG分子量1,450,Sigma)。然后通过1分钟内缓慢添加10.5mL含有25mM Hepes(37 $^{\circ}$ C)的RPMI 1640培养基来终止融合。将融合的细胞以500rpm-1500rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基(含有25mM Hepes、10%胎儿克隆I血清(Hyclone)、1mM丙酮酸钠、4mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL庆大霉素、2.5%Origen培养补充物(Fisher)的RPMI 1640培养基,10%653条件RPMI 1640/Hepes培养基、50 μ M 2-巯基乙醇、100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤和16 μ M胸苷),并且然后以200 μ L/孔接种于15个96孔平底组织培养板中。然后将板置于容纳5%CO₂和95%空气的37 $^{\circ}$ C潮湿培养箱中,并保持7-10天。

[0232] 小鼠血清中人IgG抗TNF抗体的检测。固相EIA可用于筛选小鼠血清中对人TNF特异的人IgG抗体。简而言之,可在PBS中以2 μ g/mL的TNF包被板过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,可用PBS中的1% (w/v) BSA在室温下以200 μ L/孔封闭孔1小时。立即使用板或将其在-20 $^{\circ}$ C下冷冻以备将来使用。将小鼠血清稀释液在室温下以50 μ L/孔在TNF包被板上温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1%BSA-PBS中的50 μ L/孔HRP标记的山羊抗人IgG(Fc特异性)在室温下探测1小时。可再次洗涤板,并且在室温下添加100 μ L/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液(0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠,0.01%H₂O₂和1mg/mL OPD)并保持15分钟。然后以25 μ L/孔添加终止液(4N硫酸),并经由自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0233] 杂交瘤上清液中完全人免疫球蛋白的检测。可使用合适的EIA检测分泌完全人免疫球蛋白的生长阳性杂交瘤。简而言之,96孔弹出板(VWR,610744)可在4 $^{\circ}$ C下在碳酸钠缓冲液中用10 μ g/mL山羊抗人IgG Fc包被过夜。将板洗涤并在37 $^{\circ}$ C下用1%BSA-PBS封闭1小时,然后立即使用或在-20 $^{\circ}$ C下冷冻。将未稀释的杂交瘤上清液在37 $^{\circ}$ C下在板上温育1小时。洗涤板,然后用以1:10,000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人 κ 在37 $^{\circ}$ C下探测1小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。

[0234] 完全人抗TNF反应性的测定。如上所述,可使用合适的RIA或其他测定法同时测定杂交瘤对TNF的反应性。例如,如上所述将上清液在山羊抗人IgG Fc板上温育、洗涤,并且然后用放射性标记的TNF以适当计数/孔在室温下探测1小时。用PBS洗涤孔两次,并且使用合

适的计数器定量结合的放射性标记的TNF。

[0235] 可在细胞培养物中扩增人IgG1 κ 抗TNF分泌杂交瘤,并通过有限稀释连续亚克隆。可将所得克隆群体扩增并在冷冻培养基(95%FBS,5%DMSO)中冷冻保存并储存在液氮中。

[0236] 同种型。抗体的同种型测定可使用EIA以与用于筛选特定滴度的小鼠免疫血清相似的形式完成。如上所述,可将TNF包被在96孔板上,并且可将2 μ g/mL的纯化抗体在室温下在平板上温育一小时。将板洗涤并用1:4000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁或HR标记的山羊抗人IgG₃在室温下探测1小时。再次洗涤该板,并且如上所述用底物溶液温育。

[0237] 人抗人TNF抗体与人TNF的结合动力学。例如,可使用TNF捕获EIA和BIAcore技术适当地评估抗体的结合特征。在如上所述的测定法中,可评估用于结合到包被有2 μ g/mL TNF的EIA板上的经纯化人TNF抗体的分级浓度。然后OD可表示为显示相对结合效率的半对数图。

[0238] 定量结合常数可例如如下获得,或通过任何其他已知的合适方法获得。将BIAcore CM-5(羧甲基)芯片置于BIAcore 2000单元中。将HBS缓冲液(0.01M HEPES,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%v/v P20表面活性剂,pH 7.4)以5 μ L/分钟流过芯片的流动池,直至获得稳定的基线。将溶于200 μ L水中的15mg EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基-氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐)溶液(100 μ L)添加到溶于200 μ L水中的100 μ L的2.3mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)溶液。将四十(40) μ L所得溶液注射到芯片上。将6 μ L人TNF溶液(15 μ g/mL,溶于10mM乙酸钠中,pH4.8)注射到芯片上,导致约500RU的增加。将缓冲液改变为TBS/Ca/Mg/BSA运行缓冲液(20mM Tris,0.15M氯化钠,2mM氯化钙,2mM乙酸镁,0.5%Triton X-100,25 μ g/mL BSA,pH 7.4),并在芯片上流动过夜以使其平衡,并水解或封闭任何未反应的琥珀酰亚胺酯。

[0239] 抗体以33.33nM、16.67nM、8.33nM和4.17nM溶解于运行缓冲液中。将流量调节至30 μ L/min,并且将仪器温度调节至25 $^{\circ}$ C。两个流动池用于动力学运行,一个为固定了TNF的流动池(样本),另一个为未衍生化的流动池(空白)。将120 μ L的每个抗体浓度以30 μ L/min注射到流动池上(缔合阶段),随后是不间断的360秒缓冲液流(解离阶段)。通过两次连续注射30 μ L的2M硫氰酸胍,再生芯片表面(组织坏死因子 α /抗体复合物解离)。

[0240] 如本领域已知的,使用BIA评价3.0或CLAMP 2.0进行数据分析。对于每个抗体浓度,从样本传感图中减去空白传感图。对解离(k_d ,sec $^{-1}$)和缔合(k_a ,mol $^{-1}$ sec $^{-1}$)以及计算(k_d/k_a)的解离常数(K_D ,mol)进行整体拟合。如果抗体亲和力足够高,使得所捕获的抗体的RU>100,则进行抗体的附加稀释。

[0241] 结果与讨论

[0242] 产生抗人TNF单克隆抗体。执行几次融合,并将每个融合体接种在15个板(1440孔/融合体)中,产生数十种对人TNF特异的抗体。其中一些被发现由人Ig链和小鼠Ig链的组合组成。剩余的杂交瘤分泌的抗TNF抗体仅由人重链和轻链组成。在人杂交瘤中,预计所有杂交瘤都是IgG1 κ 。

[0243] 人抗人TNF抗体的结合动力学。ELISA分析证实,来自大多数或所有这些杂交瘤的纯化抗体以浓度依赖性方式结合TNF。图1至图2示出了这些抗体的相对结合效率的结果。在这种情况下,测量抗体对其关联抗原(表位)的亲合力。应当指出的是,将TNF直接结合到EIA板可引起蛋白质变性,并且表观结合亲和力不能反映与不可变性蛋白质的结合。在一定浓

度范围内发现了50%的结合。

[0244] 定量结合常数是使用对该人抗体的BIAcore分析来获得,揭示出几种人单克隆抗体具有非常高的亲和力, K_D 在 1×10^{-9} 至 7×10^{-12} 的范围内。

[0245] 结论。

[0246] 利用来自含有用人TNF免疫的人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行几次融合。产生了一组IgG1 κ 同种型的几种完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。几种所产生的抗体具有介于 1×10^9 和 9×10^{12} 之间的亲和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们适用于在TNF依赖性疾病、病理或相关病症中的治疗应用。

[0247] 实施例3:产生对人TNF α 具有反应性的人IgG单克隆抗体。

[0248] 总结。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J x C57BL/6J)F₂杂交小鼠(1-4)用重组人TNF α 免疫。一种被命名为GenTNV的融合体产生了八种完全人IgG1 κ 单克隆抗体,其结合到固定的重组人TNF α 。鉴定后不久,将八种细胞系移交至分子生物学研究所(Molecular Biology)进行进一步表征。因为这些Mab在序列上完全是人的,所以它们在人体内的免疫原性预计比cA2(类克)低。

[0249] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;H-重链;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹膜内注射;IV-静脉注射;Mab-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;TNF α -肿瘤坏死因子 α ;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0250] 简介。含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠用于产生对重组人TNF α 特异的完全人单克隆抗体。希望可以使用这些独特的抗体,因为cA2(瑞米凯德)用于治疗性地抑制TNF α 介导的疾病中涉及的炎症过程,具有增加的血清半衰期和降低的与免疫原性相关的副作用的有益效果。

[0251] 材料和方法。

[0252] 动物。GenPharm International已经开发了表达人免疫球蛋白但不表达小鼠IgM或Ig κ 的转基因小鼠。这些小鼠含有功能性人抗体转基因,其经历V(D)J接合、重链类切换和体细胞突变,以产生抗原特异性人免疫球蛋白的全集(1)。轻链转基因部分源自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 基因座。除了几个VH基因之外,重链(HC)转基因编码人 μ 和人 γ 1(2)和/或 γ 3个恒定区。源自HCo12/KCo5基因型谱系的小鼠用于免疫和融合过程,以产生本文所述的单克隆抗体。

[0253] 人TNF α 的纯化。使用填充有与Sepharose 4B(Pharmacia)偶联的TNF α 受体-Fc融合蛋白质(p55-sf2)(5)的柱,通过亲和层析从C237A细胞的组织培养上清液中纯化人TNF α 。将细胞上清液与其体积的10 $\times$ Dulbecco PBS(D-PBS)的九分之一混合,并在4 $^{\circ}$ C以4mL/min通过柱。然后用PBS洗涤柱,用0.1M柠檬酸钠、pH 3.5洗脱TNF α ,用2M Tris-HCl pH 8.5中和。将纯化的TNF α 缓冲液交换到10mM Tris、0.12M氯化钠pH 7.5中,并通过0.2 μ m注射器过滤器过滤。

[0254] 免疫。在第0天、第12天和第28天,将约16周龄的雌性GenPharm小鼠用IP(200 μ L)和ID(尾部底部100 μ L)进行免疫,总共100 μ g TNF α (批次JG102298或JG102098)用等体积的

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

[0255] 细胞系。非分泌性小鼠骨髓瘤融合伴侣653在Centocor的产品开发组中于5-14-97接收到细胞生物学技术服务 (CBS) 组。在补充有10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、1mM丙酮酸钠、0.1mM NEAA、2mM L-谷氨酰胺 (均来自JRH Biosciences) 的RPMI培养基 (JRH Biosciences) 中扩增细胞系,并在95%FBS和5%DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。将细胞维持在对数期培养物中直至融合。用PBS洗涤、计数,并在融合前经由台盼蓝染料排除法确定细胞活力 (>95%)。

[0256] 人TNF α 由重组细胞系产生,命名为C237A,在Centocor的Molecular Biology中产生。在补充有5% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、2mM L-谷氨酰胺 (均来自JRH Biosciences) 和0.5g/mL霉酚酸的IMDM培养基 (JRH Biosciences) 中扩增细胞系,并在95%FBS和5%DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中 (13)。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。

[0257] 细胞融合。使用1:1比例的653个鼠骨髓瘤细胞和活的鼠脾细胞进行细胞融合。简而言之,将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。在30℃下,将沉淀在1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液 (PEG分子量为1,450g/mol, Sigma) 中于37℃缓慢重悬浮。通过在1分钟内缓慢添加10.5mL RPMI培养基 (无添加剂) (JRH) (37℃) 来终止融合。将融合细胞以750rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基 (含有10%胎牛血清 (JRH)、1mM丙酮酸钠、2mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL庆大霉素、2.5%Origen培养补充剂 (Fisher)、50 μ M 2-巯基乙醇、1%653条件反射RPMI媒介、100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤和16 μ M胸苷的RPMI/HEPES培养基中), 并且然后以200 μ L/孔在五个96孔平底组织培养板中铺板。然后将板置于容纳5%CO₂和95%空气的潮湿37℃培养箱中7-10天。

[0258] 检测小鼠血清中的人IgG抗TNF α 抗体。固相EIA用于筛选针对人TNF α 特异性的人IgG抗体的小鼠血清。简而言之,将板用PBS中1 μ g/mL的TNF α 包被过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,将孔用PBS中的1% (w/v) BSA、200 μ L/孔在室温下封闭1小时。立即使用板或在-20℃冷冻备用。将小鼠血清在人TNF α 包被的板上以50 μ L/孔在室温下以两倍连续稀释温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1%BSA-PBS中的50 μ L/孔HRP标记的山羊抗人IgG, Fc特异性 (准确) 在室温下探测1小时。再次洗涤板,并在室温下添加100 μ L/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液 (0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠, 0.01% H₂O₂和1mg/mL OPD) 15分钟。然后以25 μ L/孔添加终止溶液 (4N硫酸), 并使用自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0259] 杂交瘤上清液中人全免疫球蛋白的检测。因为GenPharm小鼠能够产生小鼠和人免疫球蛋白链两者,所以使用两个单独的EIA测定来测试生长阳性杂交瘤克隆中是否存在人轻链和人重链。如上所述包被板,并将未稀释的杂交瘤上清液在板上于37℃温育一小时。洗涤板,并用以1:10,000稀释于1%BSA-HBSS中的HRP缀合的山羊抗人 κ (Southern Biotech) 抗体或在1%BSA-HBSS中在37℃下稀释至1:30,000的HR缀合的山羊抗人IgG Fc特异性抗体探测1小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。丢弃在抗人 κ 和抗人IgG Fc EIA形式中均未给出阳性信号的杂交瘤克隆。

[0260] 同种型。使用EIA以与用于筛查小鼠免疫血清的特定滴度相似的形式完成抗体的同种型确定。将EIA板用10: g/mL的山羊抗人IgG (H+L) 在碳酸钠缓冲液中在4E℃下包被过夜,并如上所述进行封闭。将来自24孔培养物的纯净上清液在板上在室温下温育一小时。洗涤板,并用以1:4000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ (结合位点) 在室温下探测一小时。再次洗涤板,并如上所述与底物溶液一起温育。

[0261] 结果与讨论。产生完全人抗人TNF α 单克隆抗体。从用重组人TNF α 蛋白质免疫的GenPharm小鼠中执行一次名为GenTNV的融合。通过该融合,筛选出196个生长阳性杂种。鉴定出八种杂交瘤细胞系,其分泌与人TNF α 反应的完全人IgG抗体。这八个细胞系各自分泌人IgG1 κ 同种型的免疫球蛋白,并通过有限稀释将其全部亚克隆两次以获得稳定的细胞系(>90%同质)。表1列出了细胞系名称和相应的C代码命名。将细胞系中的每一个在储存在液氮中的12小瓶研究细胞库中冷冻。

[0262] 从八孔细胞系中的每一个的24孔培养皿的孔中收集的亲本细胞在2-18-99移交给Molecular Biology组用于转染和进一步表征。

[0263] 表1:GenTNV细胞系命名

名称	C 代码命名
GenTNV14.17.12	C414A
GenTNV15.28.11	C415A
GenTNV32.2.16	C416A
[0264] GenTNV86.14.34	C417A
GenTNV118.3.36	C418A
GenTNV122.23.2	C419A
GenTNV148.26.12	C420A
GenTNV196.9.1	C421A

[0265] 结论。

[0266] 使用来自含有人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行GenTNV融合,这些转基因用在Centocor制备的重组人TNF α 免疫。生成了IgG1 κ 同种型的八种完全人TNF α 反应性IgG单克隆抗体。将亲本细胞系转移到Molecular Biology组以进一步表征和开发。与瑞米凯德相比,这些新的人抗体之一可证明在抗炎中有益,具有降低的免疫原性和过敏性并发症的潜在有益效果。

[0267] 参考文献

[0268] Taylor等人,International Immunology 6:579-591(1993)。

[0269] Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994)。

[0270] Neuberger,M.Nature Biotechnology 14:826(1996)。

[0271] Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)。

[0272] Scallan等人, Cytokine 7:759-770 (1995)。

[0273] 实施例4:克隆和制备表达人抗TNF α 抗体的细胞系。

[0274] 总结。发现一组具有TNV命名的八种人单克隆抗体(mAb)以明显高的亲和力结合固定的人TNF α 。显示八种mAb中的七种,以有效阻断huTNF α 与重组TNF受体的结合。编码七种mAb的DNA的序列分析证实所有mAb都具有人V区。DNA序列还揭示三对mAb彼此相同,使得八组mAb的原始组仅含有四种不同的mAb,由TNV14、TNV15、TNV148和TNV196代表。基于对mAb的推导的氨基酸序列的分析和体外TNF α 中和数据的结果,选择mAb TNV148和TNV14用于进一步研究。

[0275] 因为在数据库搜索期间,在相同亚组的其他人抗体中的该位置未发现TNV148重链的第75位(框架3)的脯氨酸残基,所以执行定点DNA诱变以在该位置编码丝氨酸残基,以使其符合已知的种系框架e序列。将丝氨酸修饰的mAb命名为TNV148B。将编码TNV148B和TNV14的重链和轻链可变区的PCR扩增的DNA克隆到新制备的表达载体中,该载体基于最近克隆的另一种人mAb(12B75)的重链和轻链基因,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies, Compositions, Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公开为WO 02/12500,其以引用方式全文并入本文。

[0276] 用相应的重链和轻链表达质粒转染P3X63Ag8.653(653)细胞或Sp2/0-Ag14(Sp2/0)小鼠骨髓瘤细胞,并通过两轮亚克隆筛选产生高水平重组TNV148B和TNV14(rTNV148B和rTNV14)mAb的细胞系。生长曲线的评价和mAb产生随着时间的推移的稳定性表明,653-转染子克隆C466D和C466C在用过的培养物中稳定地产生约125: g/ml的rTNV148B mAb,而Sp2/0转染子1.73-12-122(C467A)在周过的培养物中稳定地产生约25: g/ml的rTNV148B mAb。类似的分析表明,Sp2/0-转染子克隆C476A在用过的培养物中产生18: g/ml的rTNV14。

[0277] 简介。先前显示来自人TNF α 免疫的GenPharm/Medarex小鼠(HCo12/KCo5基因型)的八个mAb组显示结合人TNF α 并具有完全人IgG1、 κ 同种型。使用简单的结合测定通过评价其阻断TNF α 与重组TNF受体结合的能力来确定本发明的示例性mAb是否可能具有TNF α 中和和活性。基于这些结果、DNA序列结果和几种mAb的体外表征,选择TNV148作为待进一步表征的mAb。

[0278] 克隆编码TNV148 mAb的DNA序列,进行修饰以适合编码合适恒定区的基因表达载体,引入经充分表征的653和Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞,筛选所得的转染细胞系,直至鉴定出亚克隆产生的mAb比原始杂交瘤细胞系多40倍。

[0279] 材料和方法。

[0280] 试剂和细胞。TRIZOL试剂购自Gibco BRL。蛋白酶K得自Sigma Chemical Company。逆转录酶得自Life Sciences, Inc., Taq DNA聚合酶得自Perkin Elmer Cetus或Gibco BRL。限制性酶购自New England Biolabs。QIAquick PCR纯化试剂盒来自Qiagen。QuikChange定点诱变试剂盒购自Stratagene。Wizard质粒小量制备物试剂盒和RNasin来自Promega。光学板得自Packard。¹²⁵碘购自Amersham。定制寡核苷酸购自Keystone/Biosource International。表2中示出了该工作中使用的寡核苷酸的名称、鉴定号和序列。

[0281] 表2:用于克隆、工程化或测序TNV mAb基因的寡核苷酸。

[0282] 寡核苷酸5'14s和HuH-J6编码的氨基酸显示在序列上方。'M'氨基酸残基代表翻译

起始密码子。寡核苷酸5'14s和HuH-J6中的下划线序列分别标记BsiWI和BstBI限制性位点。HuH-J6中的斜线对应于外显子/内含子边界。需注意,其序列对应于负链的寡核苷酸以3'-5'方向书写。

[0283]

名称	I.D.	序列
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10)
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO:11)
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12)
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14)
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15)
HVKRNA seq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
BsiWI	M	D W T W S I (SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID

[0284]

		NO:18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21)
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:22)
T V T V S S		BstBI (SEQ ID NO:23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:24)
SalI	M	D M R V (SEQ ID NO:25)
LK7s	362	5'-TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26)
LVgs	363	5'-TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27)
T K V D I K		(SEQ ID NO:28) Afl2
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAGAATTTCGGCGCCTTT (SEQ ID NO:29)
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATiCCAAGAACACGCTGTATC-3' (SEQ ID NO:30)
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5' (SEQ ID NO:31)

[0285] 获得653个小鼠骨髓瘤细胞的单个冷冻小瓶。在当天将小瓶解冻,并在T烧瓶中在IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺(培养基)中扩增。将这些细胞维持在连续培养中,直到它们在2至3周后用本文所述的抗TNF DNA转染。在解冻日期后5天收获一些培养物,通过离心沉淀,

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

[0286] 抑制TNF与受体结合的测定。含有TNF mAb的杂交瘤细胞上清液用于测定mAb阻断¹²⁵I标记的TNFα与重组TNF受体融合蛋白质p55-sf2结合的能力(Scallan等人(1995) Cytokine 7:759-770)。将50:1在PBS中0.5:g/ml的p55-sf2添加到光学板中以在37℃下温育一小時期间包被孔。使用PBS/0.1%BSA作为稀释剂,在96孔圆底板中制备八种TNF细胞上清液的系列稀释液。包含含有抗IL-18 mAb的细胞上清液作为阴性对照,并且包含掺有cA2(抗TNF嵌合抗体,瑞米凯德,美国专利5,770,198,以引用方式全文并入本文)的相同抗IL-18上清液作为阳性对照。将¹²⁵I标记的TNFα(58:Ci/:g,D.Shealy)添加到100:1细胞上清液中,使最终TNFα浓度为5ng/ml。将混合物在室温下预温育一小時。洗涤包被的光学板以除去未结合的p55-sf2,并将50:1¹²⁵I-TNFα/细胞上清液混合物转移到光学板中。在室温下2小时后,用PBS-Tween洗涤光学板三次。添加100:1 Microscint-20并使用TopCount γ计数器测定cpm结合。

[0287] V基因扩增和DNA序列分析。将杂交瘤细胞在PBS中洗涤一次,然后添加TRIZOL试剂用于RNA制备。将介于 7×10^6 和 1.7×10^7 个之间的细胞重悬于1ml TRIZOL中。添加200μl氯仿后剧烈摇动试管。将样本在4℃下离心10分钟。将水相转移到新的微量离心管中,并添加等体积的异丙醇。剧烈摇动试管并允许其在室温下温育10分钟。然后将样本在4℃下离心10分钟。将沉淀用1ml 70%乙醇洗涤一次,并在真空干燥器中短暂干燥。用40μl DEPC处理的水重悬RNA沉淀。通过在1%琼脂糖凝胶中分馏0.5μl来确定RNA制剂的质量。将RNA储存在-80℃冷冻机中直至使用。

[0288] 为了制备重链和轻链cDNA,制备包含3μl RNA和1μg寡核苷酸119(重链)或寡核苷酸117(轻链)(见表1)的混合物,体积为11.5μl。将混合物在70℃下在水浴中温育10分钟,并且然后在冰上冷却10分钟。制备单独的混合物,其由2.5μl 10X逆转录酶缓冲液、10μl 2.5mM dNTP、1μl逆转录酶(20单位)和0.4μl核糖核酸酶抑制剂RNasin(1单位)组成。将13.5μl该混合物添加到11.5μl冷却的RNA/寡核苷酸混合物中,并将反应在42℃下温育40分钟。然后将cDNA合成反应物储存在-20℃冷冻机中直至使用。

[0289] 未纯化的重链和轻链cDNA用作模板以PCR扩增可变区编码序列。同时测试五个寡核苷酸对(366/354、367/354、368/354、369/354和370/354,表1)其引发重链DNA扩增的能力。同时测试两个寡核苷酸对(362/208和363/208)其引发轻链DNA扩增的能力。使用2单位的PLATINUM™高保真度(HIFI) Taq DNA聚合酶进行PCR反应,总体积为50μl。每个反应包括2μl cDNA反应、10pmole的每种寡核苷酸、0.2mM dNTP、5μl 10×HIFI缓冲液和2mM硫酸镁。热循环仪程序为95℃持续5分钟,随后进行30个循环(94℃持续30秒,62℃持续30秒,68℃持续1.5分钟)。然后在68℃下最终温育10分钟。

[0290] 为了制备用于直接DNA测序的PCR产物,使用QIAquick™PCR纯化试剂盒根据制造商的方案纯化它们。使用50μl无菌水从旋转柱上洗脱DNA,并且然后使用真空干燥器将其干燥至10μl的体积。然后用1μl纯化的PCR产物、10μM寡核苷酸引物、4μl BigDye Terminator™预备反应混合物和14μl无菌水建立DNA测序反应,总体积为20μl。用寡核苷酸对367/354制备的重链PCR产物用寡核苷酸引物159和360测序。用寡核苷酸对363/208制备的轻链PCR产物

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

[0291] 定点诱变以改变氨基酸。改变TNV148重链可变区DNA序列中的单个核苷酸,以用TNV148 mAb中的丝氨酸残基取代Pro⁷⁵。设计并订购互补寡核苷酸399和400(表1)以使用制造商描述的QuikChange™定点诱变方法进行这种改变。首先将两种寡核苷酸通过15%聚丙烯酰胺凝胶分馏,并纯化主要条带。使用10ng或50ng TNV148重链质粒模板(p1753)、5μl 10X反应缓冲液、1μl dNTP混合物、125ng引物399、125ng引物400和1μl Pfu DNA聚合酶制备诱变反应。添加无菌水使总体积达到50μl。然后将反应混合物在热循环仪中温育,该热循环仪被编程为在95℃下温育30秒,并且然后循环14次,95℃连续温育持续30秒、55℃持续1分钟、64℃持续1分钟、68℃持续7分钟,随后30℃持续2分钟(1个循环)。这些反应被设计成将诱变寡核苷酸并入其他相同的新合成的质粒中。为了除去原始TNV148质粒,在添加1μl DpnI内切核酸酶后,将样本在37℃温育1小时,该核酸内切酶仅切割原始的甲基化质粒。然后将1μl反应物用于通过标准热激方法转化Epicurian Coli XL1-Blue supercompetent大肠杆菌,并在LB-氨苄青霉素琼脂板上铺板后鉴定转化的细菌。如制造商所述,使用Wizard™试剂盒制备质粒小量制备物。从Wizard™柱洗脱样本后,用乙醇沉淀质粒DNA以进一步纯化质粒DNA,并且然后重悬于20μl无菌水中。然后执行DNA序列分析,以鉴定具有所需碱基变化的质粒克隆,并确认没有其他碱基变化无意中引入TNV148编码序列。使用4.3节中描述的相同参数,使1μl质粒经受循环测序反应,所述循环测序反应用3μl BigDye混合物、1μl pUC19正向引物和10μl无菌水制备。

[0292] 来自12B75基因表达载体的构建。执行几个重组DNA步骤以分别从编码12B75的重链和轻链基因的先前克隆的基因组拷贝制备新的人IgG1表达载体和新的人κ表达载体,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies,Compositions,Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公开为WO 02/12500,其以引用方式全文并入本文。最终载体被设计成允许用任何适当设计的PCR扩增的可变区简单地一步替换现有的可变区序列。

[0293] 为了修饰质粒p1560中的12B75重链基因,将含有启动子和可变区的6.85kb BamHI/HindIII片段从p1560转移到pUC19以制备p1743。与p1560相比,该质粒的较小尺寸使得能够按照制造商的方案使用QuikChange™诱变(使用寡核苷酸BsiWI-1和BsiWI-2)在翻译起始位点的上游引入独特的BsiWI克隆位点。所得的质粒称为p1747。为了在可变区的3'末端引入BstBI位点,设计具有SalI和BstBI位点的5'寡核苷酸引物。该引物与pUC反向引物一起使用,以扩增来自p1747的2.75kb片段。然后将该片段克隆回12B75可变区和HindIII位点中的天然存在的SalI位点,从而引入独特的BstBI位点。所得的中间载体(命名为p1750)可以接受具有BsiWI和BstBI末端的可变区片段。为了制备其中恒定区也来源于12B75基因的重链载体形式,将p1750中的BamHI-HindIII插入物转移到pBR322,以在HindIII位点下游具有EcoRI位点。然后将所得的质粒p1768用HindIII和EcoRI消化,并连接到来自p1744的5.7kb HindIII-EcoRI片段,该亚克隆是通过将p1560的大BamHI-BamHI片段克隆到pBC中而得到的。然后将所得的质粒p1784用作具有BsiWI和BstBI末端的TNV Ab cDNA片段的载体。完成了附加工作以制备表达载体p1788和p1798,其包括来自12B75基因的IgG1恒定区,并且

它们彼此不同的是它们含有多少12B75重链J-C内含子。

[0294] 为了修饰质粒p1558中的12B75轻链基因,将含有12B75启动子和可变区的5.7kb SalI/AflIII片段从p1558转移到质粒L28的XhoI/AflIII位点。该新质粒p1745为诱变步骤提供了较小的模板。使用寡核苷酸 (C340salI和C340sal2) 通过QuikChange™诱变在可变区的5'末端引入独特的SalI限制性位点。所得的中间载体p1746具有独特的SalI和AflIII限制性位点,可以克隆可变区片段。克隆到p1746中的任何可变区片段优选地与轻链基因的3'半部分接合。为了从可用于此目的的12B75轻链基因的3'半部分制备限制性片段,将寡核苷酸 BAHN-1和BAHN-2彼此退火,以形成含有限制性位点BsiWI、AflIII、HindIII和NotI的双链接头,并且其含有可连接到KpnI和SacI位点的末端。将该接头克隆到pBC的KpnI与SacI位点之间,得到质粒p1757。通过用AflIII消化p1558,然后用HindIII部分消化产生的含有12B75轻链恒定区的7.1kb片段克隆到p1757的AflIII与HindIII位点之间,得到p1762。该新质粒含有BsiWI和AflIII的独特位点,其中含有启动子和可变区的BsiWI/AflIII片段可以转移,结合基因的两个半部分。

[0295] 表达质粒的cDNA克隆和装配。用Klenow酶处理所有RT-PCR反应(参见上文)以进一步填充DNA末端。用限制性酶BsiWI和BstBI消化重链PCR片段,并且然后克隆到质粒L28的BsiWI与BstBI位点之间(使用L28,因为尚未制备基于12B75的中间载体p1750)。克隆插入物的DNA序列分析显示所得构建体是正确的,并且在PCR扩增期间没有引入错误。这些L28质粒构建体(TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV196)的指定鉴定号如表3所示。

[0296] 将TNV14、TNV148和TNV148B重链的BsiWI/BstBI插入物从L28载体转移到新制备的中间载体p1750。这些中间质粒的指定鉴定号如表2所示。对于TNV15和TNV196,没有完成该克隆步骤和后续步骤。然后将可变区转移到两种不同的人IgG1表达载体中。限制性酶EcoRI和HindIII用于将可变区转移到Centocor先前使用的IgG1载体p104中。所得的编码Gm(f+)同种型IgG1的表达质粒命名为p1781(TNV14)、p1782(TNV148)和p1783(TNV148B)(参见表2)。还将可变区克隆到来源于12B75(GenPharm)基因的IgG1恒定区的上游。那些编码G1m(z)同种异型的IgG1的表达质粒也列于表3中。

[0297] 表3:各种重链和轻链质粒的质粒鉴定号。

[0298] L28载体或pBC载体代表最初的Ab cDNA克隆。将那些质粒中的插入物转移到不完全的基于12B75的载体中以制备中间质粒。一个附加转移步骤产生最终表达质粒,其在线性化后引入细胞中或用于在细胞转染之前纯化mAb基因插入物。(ND) = 未进行测试。

[0299]	Gm(f+)	G1m(z)		
	128 载体	中等	表达	表达

[0300]

Mab		<u>质粒 ID</u>	<u>质粒 ID</u>	<u>质粒 ID</u>	<u>质粒 ID</u>
重链					
TNV14		p1751	p1777	p1781	p1786
TNV15		p1752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148	p1753	p1778	p1782	p1787	
TNV148B	p1760	p1779	p1783	p1788	
TNV196	p1754	(ND)	(ND)	(ND)	
pBC 载体	中等	表达			
<u>质粒 ID</u>		<u>质粒 ID</u>	<u>质粒 ID</u>		
轻链					
TNV14		p1748	p1755	p1775	
TNV15		p1748	p1755	p1775	
TNV148		p1749	p1756	p1776	
TNV196		p1749	p1756	p1776	

[0301] 用限制性酶SalI和SacII消化轻链PCR产物,并且然后克隆到质粒pBC的SalI与SacII位点之间。将两种不同的轻链形式(差异为一个氨基酸)命名为p1748和p1749(表2)。DNA序列分析证实这些构建体具有正确的序列。然后将p1748和p1749中的SalI/AflIII片段克隆到中间载体p1746的SalI与AflIII位点之间,分别制备p1755和p1756。然后通过将来自p1755和p1756的BsiWI/AflIII片段转移到新制备的构建体p1762,将这些轻链基因的5'半部分接合到基因的3'半部分,以分别制备最终表达质粒p1775和p1776(表2)。

[0302] 细胞转染、筛选和亚克隆。用各种TNV表达质粒执行总共15次小鼠骨髓瘤细胞转染(参见结果和讨论部分中的表3)。这些转染的区别在于(1)宿主细胞是Sp2/0还是653;(2)重链恒定区由Centocor先前的IgG1载体或12B75重链恒定区编码;(3)mAb是TNV148B、TNV148、TNV14或新的HC/LC组合;(4)DNA是线性化质粒还是纯化的Ab基因插入物;以及(5)重链基因中是否存在完整的J-C内含子序列。另外,重复几次转染以增加筛选大量克隆的可能性。

[0303] 在如前所述的标准条件下,通过电穿孔将Sp2/0细胞和653细胞各自用重链和轻链DNA的混合物(各8:~12:g)转染(Knight DM等人,(1993)Molecular Immunology 30:1443-1453)。对于转染编号1、2、3和16,在转染之前通过用限制性酶消化使适当的表达质粒线性化。例如,SalI和NotI限制性酶分别用于线性化TNV148B重链质粒p1783和轻链质粒p1776。对于其余转染,通过用BamHI消化重链质粒以及用BsiWI和NotI消化轻链质粒,从质粒载体中分离出仅含有mAb基因的DNA插入物。然后通过琼脂糖凝胶电泳和Qiex纯化树脂纯化mAb基因插入物。用纯化的基因插入物转染的细胞同时用3-5:g的PstI-线性化的pSV2gpt质粒(p13)转染,作为选择标记的来源。在电穿孔后,将细胞接种于96孔组织培养皿中的IMDM、15%FBS、2mM谷氨酰胺中,并在37℃、5%CO₂培养箱中温育。两天后,添加等体积的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的2×MHX选择(1×MHX=0.5:g/ml霉酚酸、2.5:g/ml次黄嘌呤、50:g/ml黄嘌呤),并将该板温育附加2至3周,同时形成菌落。

[0304] 如所述,通过ELISA测定从具有菌落的孔处收集的细胞上清液的人IgG。简而言之,将不同稀释度的细胞上清液在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc片段的96孔EIA板中温育,并且然后使用碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)和适当的彩色底物检测结合的人IgG。在每个EIA板上包括标准曲线,其用作在细胞上清液中测量的相同纯化mAb的标准曲线,以能够定量上清液中的人IgG。将那些似乎生产最多人IgG的菌落中的细胞传代到24孔板中,用于

在用过的培养物中进行附加生产测定,随后鉴定产量最高的亲本克隆。

[0305] 对产量最高的亲本克隆进行亚克隆,以鉴定产量较高的亚克隆并制备更均质的细胞系。将96孔组织培养板接种于每孔一个细胞或每孔四个细胞的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的1×MHX,并在37℃、5%CO₂培养箱中温育12至20天,直至菌落明显。从每孔容纳一个菌落的孔中收集细胞上清液,并如上所述通过ELISA分析。将所选择的菌落传代到24孔板,并通过定量其上清液中的人IgG水平,在鉴定产量最高的亚克隆之前允许培养物耗尽。当选择的第一轮亚克隆经受第二轮亚克隆时,重复该过程。选择最佳的第二轮亚克隆作为细胞系开发。

[0306] 细胞亚克隆的特征。选择最佳的第二轮亚克隆并执行生长曲线以评价mAb生产水平和细胞生长特征。将T75烧瓶用 1×10^5 个细胞/ml接种于30ml IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺和1X MHX(或无血清培养基)中。以24小时的间隔取出300μl的等分试样并测定活细胞密度。继续分析直至活细胞数小于 1×10^5 个细胞/ml。测定所收集的细胞上清液等分试样中存在的抗体浓度。使用标准rTNV148B或rTNV14 JG92399执行ELISA测定。将样本在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc的ELISA板上温育1小时,并用1:1000稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)检测结合的mAb。

[0307] 为了在存在不同量的MHX选择的情况下比较生长速率,还对两种细胞系进行了不同的生长曲线分析。将细胞系C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺)中并再培养两天。然后将两种细胞培养物分成三种培养物,其中不含MHX、0.2X MHX或1X MHX($1 \times \text{MHX} = 0.5\text{g/ml}$ 霉酚酸、 2.5g/ml 次黄嘌呤、 50g/ml 黄嘌呤)。一天后,用培养物以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。未收集用于mAb生产的等分试样。使用SOP PD32.025中提供的公式计算这些样本的倍增时间。

[0308] 执行附加研究以评价mAb生成随着时间的推移的稳定性。培养物在含有或不含有MHX选择的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的24孔板中生长。当培养物变得融合时,培养物就分裂成新鲜的培养物,然后允许老的培养物消失。此时,取出等分试样的上清液并在4℃下储存。在55-78天的时间内取出等分试样。在此期间结束时,测试上清液中如上所述的抗人IgG Fc ELISA存在的抗体量。

[0309] 结果与讨论。

[0310] 抑制TNF与重组受体的结合。

[0311] 进行简单的结合测定,以确定杂交瘤细胞上清液中含有的八种TNV mAb是否能够阻断TNFα与受体的结合。首先通过人IgG的标准ELISA分析确定各自细胞上清液中TNV mAb的浓度。然后将重组p55TNF受体/IgG融合蛋白质p55-sf2包被在EIA板上,并允许¹²⁵I标记的TNFα在不同量的TNV mAb存在下与p55受体结合。如图1所示,除了八种TNV mAb中的一种(TNV122)之外的所有mAb均有效阻断了TNFα与p55受体的结合。事实上,TNV mAb在抑制TNFα结合方面似乎比掺入阴性对照杂交瘤上清液中的cA2阳性对照mAb更有效。这些结果被解释为表明TNV mAb极有可能在基于细胞的测定和体内阻断TNFα生物活性,因此需要进行附加分析。

[0312] DNA序列分析。

[0313] 确认RNA编码人mAb。

[0314] 作为表征在受体结合测定中显示TNFα阻断活性的七种TNV mAb(TNV14、TNV15、

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

[0315] 独特的中和mAb。

[0316] 对每种mAb的重链和轻链两者的整个可变区的cDNA序列的分析显示TNV32与TNV15相同,TNV118与TNV14相同,并且TNV86与TNV148相同。受体结合测定的结果与DNA序列分析一致,即TNV86和TNV148两者在阻断TNF结合时比TNV118和TNV14两者好约4倍。因此,后续工作仅针对四种独特的TNV mAb,TNV14、TNV15、TNV148和TNV196。

[0317] 四种mAb的相关性

[0318] DNA序列结果显示,编码四种TNV mAb重链的基因彼此高度同源,并且似乎都来源于相同的种系基因DP-46(图2)。另外,因为重链CDR3序列中的每一个都是如此相似且长度相同,并且因为它们都使用J6外显子,所以它们显然是由单个VDJ基因重排事件引起的,随后是体细胞变化,使每个mAb独特。DNA序列分析显示,四种mAb中只有两种不同的轻链基因(图3)。TNV14和TNV15中的轻链可变区编码序列彼此相同并且与人 κ 链的Vg/38K家族的代表性种系序列相同。TNV148和TNV196轻链编码序列彼此相同但不同于两个核苷酸位置的种系序列(图3)。

[0319] 推断的四种mAb的氨基酸序列揭示了实际mAb的相关性。四种mAb含有四条不同的重链(图4),但只有两条不同的轻链(图5)。TNV mAb序列与种系序列之间的差异主要限于CDR结构域,但三个mAb重链也不同于框架区中的种系序列(图4)。与DP-46种系编码的Ab框架区相比,TNV14相同,TNV15相差一个氨基酸,TNV148相差两个氨基酸,并且TNV196相差三个氨基酸。

[0320] cDNA的克隆、位点特异性诱变和最终表达质粒的装配。cDNA的克隆。基于PCR扩增的可变区的DNA序列,命令新的寡核苷酸执行另一轮PCR扩增,目的是使待克隆的编码序列适应克隆到表达载体中。在重链的情况下,用限制性酶BsiWI和BstBI消化该第二轮PCR的产物,并克隆到质粒载体L28中(质粒鉴定号显示在表2中)。在轻链的情况下,第二轮PCR产物用SalI和AflIII消化并克隆到质粒载体pBC中。然后对单个克隆进行测序以确认它们的序列与从PCR产物的直接测序获得的先前序列相同,这揭示了潜在异质分子群中每个位置处最丰富的核苷酸。

[0321] 改变TNV148的位点特异性诱变。在中和TNF α 生物活性时,一致地观察到mAb TNV148和TNV196比下一个最佳mAb(TNV14)强四倍。然而,如上所述,TNV148和TNV196重链框架序列不同于种系框架序列。TNV148重链序列与其他人抗体的比较表明,许多其他人类mAb在框架1中的第28位含有Ile残基(仅计数成熟序列),而框架3中第75位的Pro残基在该位置是不常见的氨基酸。

[0322] TNV196重链的类似比较表明,与框架3中的种系序列不同的三种氨基酸在人mAb中可能是罕见的。如果施用给人,这些差异可能使TNV148和TNV196具有免疫原性。因为TNV148只有一个关注的氨基酸残基,这个残基被认为对TNF α 结合不重要,所以使用位点特异性诱变技术来改变TNV148重链编码序列中的单个核苷酸(在质粒p1753中),从而编码种系Ser残基以代替75位的Pro残基。所得的质粒称为p1760(参见表2)。将所得的基因和mAb称为TNV148B,以将其与原始TNV148基因和mAb区分开(参见图5)。

[0323] 最终表达质粒的装配。制备新的抗体表达载体,其基于先前克隆为基因组片段的12B75重链和轻链基因。尽管制备了不同的TNV表达质粒(参见表2),但在每种情况下,5'侧翼序列、启动子和内含子增强子来源于相应的12B75基因。对于轻链表达质粒,完整的J-C内含子、恒定区编码序列和3'侧翼序列也来源于12B75轻链基因。对于导致最终生产细胞系的重链表达质粒(p1781和p1783,参见下文),人IgG1恒定区编码序列来源于Centocor先前使用的表达载体(p104)。重要的是,此处报道的最终生产细胞系表达TNV mAb的不同同种异型(Gm(f+)),而不是原始的杂交瘤衍生的TNV mAb(G1m(z))。这是因为来源于GenPharm小鼠的12B75重链基因编码CH1结构域C末端的Arg残基,而Centocor的IgG1表达载体p104编码该位置的Lys残基。制备其他重链表达质粒(例如p1786和p1788),其中J-C内含子、完整恒定区编码序列和3'侧翼序列来源于12B75重链基因,但是没有选择用这些基因转染的细胞系作为生产细胞系。仔细设计载体以允许一步克隆未来PCR扩增的V区,这将导致最终表达质粒。

[0324] 将PCR扩增的可变区cDNA从L28或pBC载体转移到中间阶段,基于12B75的载体,其提供启动子区和部分J-C内含子(质粒鉴定号参见表2)。然后将含有抗体基因的5'半部分的限制性片段从这些中间阶段载体转移到最终表达载体,其提供相应基因的3'半部分以形成最终表达质粒(质粒鉴定号参见表2)。

[0325] 细胞转染和亚克隆。通过限制性消化将表达质粒线性化,或者从质粒主链中纯化每个质粒中的抗体基因插入物。通过电穿孔用重链和轻链DNA转染Sp2/0和653小鼠骨髓瘤细胞。完成了十五次不同的转染,其中大多数是Ab所定义的独特的、Ab基因的特定特征,基因是否在线性化的完整质粒或纯化的基因插入物上,以及宿主细胞系(汇总在表4中)。通过ELISA测定来自对霉酚酸具有抗性的克隆的细胞上清液中人IgG的存在,并使用纯化的rTNV148B作为参考标准曲线进行定量。

[0326] 产量最高的rTNV148B细胞系

[0327] 将来自rTNV148B转染2的产量最佳的653个亲本系(在用过的24孔培养物中生成5-10:g/ml)亚克隆,以筛查产量较高的细胞系并制备更均一的细胞群。亲本系2.320、2.320-17和2.320-20的两个亚克隆在用过的24孔培养物中生成约50:g/ml,比其亲本系增加5倍。第二轮亚克隆系2.320-17和2.320-20的克隆亚领先

[0328] 显示了编码每种mAb的重链和轻链质粒的鉴定号。在用纯化的mAb基因插入物进行转染的情况下,包括质粒p13(pSV2gpt)作为gpt选择标记的来源。重链恒定区由用于编码瑞米凯德("旧")的相同人IgG1表达载体或通过12B75(GenPharm/Medarex)重链基因("新")内包括的恒定区编码。H1/L2是指由TNV14重链和TNV148轻链组成的"新型"mAb。质粒p1783和p1801的区别仅在于它们的重链基因含有多少J-C内含子。右侧显示了转染数字,它定义了细胞克隆的通用名称的第一个数字。生成rTNV148B的细胞系C466(A、B、C、D)和C467A分别来源于转染编号2和1。生成rTNV14的细胞系C476A来源于转染编号3。

[0329] 表4:细胞转染汇总。

[0330]	质粒	HC	DNA			
	<u>转染编号</u>					
	<u>mAb</u>	<u>HC/LC/gpt</u>	<u>载体</u>	<u>形式</u>	<u>Sp2/0</u>	<u>653</u>
	rTNV148B	1783/1776	旧	直链	1	2
	rTNV14	1781/1775	旧	直链	3	-
	rTNV148B	1788/1776/13	新	插入	4,6	5,7
	rTNV14	1786/1775/13	新	插入	8,10	9,11
	rTNV148	1787/1776/13	新	插入	12	17
	rH1/L2	1786/1776/13	新	插入	13	14
rTNV148B	1801/1776	旧	直链	16		

[0331] 用过的24孔培养上层清液的ELISA测定表明,这些第二轮亚克隆均生产介于98和124:g/ml之间,这比第一轮亚克隆增加至少2倍。向这些653个细胞系分配C代码命名,如表5所示。

[0332] 将来自rTNV148B转染1的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆。亲本系1.73的两轮亚克隆导致鉴定在用过的24孔培养物中生产25:g/ml的克隆。将该Sp2/0细胞系命名为C467A(表5)。

[0333] 产量最高的rTNV14细胞系

[0334] 将来自rTNV14转染3的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆一次。据发现,亚克隆3.27-1是用过的24孔培养物的最高产量,产量为19:g/ml。将该细胞系命名为C476A(表5)。

[0335] 表5:所选择的生产细胞系及其C代码的汇总。

[0336] 原始克隆名称的第一个数字表示细胞系来源的转染。此处报道的所有C-编码细胞系均来源于用限制性酶线性化的重链和轻链完整质粒的转染。

	原始	用过的 24 孔			
	mAb	克隆名称	C 代码	宿主细胞	产量
[0337]	rTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103:g/ml
		2.320-20-111	C466B	653	102:g/ml
		2.320-17-4	C466C	653	98:g/ml
		2.320-20-99	C466D	653	124:g/ml
[0338]		1.73-12-122	C467A	Sp2/0	25:g/ml
	rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19:g/ml

[0339] 亚克隆细胞系的特征

[0340] 为了更仔细地表征细胞系生长特征并在更大规模上确定mAb生产水平,使用T75培养物执行生长曲线分析。结果显示四个C466系列细胞系中的每一个达到介于 1.0×10^6 和 1.25×10^6 个细胞/ml之间的峰值细胞密度,并且最大mAb积累水平介于110和140:g/ml之间(图7)。相比之下,产量最佳的Sp2/0亚克隆C467A达到 2.0×10^6 个细胞/ml的峰值细胞密度和25:g/ml的最大mAb积累水平(图7)。未对生产rTNV14的细胞系C476A进行生长曲线分析。

[0341] 进行附加生长曲线分析以比较不同浓度的MHX选择的生长速率。最近的观察结果表明,在没有MHX的情况下培养的C466细胞比在正常量的MHX(1X)中培养的相同细胞生长更

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

[0342] 为了评价在约60天的时间内从各种细胞系生产mAb,对含有或不含有MHX选择的培养物执行稳定性测试。并非所有细胞系都保持高mAb产量。在培养仅两周后,克隆C466A的产量比研究开始时少约45%。克隆C466B的产量似乎也显著下降。然而,克隆C466C和C466D保持相当稳定的产量,C466D显示出最高的绝对产量水平(图9)。

[0343] 结论

[0344] 从最初的八种针对人TNF α 的人mAb组中,基于包括蛋白质序列和TNF中和效力的几种标准以及TNV14,选择TNV148B作为优选的。制备生产大于100:g/ml rTNV148B和19:g/mlrTNV14的细胞系。

[0345] 实施例5:使用单次推注注射使用抗TNF抗体和对照的关节炎小鼠研究

[0346] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。

[0347] 结果:当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。(参见图10)。

[0348] 图11A至图11C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周依然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0349] 实施例6:使用抗TNF抗体和对照作为多次推注剂量的关节炎小鼠研究

[0350] 在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2、3和4周时对从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的免疫应答诱导和药代动

力学清除率。

[0351] 结果:当分析体重作为从给药前的变化时,未发现显著差异。用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。(参见图12)。

[0352] 图13A至图13C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差异。

[0353] 实施例7:使用抗TNF抗体和对照作为单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0354] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0355] 当将体重分析为来自给药前的变化时,所有治疗均获得相似的体重增加。用3mg/kg或5mg/kg TNV148或5mg/kg cA2处理的动物在研究早期(在第2周和第3周时)获得了显著量的体重。只有用TNV148处理的动物在较晚的时间点维持显著的体重增加。35mg/kg和5mg/kg TNV148两者治疗的动物均在7周时显示显著性,并且3mg/kg TNV148的动物在注射后8周仍显著升高。(参见图14)。

[0356] 图15示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0357] 实施例8:使用抗TNF抗体和对照作为抗TNF抗体与修饰的抗TNF抗体之间的单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0358] 比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液S PBS(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0359] 当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第1周和第3至第8周时显著增加。用1mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第5周、第6周和第8周时也获得显著的体重增加。(参见图16)。

[0360] 图17示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2

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

[0361] 实施例9:用于治疗或预防强直性脊柱炎的抗TNF抗体

[0362] 概要

[0363] 戈利木单抗、抗TNF α 单克隆抗体、静脉注射用于患有活动性强直性脊柱炎(AS)的受试者的多中心、随机、双盲、安慰剂对照试验。

[0364] **SIMPONI[®]** (戈利木单抗)是具有免疫球蛋白G1(IgG1)重链同种型(G1m[z]同种异型)和 κ 轻链同种型的完全人单克隆抗体。戈利木单抗具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。戈利木单抗以高亲和力和特异性结合人肿瘤坏死因子 α (TNF α)并中和TNF α 生物活性。

[0365] 目标和假说

[0366] 主要目标

[0367] 本研究的主要目标是通过评价AS的体征和症状的减少来评估IV施用戈利木单抗2mg/kg在具有活动性强直性脊柱炎(AS)的受试者中的疗效。

[0368] 次要目标

[0369] 次要目标是评估戈利木单抗的以下内容:

[0370] • 与改善身体功能、运动范围、与健康相关的生活质量和其他健康结果相关的疗效

[0371] • 安全性

[0372] • 药代动力学(PK)、药效学(PD)和免疫原性

[0373] 假说

[0374] 为了解决本研究的主要目标,统计假说(另选的假说)是IV戈利木单抗2mg/kg在统计学上优于安慰剂,在基于主要疗效终点的情况下减少具有活性AS的受试者的体征和症状。

[0375] 本研究的主要终点是在第16周时强直性脊柱炎评估(ASAS)国际工作组标准(称为ASAS 20)中与基线实现改善20%的受试者比例。选择该终点是因为它被监管机构和临床AS群体广泛接受。

[0376] 研究设计概况

[0377] 这是一项3期多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究,研究IV戈利木单抗与安慰剂相比,对活动性AS患者的疗效和安全性,对NSAID的反应不足或不耐受。约有200名受试者将在约40个研究地点随机分组。所有受试者将被随机分配,以在第0周、第4周、之后的每8周(q8w)截至第52周接受戈利木单抗2mg/kg或安慰剂IV输注。在第16周时,所有接受安慰剂输注的受试者将开始接受戈利木单抗IV输注。

[0378] 戈利木单抗IV治疗组中的受试者将继续接受戈利木单抗IV输注。数据库锁计划在

第28周和第60周。在最后一次研究治疗施用后至少8周,将随访受试者的不良事件(AE)和严重不良事件(SAE)。研究的结束定义为最后一个受试者完成第60周访视的时间。

[0379] 受试者群体

[0380] 符合研究资格的受试者将是18岁或以上的男性或女性,诊断为AS至少3个月,按照修订后的纽约标准定义为“明确”,以及活动性疾病和症状,由巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数(BASDAI) ≥ 4 和总背痛 ≥ 4 的视觉模拟量表(VAS)证实,各自范围为0至10cm。受试者需要具有 $\geq 0.3\text{mg/dL}$ 的C-反应蛋白(CRP)水平。

[0381] 研究群体的其他主要特征如下:

[0382] • 目前使用甲氨蝶呤(MTX)、柳氮磺吡啶(SSZ)和羟氯喹(HCQ)以及低剂量口服皮质类固醇的用户是允许的,并且应该进入稳定剂量的这些药物的研究。

[0383] • 先前暴露于不超过一种生物抗TNF α 剂(戈利木单抗除外)的受试者允许包括在本研究中,但将限于最多20%的研究群体。

[0384] • 脊柱完全性强直的受试者,被定义为存在于侧视脊柱射线照片上可视化的颈椎和腰椎的所有椎间水平的桥接韧带骨赘允许包括在本研究中,但将限于最多10%的研究群体。

[0385] 有资格的受试者的筛查将在施用研究试剂之前的6周内执行。

[0386] 受试者还必须符合纳入和排除标准。

[0387] 剂量和给药

[0388] 在初次筛查访视时,将根据方案指定的纳入和排除标准,从所有被认为可能有资格进行研究的受试者处获得知情同意书,以便参加研究。在随机化访视时,将重新评估受试者,并且如果满足所有指定的纳入和排除标准,则受试者将被随机分配,以接受戈利木单抗IV输注或安慰剂IV输注。随机化将根据地理区域和先前使用抗TNF α 疗法进行分层。

[0389] 在第一次研究输注之前,受试者将以1:1的比例随机分配至以下2个治疗组中的1个:

[0390] 第1组(n=100):受试者将在第0周、第4周和第12周时接受IV安慰剂输注。受试者将在第16周时交叉至IV戈利木单抗2mg/kg组,并在此后的第16周、第20周和q8w时接受施用。

[0391] 第2组(n=100):受试者将在第0周、第4周和之后q8w时接受IV戈利木单抗2mg/kg。受试者将在第16周时接受IV安慰剂输注以维持不知情。

[0392] 所有输注将在30+10分钟内完成。

[0393] 疗效评价/终点

[0394] 在该研究选择的疗效评价是在用于治疗AS的治疗性生物试剂的先前试验中建立的。为本研究选择的患者报告结果(PRO)也与医学文献中接受的临床相关测量结果一致,用于AS中的其他研究和适用的美国/欧盟监管指导文档。

[0395] 强直性脊柱炎响应评价包括:

[0396] • 巴斯强直性脊柱炎功能指数(BASFI)

[0397] • 患者总体评估

[0398] • 总背痛

[0399] • 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数(BASDAI)

- [0400] • 36项短期健康调查 (SF-36)
- [0401] • 巴斯强直性脊柱炎计量指数 (BASMI)
- [0402] • 强直性脊柱炎生命质量 (ASQoL) 调查问卷
- [0403] • 胸部扩张
- [0404] • 夜间背痛
- [0405] • 肌腱端炎指数
- [0406] • 医学成果研究睡眠量表
- [0407] • 工作限制问卷 (WLQ)
- [0408] • 生产力视觉模拟量表
- [0409] • EuroQol-5D (EQ-5D) 问卷

[0410] 主要终点

[0411] 本研究的主要终点是第16周时ASAS 20应答者的比例。如果与安慰剂组相比,在第16周时ASAS 20的受试者比例在戈利木单抗组中被证实在统计意义上显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[0412] 重要次要终点

[0413] 将执行以下重要次要分析。这些终点按重要性顺序列出,如下所示:

- [0414] 1. 在第16周时实现ASAS 40的受试者比例。
- [0415] 2. 在第16周时BASDAI与基线实现至少50%改善的受试者比例。
- [0416] 3. 在第16周时,BASFI与基线的变化。

[0417] 药代动力学评价

[0418] 将在所选择的访视时收集血液样本,以评价具有AS的成年受试者中IV戈利木单抗的PK。如果在该次访视时施用研究试剂,则应从与IV输注线不同的臂抽取药代动力学样本。具体地,在第0周、第4周、第12周、第20周、第36周和第52周访视时,将收集2个血清戈利木单抗浓度样本:在输注前立即收集1个样本,在输注结束后一小时收集另一个样本。对于每次剩余的访视,将仅收集1份血清戈利木单抗浓度样本。如果在该次访视时施用研究试剂,则应在输注前收集该样本。还将抽取随机PK样本用于第12周与第20周访视之间的群体PK分析,除了在第12周、第16周或第20周访视时;必须在研究试剂输注之前或之后至少24小时收集该样本。在适用的时间点,用于测量戈利木单抗浓度和戈利木单抗抗体两者的血清将来自相同的血液抽取。

[0419] 免疫原性评价

[0420] 为了评价戈利木单抗在具有AS的成年受试者中的免疫原性,将根据时间和事件时间表收集用于检测戈利木单抗抗体的血清样本。

[0421] 生物标记评价

[0422] 将收集生物标记样本以获得对临床结果中个体间变异性的分子理解,这可能有助于识别对药物有不同响应的群体亚组。生物标记样本还可用于帮助解决新出现的问题,并且能够在未来开发更安全、更有效、最终个体化的疗法。

[0423] 药物基因组学 (DNA) 评价

[0424] 将进行基因组测试以搜索特定基因与疾病或对药物响应的链接。仅执行与戈利木单抗或与该药物开发的疾病相关的DNA研究。本研究将在同意受试者中进行基因组广泛的

药物基因组学和/或表观遗传学测试。参与此部分研究的受试者必须签署单独的知情同意书。此外,受试者可以在任何时间撤回此类同意,而不影响他们参与研究的其他方面或他们未来参与研究。

[0425] 将收集药物基因组学血液样本,以允许在必要时(当地法规允许的情况下)进行药物基因组学研究。受试者参与药物基因组学研究是任选的。

[0426] 安全性评价

[0427] 基于其他抗TNF α 试剂的安全性概况以及迄今为止的戈利木单抗安全性数据,已经鉴定了几种感兴趣的AE,并将在本研究中进行监测和评估。这些包括:输注反应、肝胆实验室异常、包括TB的感染和恶性肿瘤。

[0428] 统计方法

[0429] 简单描述性汇总统计,诸如连续变量的n、平均值、SD、中值、IQ范围、最小值和最大值,以及离散变量的计数和百分比将用于汇总大多数数据。

[0430] 通过MTX在基线(是/否)使用分层的卡方检验或Cochran-Mantel-Haenszel (CMH)检验将用于比较分类变量,诸如对治疗有响应的受试者比例。一般来讲,除非另有说明,否则将先前使用抗TNF α 疗法作为因子的ANOVA用于分析连续变量。所有统计测试将在 $\alpha=0.05$ (双侧)下执行。除统计分析之外,图形数据显示(例如,线图)和受试者列表也可用于汇总/呈现数据。

[0431] 群体集

[0432] 群体集将是意向治疗群体(即,所有随机受试者)。包括在疗效分析中的受试者将根据其指定的治疗组进行汇总,无论他们是否接受指定的治疗。

[0433] 安全性和PK分析将包括接受至少一次研究治疗施用的所有受试者。

[0434] 终点分析

[0435] 主要终点分析

[0436] 为了解决主要目标,将使用通过先前使用抗TNF α 疗法(是/否)分层的CMH测试,比较安慰剂组与戈利木单抗组之间在第16周时具有ASAS20反应的受试者(主要终点)的比例,显著性水平为0.05(双侧)。在该主要疗效分析中,来自所有随机化受试者的数据将根据其指定的治疗组进行分析,而不管其接受的实际治疗。如果受试者在第16周时具有至少1个ASAS成分的数据,则将使用最后一个观察结果(LOCF)程序来估算缺失的ASAS成分。如果受试者在第16周时没有所有ASAS成分的数据,则受试者将被视为无响应者。

[0437] 重要次要终点分析

[0438] 以下重要次要分析将按重要性顺序执行,如下所示:

[0439] 1.将对在第16周时实现ASAS 40的受试者比例在治疗组之间进行比较。

[0440] 2.将对在第16周时BASDAI与基线实现至少50%改善的受试者比例在治疗组之间进行比较。

[0441] 3.将对在第16周时BASFI与基线的变化在治疗组之间进行比较。

[0442] 为了控制多重性的I型错误率,仅当主要终点在0.05显著性水平(双侧)实现统计意义上的显著性时,才测试第一个重要次要终点。仅当主要终点和前面的重要次要终点在0.05显著性水平(双侧)具有统计意义的显著性时,才会测试随后的重要次要终点。

[0443] 安全性分析概述

[0444] 将执行常规安全性评价。AE、SAE和其他合理相关AE (包括输注反应和包括TB的感染) 的出现和类型将按治疗组进行汇总。将基于NCI CTCAE毒性分级对具有异常实验室参数 (血液学和化学) 的受试者的数量进行汇总。另外, 将对具有ANA和抗dsDNA抗体的受试者的数量以及输注反应与戈利木单抗抗体的关系进行汇总。

[0445] 所有安全性分析将使用接受至少1次研究试剂施用的所有受试者的群体执行。将使用受试者实际接受的治疗执行分析。

[0446] 另外, 图形数据显示 (例如, 线图) 和受试者列表也可用于汇总/呈现数据。

[0447] 缩写

[0448]	AE	不良事件
[0449]	AS	强直性脊柱炎
[0450]	ASAS 20	强直性脊柱炎的评估20
[0451]	ASQoL	强直性脊柱炎生活质量
[0452]	ASSERT	强直性脊柱炎研究评估重组英夫利昔单抗治疗
[0453]	BASDAI	巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数
[0454]	BASFI	巴斯强直性脊柱炎功能指数
[0455]	BASMI	巴斯强直性脊柱炎计量指数
[0456]	BCG	卡介苗
[0457]	CHF	充血性心力衰竭
[0458]	CMH	Cochran-Mantel-Haenszel
[0459]	CRP	c反应蛋白质
[0460]	DAS	疾病活动评分
[0461]	DBL	数据库锁
[0462]	DMARD	改善疾病的抗风湿药物
[0463]	DMC	数据监测委员会
[0464]	DNA	脱氧核糖核酸
[0465]	ECG	心电图
[0466]	eCRF	电子病例报告表
[0467]	eDC	电子数据捕集
[0468]	EQ-5D	EuroQol-5D
[0469]	EQ-VAS	EQ视觉模拟量表
[0470]	EU	欧洲联盟
[0471]	GCP	良好的临床实践
[0472]	HBV	乙型肝炎病毒
[0473]	HCQ	羟氯喹
[0474]	HCV	丙型肝炎病毒
[0475]	HIV	人类免疫缺陷病毒
[0476]	HRQOL	健康相关的生活质量
[0477]	IB	研究者手册
[0478]	ICF	知情同意书

[0479]	ICH	国际协调会议
[0480]	IEC	独立伦理委员会
[0481]	IgG 1	免疫球蛋白G 1
[0482]	IMA	独立的肌肉骨骼评估员
[0483]	IRB	机构审查委员会
[0484]	IV	静脉注射
[0485]	IWRS	交互式网络响应系统
[0486]	MCS	心理成分汇总
[0487]	MOS-SS	医学成果研究睡眠量表
[0488]	MMP-1	基质金属蛋白酶-1
[0489]	MMP-3	基质金属蛋白酶-3
[0490]	MTX	甲氨蝶呤
[0491]	NSAID	非甾体抗炎药物
[0492]	MCS	生理成分汇总
[0493]	PD	药效
[0494]	PK	药代动力学
[0495]	PQC	产品质量投诉
[0496]	PRO	患者报告结果
[0497]	PsA	银屑病关节炎
[0498]	q8w	每8周一次
[0499]	RA	类风湿性关节炎
[0500]	RBC	红细胞
[0501]	SAE	严重不良事件
[0502]	SAP	统计分析计划
[0503]	SC	皮下
[0504]	SF-36	36项短期健康调查
[0505]	SSZ	柳氮磺吡啶
[0506]	TB	结核病
[0507]	TNF α	肿瘤坏死因子 α
[0508]	TST	结核菌素皮肤测试
[0509]	US	美国
[0510]	VAS	视觉模拟量表
[0511]	WBC	白细胞
[0512]	WLQ	工作限制问卷
[0513]	<u>简介</u>	

[0514] 戈利木单抗是具有免疫球蛋白G 1 (IgG1) 重链同种型 (G1m[z] 同种异型) 和 κ 轻链同种型的完全人单克隆抗体。戈利木单抗具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。戈利木单抗是一种人单克隆抗体,与人肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的可溶性和跨膜生物活性形式形

成高亲和力、稳定的复合物,可阻止TNF α 与其受体的结合。未观察到与其他TNF α 超家族配体的结合;具体地,戈利木单抗不结合或中和人淋巴毒素。肿瘤坏死因子 α 主要由活化的单核细胞、巨噬细胞和T细胞合成,作为跨膜蛋白质,其自缔合以形成生物活性的同源三聚体并通过蛋白水解从细胞表面快速释放。TNF α 与p55或p75 TNF受体的结合导致受体胞质结构域的聚集并引发信号传导。肿瘤坏死因子已被鉴定为响应各种刺激而产生的关键前哨细胞因子,并且随后通过激活半胱天冬酶依赖的凋亡途径和转录因子核因子(NF)- κ B和激活蛋白质-1(AP-1)促进炎症反应。肿瘤坏死因子 α 还通过其在生发中心的免疫细胞组织中的作用来调节免疫应答。TNF α 的升高表达已经与慢性炎症性疾病诸如类风湿性关节炎(RA)以及脊柱状关节病诸如银屑病关节炎(PsA)和强直性脊柱炎(AS)有关,并且是这些疾病特有的关节炎炎症和结构损伤的重要媒介。

[0515] 强直性脊柱炎

[0516] 强直性脊柱炎(AS)是一种病因不明的慢性炎症性疾病,涉及骶髂关节,通常是轴向骨骼、总肌腱端和周围关节。相比女性,AS更容易影响男性,其在美国的患病率估计为人口的0.2-0.5%²²。导致的慢性炎症导致新的骨形成、韧带联合和关节强直,主要在轴向骨骼中。正是这种轴向强直可能导致运动范围和残疾的急剧减少。该疾病还可能具有骨外临床表现,包括葡萄膜炎、心脏炎、肺纤维化、肠炎和心脏传导异常。强直性脊柱炎被认为是脊柱关节病的一个子集,与人白细胞抗原-B27(HLA-B27)抗原的存在密切相关³⁴。

[0517] 虽然患者可能会出现各种肌肉骨骼症状(近端关节痛、胸痛和周围关节周围的触痛),但最常见的症状是慢性腰痛。腰痛通常在40岁之前开始,在发病时隐匿,与晨僵相关,并且最终是对称的。这些肌肉骨骼症状可能与全身症状相关联,诸如疲劳、发烧和体重减轻。在TNF α 抑制剂被批准之前,AS的治疗效果有限,主要由运动和NSAID组成,口服柳氮磺吡啶(SSZ)在外周关节炎患者中起作用¹⁰。生物学TNF α 抑制剂已在随机对照试验中显示,可显著改善AS患者的体征和症状、活动能力和身体机能。

[0518] TNF α 在强直性脊柱中的作用

[0519] 抗TNF α 疗法对包括AS在内的多种适应症的疗效和安全性已得到充分表征。肿瘤坏死因子 α 被认为是表现出多种功能活性的关键炎症介质。异常高水平的TNF α 与几种免疫介导的疾病(包括RA、PsA和AS)的病理生理学有关。TNF α 与抗TNF α 抗体的结合阻止靶标与细胞表面TNF α 受体结合,从而阻止下游信号级联和不适当或过量TNF α 表达的有害作用。在活动性AS患者的外周血^{16,20,26}和滑膜组织⁹中均观察到TNF α 水平升高。有人提出TNF α 可能在AS的骶髂关节炎中发挥作用,就像它在RA的滑膜炎中一样。在一项对5名活动性AS患者进行的研究中,用计算机断层扫描指导的骶髂关节活检进行评估,免疫组织学分析显示细胞浸润主要由T细胞和巨噬细胞组成,3名受试者活组织检查的原位杂交研究显示TNF α 丰富⁵。

[0520] 许多开放标签和双盲安慰剂对照试验显示英夫利昔单抗(一种重组IgG1- κ 人-鼠嵌合单克隆抗TNF α 抗体)在缓解AS的体征和症状方面具有实质性功效。英夫利昔单抗是第一种用于治疗AS的抗TNF α 药物,在具有AS或被诊断患有包括AS的脊柱关节病的受试者的受试者中,在第0周、第2周和第6周时,5mg/kg英夫利昔单抗输注的诱导方案导致疾病活动度量的快速改善^{3,7,24,25,27}。

[0521] 英夫利昔单抗仅在AS患者⁶和包括AS在内²⁸的脊柱关节病患者中进行的两项随机、双盲、安慰剂对照试验表明,英夫利昔单抗治疗可使临床结果测量得到快速、显著的改善。

在ASSERT研究(一项大型、多中心、双盲、安慰剂对照的英夫利昔单抗试验,涉及279名AS患者)中,强直性脊柱炎20评估(ASAS 20)在24周时的响应率在英夫利昔单抗治疗组中为60%,而安慰剂治疗组为18%²⁹。MRI的身体功能测量、运动生活质量范围和疾病活动评分也有显著改善。AS患者的英夫利昔单抗疗法通常耐受良好。

[0522] 使用皮下(SC)药物(包括依那西普、阿达木单抗、戈利木单抗和赛妥珠单抗)在AS中的肿瘤坏死因子 α 抑制也已被证明在随机、安慰剂对照试验中是有效的^{4,11,18,19,30}。虽然TNF α 在AS的病理生理学中的确切作用尚不清楚,但已经有大量且越来越多的证据证明TNF α 抑制在该疾病中具有主要的治疗益处。

[0523] 研究的总体理论基础

[0524] 尽管用抗TNF α 试剂的治疗已成功用于治疗炎性关节炎,但抗TNF α 药剂在安全性、给药方案、成本和免疫原性方面具有局限性。为了解决这些局限性,一种完全人体抗TNF α mAb,命名为戈利木单抗(也称为CNT0148和rTNV148B)。戈利木单抗是一种完全人类抗TNF α mAb,以高亲和力结合人TNF α 并抑制TNF α 生物活性。另外,戈利木单抗抑制TNF α 介导的细胞毒性和TNF α 介导的内皮细胞活化。戈利木单抗还诱导补体介导的细胞裂解的激活并减少过表达人TNF α 的小鼠中关节炎的发展。

[0525] 用抗TNF α 试剂(包括SC戈利木单抗)治疗已经证明可以显著改善受AS影响的受试者的体征和症状、身体功能和健康相关的生活质量(HRQOL)。完成了一项全局性、随机、双盲、安慰剂对照的3期研究,在AS患者(研究C0524T09)中对戈利木单抗进行SC施用,以评估SC戈利木单抗经过5年随访的长期安全性和有效性。皮下戈利木单抗被证明在改善AS的体征和症状方面是有效的。安全性分析显示,SC戈利木单抗通常具有良好的耐受性,并且表现出与用其他抗TNF α 试剂观察到的相似的安全性。

[0526] 考虑到SC戈利木单抗的已知安全性和功效,预期IV戈利木单抗在风湿性疾病诸如RA、PsA和AS中具有与其他抗TNF α 剂一致的可接受的安全性特征证明是有效的。已经在第3期研究(CNT0148ART3001)中明确研究了静脉注射戈利木单抗,该研究形成了批准用于治疗RA的基础。CNT0148ART3001研究是一项尽管同时进行甲氨蝶呤(MTX)治疗,但在具有活动性RA的受试者中在第0周、第4周和之后的每8周(q8w)超过30 $\pm$ 10分钟时间内的施用戈利木单抗2mg/kg输注施用的有效性和安全性的随机、双盲、安慰剂对照、多中心、双臂研究。尽管MTX患有活动性RA的受试者随机分配接受安慰剂输注或是在第0周、第4周和每8周截至第24周IV施用2mg/kg的戈利木单抗。从第24周开始,截至第100周用IV戈利木单抗治疗所有受试者。已证明,IV戈利木单抗在改善RA体征和症状、身体功能和健康相关的生活质量以及抑制结构损伤的进展方面提供了实质性有益效果。

[0527] 在RA治疗中静脉内施用的戈利木单抗(CNT0148ART3001)显示出稳健的疗效和可接受的安全性、输注反应的发生率低。该发明的第3期研究旨在评价静脉注射(IV)戈利木单抗在治疗患有活动性AS的受试者中的疗效和安全性。正在评价AS受试者的IV施用途径,因为目前可获得的IV抗TNF α 剂在免疫原性和输注反应方面具有局限性,并且与本发明的IV戈利木单抗的30分钟 $\pm$ 10分钟输注相比,具有更长的输注时间(60分钟至120分钟)。

[0528] 与SC试剂相比,患者还可能更喜欢q8w IV戈利木单抗的保持剂量方案而不是更频繁的使用。因此,IV戈利木单抗可能是目前可用治疗选择的重要补充。

[0529] 本研究的给药方案是在第0周和第4周,然后是q8w经由IV输注施用2mg/kg戈利木

单抗超过30分钟。

[0530] 研究设计和基本原理

[0531] 研究设计概况

[0532] 这是一项3期多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究，研究IV戈利木单抗与安慰剂相比，对活动性AS患者的疗效和安全性，对NSAID的反应不足或不耐受。约有200名受试者将在约70个研究地点随机分组。受试者将被随机分配，以在第0周、第4周和第12周时接受戈利木单抗2mg/kg或安慰剂IV输注。在第16周时，所有接受安慰剂输注的受试者将在第16周、第20周和之后的q8w截至第52周开始接受戈利木单抗IV输注。在第16周，戈利木单抗IV治疗组中的受试者将接受安慰剂输注，以保持不知情并且在第20周和之后的q8w截至第52周继续接受戈利木单抗IV输注。数据库锁 (DBL) 计划在第28周和第60周。

[0533] 在最后一次研究治疗施用后至少8周，将随访受试者的不良事件 (AE) 和严重不良事件 (SAE)。研究的结束定义为最后一个受试者完成第60周访视的时间。

[0534] 图18中提供了本研究设计的图表。

[0535] 研究设计基本原理

[0536] 研究群体

[0537] 目标研究群体是具有活动性AS的受试者，如通过修订的纽约标准所定义的，在首次施用研究试剂之前至少3个月。

[0538] 治疗组、剂量和剂量施用间隔

[0539] 受试者将在第0周至第1周时的2个治疗组中随机分配如下：

[0540] • 第1组 (n=100) : IV安慰剂输注

[0541] • 第2组 (n=100) : IV戈利木单抗2mg/kg输注

[0542] 随机分配到戈利木单抗的受试者将在第0周、第4周和之后的q8w截至第52周接受戈利木单抗2mg/kg IV输注。在第16周时，随机分配至戈利木单抗的受试者将接受安慰剂输注以保持不知情。在第0周、第4周和第12周时随机分配接受安慰剂IV输注的所有受试者将在第16周时交叉至积极治疗，并且在第16周、第20周和之后q8w截至第52周接受戈利木单抗2mg/kg IV输注。戈利木单抗IV治疗组中的受试者将继续接受戈利木单抗IV输注。

[0543] 研究阶段和治疗持续时间

[0544] 本研究将分为4个阶段：筛查、双盲安慰剂对照、积极治疗 and 安全性随访。最多6周的筛查阶段将允许足够的时间执行筛查研究评价并确定研究资格。本研究的第二阶段将是第0周到第16周的双盲、安慰剂对照阶段。本研究的第三阶段将是第16周至第52周的积极治疗阶段。本研究的第四阶段将是安全性随访阶段，并且将是最后一次研究试剂施用开始的8周。安全性随访允许监测受试者的时间相当于戈利木单抗半衰期的大约5倍。截至本研究60周，每名受试者的初始治疗分配仍对地点和受试者是不知情的。该持续时间将提供足够的时间来证明IV戈利木单抗作为AS的维持治疗的疗效和安全性。

[0545] 当最后一名受试者完成最后一次预定访视 (第60周访视) 时，本研究将结束。

[0546] 研究控制,随机化和盲法

[0547] 随机化将用于最大限度地减少受试者分配至治疗组的偏倚，增加已知和未知受试者属性 (例如，人口统计学和基线特征) 在治疗组之间均衡平衡的可能性，并增强治疗组之间的统计比较的有效性。另外，随机化将根据地理区域和先前使用抗TNF α 疗法 (是或否) 进

行分层。

[0548] 在研究期间,个体受试者和研究者将保持不知情状态。盲法治疗将用于减少数据收集和临床终点评价期间的潜在偏倚。计划在第28周和第60周进行两项DBL研究。在所有受试者完成第28周访视或终止研究参与后,将发生第一次DBL。在所有受试者完成第60周访视或终止研究参与后,将发生第二次DBL。数据库将在第28周被锁定,汇总级数据将在DBL上显示为受试者级数据,以便对所选个人进行数据分析和数据审查。除了非盲药剂师之外,所有现场人员和受试者将对治疗任务保持不知情,直至第60周DBL发生。

[0549] 疗效评价

[0550] 在该研究中选择中的疗效评价是在用于治疗AS的治疗性生物试剂的先前试验中建立的。为本研究选择的患者报告结果 (PRO) 也与医学文献中接受的临床相关测量结果一致,用于AS中的其他研究和适用的美国/欧盟监管指导文档。

[0551] 强直性脊柱炎响应评价包括:

- [0552] • 巴斯强直性脊柱炎功能指数 (BASFI)
- [0553] • 患者总体评估
- [0554] • 总背痛
- [0555] • 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数 (BASDAI)
- [0556] • 36项短期健康调查 (SF-36)
- [0557] • 巴斯强直性脊柱炎计量指数 (BASMI)
- [0558] • 强直性脊柱炎生命质量 (ASQoL) 调查问卷
- [0559] • 胸部扩张
- [0560] • 夜间背痛
- [0561] • 肌腱端炎指数
- [0562] • 医学成果研究睡眠量表
- [0563] • 工作限制问卷 (WLQ)
- [0564] • 生产力视觉模拟量表
- [0565] • EuroQol-5D (EQ-5D) 问卷

[0566] 受试者群体

[0567] 符合研究资格的受试者将是18岁或以上的男性或女性,诊断为AS至少3个月,按照修订后的纽约标准定义为“明确”,以及活动性疾病和症状,由BASDAI $\geq$ 4和总背痛 $\geq$ 4的视觉模拟量表 (VAS) 证实,各自范围为0至10cm。受试者需要具有 $\geq$ 0.3mg/dL的C-反应蛋白 (CRP) 水平。

[0568] 研究群体的其他主要特征如下:

- [0569] • 目前使用MTX、SSZ和羟氯喹 (HCQ) 以及低剂量口服皮质类固醇的用户是允许的,并且应该进入稳定剂量的这些药物的研究。
- [0570] • 先前暴露于不超过一种生物抗TNF α 剂 (戈利木单抗除外) 的受试者允许包括在本研究中,但将限于最多20%的研究群体。
- [0571] • 脊柱完全性强直的受试者,被定义为存在于侧视脊柱射线照片上可视化的颈椎和腰椎的所有椎间水平的桥接韧带骨赘允许包括在本研究中,但将限于最多10%的研究群体。

[0572] 有资格的受试者的筛查将在施用研究试剂之前的6周内执行。

[0573] 在本研究中招募受试者的纳入和排除标准在以下2个小节中描述。如果对下面的纳入或排除标准存在疑问,研究者应在本研究对象招募之前咨询适当的代表。

[0574] 纳入标准

[0575] 每个潜在受试者必须满足以下所有将参加研究的标准。

[0576] 1. 受试者必须是18岁或以上的男性或女性。

[0577] 2. 受试者必须在体格检查、病史、生命体征和筛查时执行的12导联心电图 (ECG) 的基础上保持医学稳定。该决定必须记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[0578] 3. 在筛查时执行的临床实验室测试的基础上,受试者必须在医学上稳定。如果包含肝酶或血液学的血清化学组的结果超出正常参考范围,则只有当研究者判断异常或偏离正常对于临床不显著或对所研究群体是否适当和合理时,才可包括受试者。该决定必须记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。对于纳入标准#6和#16中描述的测试,结果必须在纳入标准#6和#16中允许的合格范围内。

[0579] 4. 在首次施用研究试剂之前至少3个月,根据修订的纽约标准定义诊断为明确的AS。

[0580] 必须满足放射照相标准和至少1个临床标准两者:

[0581] a. 放射标准: 双侧骶髂关节炎 $\geq$ 2级或单侧3至4级骶髂关节炎。

[0582] b. 临床标准 (至少1个):

[0583] i. 腰痛和僵硬超过3个月,随着运动而改善,但休息时不会缓解。

[0584] ii. 腰椎在矢状平面和额面平面的运动受限。

[0585] iii. 相对于针对年龄和性别校正的正常值,胸部扩张的限制。

[0586] 5. 在筛查和基线时都有活动性疾病的症状,由BASDAI评分为 $\geq$ 4和总背痛 $\geq$ 4的VAS评分证实,各自评分为0至10厘米。

[0587] 6. 筛查时CRP水平为 $\geq$ 0.3mg/dL。

[0588] 7. 由于NSAID的不耐受性、毒性或禁忌症,对于最多推荐剂量的NSAID,在4周内总共对至少2种NSAID的反应不足,或者无法接受完整的4周最大NSAID治疗。

[0589] 8. 如果使用NSAID或其他止痛药治疗AS,则必须在首次施用研究试剂前至少稳定剂量2周。如果目前未使用NSAID或其他止痛药治疗AS,则在首次施用研究试剂前至少2周内不得接受NSAID或其他镇痛药治疗AS。

[0590] 9. 如果使用口服皮质类固醇,则必须在首次施用研究药剂之前至少2周服用相当于 $\geq$ 10mg泼尼松/天的稳定剂量。如果目前未使用皮质类固醇,则必须在首次施用研究药剂之前至少2周未接受口服皮质类固醇。

[0591] 10. 如果使用MTX、SSZ或HCQ,应该在首次施用研究试剂之前至少3个月开始治疗,并且应该没有由于改善疾病的抗风湿药物 (DMARD) 引起的严重毒副作用。在首次施用研究试剂之前,甲氨蝶呤施用途径和剂量 (不超过25mg/周) 应稳定至少4周。如果使用SSZ或HCQ,则也必须在首次施用研究试剂前至少稳定剂量4周。如果目前未使用MTX、SSZ或HCQ,则必须在首次施用研究药剂之前至少4周未接受这些DMARD。

[0592] 11. 在随机化前,女性必须是

[0593] • 不具有生育潜力: 初经前期; 绝经后 (>45 岁, 闭经至少12个月); 永久不育 (例

如,输卵管阻塞、子宫切除术、双侧输卵管切除术);或以其他方式不能怀孕。

[0594] • 具有生育潜力并实施一种高效的生育控制方法,符合关于对参与临床研究的受试者使用避孕方法的当地规定:例如,使用成熟的口服、注射或植入的激素避孕方法;放置宫内避孕器或宫内节育器;阻隔方法:含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套或含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽);男性伴侣绝育(输精管结扎的伴侣应是唯一适于该受试者的伴侣);完全禁欲(当这种情况与受试者的一般优选生活方式一致时)。

[0595] 12. 具有生育潜力的妇女必须在筛查时进行阴性血清妊娠测试(β -人绒毛膜促性腺激素 [β -HCG]),并在随机化前第0周进行阴性尿妊娠测试。

[0596] 13. 妇女必须同意在研究期间以及在接受最后一剂研究试剂后4个月内,为了辅助生殖而不怀孕或捐卵(卵子、卵母细胞)。

[0597] 14. 在研究期间和最后一剂研究试剂后4个月内,与育龄妇女的性生活活跃且未接受输精管结扎术的男性必须同意使用阻隔避孕方法,例如,含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套,或者伴侣使用含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽)。所有男性也不得在研究期间以及最后一剂研究试剂后4个月内捐献精子。

[0598] 15. 根据以下结核病(TB)筛查标准被视为符合条件:

[0599] a. 筛查前没有潜伏或活动性结核病史。有潜伏性TB病史且正在接受潜伏性TB治疗的受试者例外,其将在首次施用研究试剂之前开始治疗潜伏性TB,或者在首次施用研究试剂之前的5年内完成对潜伏性TB的适当治疗的记录。

[0600] b. 在病史和/或体格检查时没有任何迹象或症状提示活动性TB。

[0601] c. 最近没有与活动性TB患者密切接触,或者如果存在此类接触,将转介给专门接受TB治疗的医生经历附加评价,并且如果有必要,在首次服用研究试剂之前接受适当的潜伏性TB治疗。

[0602] d. 在首次使用研究试剂前6周内,测定结果为 QuantiFERON[®]-TB Gold或者新确定的 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果为阳性,其中排除了活动性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗。在首次施用研究试剂之前的6周内,如果 QuantiFERON[®]-TB Gold测试未在该国家/地区获得批准/注册,或者TST是由当地卫生部门强制执行的,则附加需要结核菌素皮肤试验阴性(TST),或新确定的阳性TST,其中排除了活性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗。

[0603] i. 如果排除活动性TB,他们的胸部X光片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的附加风险因素,则具有持续不确定的 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果的受试者可以在不接受潜伏性TB治疗的情况下登记。

[0604] ii. 对于有潜伏性TB病史和潜伏性TB持续治疗的受试者或已完成如上所述的充分治疗的记录,筛查时不需要 QuantiFERON[®]-TB Gold测试和TST;具有如上所述完成适当治疗的记录的受试者不需要对潜伏性TB进行附加治疗。

[0605] e. 在首次施用研究试剂之前3个月内拍摄胸部X光片(后-前视图)并由合格的放射

科医师阅读,不具有当前、活动性TB或旧的非活动性TB的证据。

[0606] 16.在以下参数范围内筛查实验室测试结果:

[0607] a. 血红蛋白 $\geq 8.5\text{g/dL}$

[0608] b. 白血球 $\geq 3.5 \times 10^3/\text{uL}$

[0609] c. 中性粒细胞 $\geq 1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$

[0610] d. 血小板 $\geq 100 \times 10^3/\text{uL}$

[0611] e. 血清肌酸酐 $\geq 1.5\text{mg/dL}$

[0612] f. AST、ALT和碱性磷酸酶水平必须在进行测试的实验室的ULN范围的1.5倍以内。

[0613] 17. 受试者必须愿意并且能够遵守该方案中规定的禁止事项和限制条款。

[0614] 18. 每个受治疗者必须签署知情同意书 (ICF), 表明他或她了解研究的目的和程序并且愿意参与该研究。

[0615] 19. 如果每个受试者同意提供任选的DNA样本用于研究 (当地法规允许), 则他或她必须签署单独的知情同意书。拒绝同意任选的DNA研究样本并不排除受试者参与该研究。

[0616] 20. 在首次研究试剂施用前2周内和整个研究期间, 都愿意避免使用辅助疗法, 包括阿育吠陀医学、传统中药和针灸。

[0617] 排除标准:

[0618] 任何符合以下标准中的任一者的潜在受试者将被排除在参与本研究之外。

[0619] 1. 有其他炎症性疾病可能会混淆戈利木单抗治疗有益效果的评价, 包括但不限于RA、PsA、系统性红斑狼疮或莱姆病。

[0620] 2. 在参加研究时或在最后一次施用研究试剂后4个月内怀孕、哺乳或计划怀孕或生育孩子。

[0621] 3. 在首次施用研究试剂前4周内接受了除MTX、SSZ或HCQ以外的任何全身免疫抑制剂或DMARD。这些类别的药物包括但不限于氯喹、硫酸喹啉、环孢霉素、麦考酚酸莫酯、金和青霉胺。皮质类固醇不包括在此标准中; 参见有关皮质类固醇的其他资格标准。

[0622] 4. 在首次施用研究试剂前4周内接受来氟米特 (无论是否经历药物消除程序), 或在首次施用研究试剂前3个月内接受来氟米特, 并且未经历药物消除程序。

[0623] 5. 在首次施用研究试剂之前的4周期间接受了硬膜外、关节内IM或IV皮质类固醇, 包括促肾上腺皮质激素。

[0624] 6. 曾经接受过戈利木单抗。

[0625] 7. 在首次服用研究试剂之前3个月内接受过英夫利昔单抗 (包括生物仿制药抗TNF α 药物)、阿达木单抗或者赛妥珠单抗。

[0626] 8. 在首次施用研究试剂之前的6周内接受过依那西普或益赛普。

[0627] 9. 接受过多种先前的抗TNF α 药物。

[0628] 10. 对任何先前的抗TNF α 剂 (定义为由研究者评估的缺乏响应或由于在治疗的前16周内缺乏疗效而停药) 经历了原发性衰竭。

[0629] 11. 接受过除抗TNF α 剂之外的先前生物疗法, 包括但不限于托珠单抗、阿法西普、依法利珠单抗、那他珠单抗、阿巴西普、阿那白菌素、优特克单抗、布罗达单抗、苏金单抗、伊沙珠单抗和B细胞耗竭疗法。

[0630] 12. 曾经接受托法替尼或任何其他Janus激酶抑制剂 (JAK) 抑制剂。

- [0631] 13. 对人免疫球蛋白具有已知的超敏反应。
- [0632] 14. 使用过细胞毒性药物, 包括苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥子气或其他烷基化剂。
- [0633] 15. 在筛查前有活动性肉芽肿感染史, 包括组织胞浆菌病或球孢子菌病。有关潜伏性TB病史资格的信息, 请参阅纳入标准。
- [0634] 16. 在筛查后12个月内接种卡介苗 (BCG) 疫苗。
- [0635] 17. 在首次施用研究试剂之前3个月内进行胸部X光检查, 显示异常提示恶性肿瘤或当前活动性感染, 包括TB。
- [0636] 18. 在筛查前6个月内有非结核分枝杆菌感染或机会性感染 (例如, 细胞巨化病毒、肺孢子虫病、曲霉病)。
- [0637] 19. 首次施用研究试剂后2个月内有带状疱疹感染。
- [0638] 20. 在首次施用研究试剂之前3个月内、研究期间或最后一次施用研究试剂后3个月内接受或预期接受任何活病毒或细菌疫苗接种。
- [0639] 21. 如果假体未被移除或更换, 则有感染关节假体的病史, 或曾因关节假体的感染而接受抗生素治疗。
- [0640] 22. 感染严重 (包括但不限于肝炎、肺炎、败血病或肾盂肾炎), 或因感染住院, 或在首次施用研究试剂前2个月内接受IV抗生素治疗感染。
- [0641] 23. 有慢性或复发性感染病的病史或持续存在, 包括但不限于慢性肾脏感染、慢性胸部感染 (例如, 支气管扩张)、鼻窦炎、复发性尿道感染 (例如, 复发性肾盂肾炎)、开放性、排泄性或感染性皮肤创伤或溃疡。
- [0642] 24. 受试者具有人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗体阳性的病史, 或在筛查时检测HIV阳性。
- [0643] 25. 有乙型肝炎感染。受试者必须经历乙型肝炎病毒 (HBV) 筛查。至少, 这包括测试HBsAg (HBV表面抗原)、抗HBs (HBV表面抗体) 和抗HBc总量 (HBV核心抗体总数)。
- [0644] 26. 对丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体呈血清反应阳性的受试者, 除非他们在筛查前相隔6个月时有2个HCV RNA检测结果阴性, 并且在筛查时有第三个阴性HCV RNA检测结果。
- [0645] 27. 有已知的脱髓鞘疾病史, 诸如多发性硬化或视神经炎。
- [0646] 28. 目前有严重、渐进性或不受控制的肾、肝、血液、胃肠、内分泌、肺、心脏、神经、脑或精神疾病的体征或症状。
- [0647] 29. 有病史或并发充血性心力衰竭 (CHF), 包括医学控制、无症状的CHF。
- [0648] 30. 有淋巴细胞增生性疾病的已知病史, 包括淋巴瘤, 或暗示可能的淋巴细胞增生性疾病的体征和症状, 诸如异常尺寸或位置的淋巴结病, 临床上显著的脾肿大或意义不明的单克隆丙种球蛋白病。
- [0649] 31. 受试者在筛查前5年内有恶性肿瘤病史 (例外是皮肤的鳞状和基底细胞癌, 在首次研究药剂施用前至少3个月没有复发迹象, 并且已经手术治愈的宫颈原位癌)。
- [0650] 32. 受试者已知对戈利木单抗或其赋形剂的过敏、超敏或不耐受 (参见戈利木单抗IB)。
- [0651] 33. 在计划的第一剂研究药物之前, 受试者已采取任何不允许的疗法。
- [0652] 34. 受试者已在5个半衰期或3个月内 (以较长者为准) 接受研究药物 (包括研究性疫苗), 或在计划的第一剂研究药物之前3个月内使用侵入式研究医疗器械或目前参加研究

性研究。

[0653] 35. 受试者具有任何条件, 在研究者认为参与不符合受试者的最佳利益 (例如, 损害健康) 或可能阻止、限制或混淆方案指定的评估。

[0654] 36. 受试者在筛查前1个月内接受了大手术 (例如, 需要全身麻醉), 或者尚未从手术中完全恢复, 或者计划在预期受试者参与研究期间或在最后一剂研究药物施用后1个月内进行手术。

[0655] 37. 有过移植器官 (除首次施用研究试剂前>3个月进行的角膜移植之外)。

[0656] 38. 在过去的3年内, 具有药物滥用 (药物或酒精) 问题。

[0657] 39. 由于耐受性差或不易进入, 不愿意或无法接受多次静脉穿刺。

[0658] 40. 受试者是研究者或研究地点的雇员, 在该研究者或研究地点的指导下直接参与拟议的研究或其他研究, 以及雇员或研究者的家庭成员。

[0659] 注: 研究者应确保所有研究入组标准均已在筛查时满足, 并在随机化之前再次满足。如果受试者的状态 (包括实验室结果或收到附加的医疗记录) 在筛查后但在给予首剂研究药物之前发生变化, 使得他或她不再符合所有资格标准, 那么该受试者应被排除在参与本研究之外。

[0660] 禁止和限制

[0661] 潜在受试者必须愿意并且能够在研究过程期间遵守以下禁止和限制条件才有资格参加:

[0662] 1. 具有生育潜力的异性性生活活跃妇女和能够生育孩子的男性两者必须同意使用高效的避孕方法, 并在本研究期间和最后一次施用研究试剂后4个月继续使用避孕措施。

[0663] 2. IV研究试剂施用不允许同时使用以下药物:

[0664] • 全身免疫抑制剂或DMARD (MTX、SSZ和HCQ除外), 包括氯喹、硫唑嘌呤、口服环孢菌素A、他克莫司、霉酚酸酯、来氟米特, 口服或肠外金。全身免疫抑制剂不是指皮质类固醇; 关于皮质类固醇限制, 参见其他地方。

[0665] • 旨在减少TNF α 的生物制剂 (包括但不限于英夫利昔单抗、SC戈利木单抗、赛妥珠单抗、依那西普、益赛普、CT-P13[Remsima[®]]和阿达木单抗)

[0666] • IL-1ra (阿那白滞素)

[0667] • 托珠单抗或任何其他生物靶向IL-6或IL-6受体

[0668] • 托法替尼或任何其他JAK抑制剂

[0669] • B细胞耗竭剂 (例如, 利妥昔单抗)

[0670] • 细胞毒性药物, 诸如环磷酰胺、苯丁酸氮芥、氮芥子气, 或者其他烷基化剂

[0671] • 阿巴西普

[0672] • 优特克单抗

[0673] • 抗IL-17试剂 (例如, brodalumab、苏金单抗和艾克司单抗)

[0674] • 研究药物

[0675] 3. 必须同意在研究期间不接受活病毒或活细菌疫苗接种。受试者还必须同意在接受最后一次研究试剂施用后3个月内不接种活疫苗。在筛查后12个月内不得接种BCG疫苗。

[0676] 4. 必须同意在本研究期间不接受除本研究的研究试剂以外的研究性医疗器械或研究药物。

[0677] 5. 用NSAID治疗的受试者, 包括阿司匹林和选择性COX-2抑制剂, 以及其他镇痛药, 应该接受在进行本研究的国家批准的通常市售剂量。NSAID和其他止痛药的处方不应在首次施用研究药物之前至少2周进行调整, 也不应该在截至第16周进行调整, 并且只有在受试者出现不可接受的副作用时才可以进行调整。在第16周后截至第60周, 允许一次性剂量减少; 否则, 只有当受试者出现不可接受的副作用时, 才能改变NSAID和其他止痛药的处方。允许使用包括辣椒素和双氯芬酸的局部止痛药。

[0678] 6. 用口服皮质类固醇治疗的受试者在首次施用研究试剂之前应该每天接受相当于 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松的稳定剂量至少2周, 并在截至第16周继续接受该剂量。在第16周和第60周后, 允许口服皮质类固醇一次性剂量减少; 否则, 只有当受试者出现不可接受的副作用时, 研究者可自行决定改变口服皮质类固醇的剂量和类型。

[0679] 在首次施用研究试剂之前4周内不允许硬膜外、IM或IV施用皮质类固醇, 并且在整个研究期间不允许用于治疗AS。在研究除AS以外的适应症期间, 应尽一切努力避免使用硬膜外、IM和IV皮质类固醇。截至第60周, 不允许长期(> 2 周)口服或IV皮质类固醇用于除AS以外的适应症。用于除AS以外适应症的短期(≤ 2 周)口服、IV、IM或硬膜外皮质类固醇应限于治疗医师认为没有足够替代品的情况。

[0680] 在首次施用研究试剂之前4周内不应施用关节内类固醇。应该尝试避免关节内注射皮质类固醇, 特别是在研究的前16周内。然而, 如果需要, 受试者可以在研究的60周期间在不超过2个受影响的部位接受最多2次关节内、腱鞘或法氏囊皮质类固醇注射。

[0681] 7. 在第60周, 禁止使用可能影响AS疾病活动或评估的补充疗法, 包括但不限于传统医学(例如, 中医、针灸、阿育吠陀医学)。

[0682] 研究前和伴随疗法

[0683] 应尽一切努力使受试者的伴随药物在第16周或以下各节中针对AS疗法的规定的情况下保持稳定。由于实验室的异常值、副作用、并发疾病或外科手术的表现, 可能会减少伴随药物剂量或药物暂时中断, 但变化和变化的原因应在受试者的病历中明确记录。

[0684] 在60周的研究期间, 受试者不应进行任何新的治疗。

[0685] 在时间和事件时间表中确定的研究访问中将进行伴随药物审查。

[0686] 甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶或羟氯喹

[0687] 允许受试者进入稳定剂量的MTX、SSZ或HCQ进行研究。

[0688] 如果受试者使用MTX、SSZ或HCQ, 则应在首次施用研究试剂之前至少3个月开始治疗。在首次施用研究试剂之前, MTX施用途径和剂量 $\leq 25\text{mg}/\text{周}$ 应该稳定至少4周。建议在本研究中服用MTX的所有受试者每周至少接受 5mg 口服叶酸或 5mg 亚叶酸。如果使用SSZ或HCQ, 则受试者也必须在首次施用研究试剂前至少稳定剂量4周。

[0689] 未接受MTX、SSZ或HCQ治疗的受试者必须在首次施用研究试剂之前停止治疗至少4周, 并且在截至第60周时不得接受MTX、SSZ或HCQ治疗。

[0690] 应尽一切努力在接受该药物治疗的受试者中通过研究的第60周维持MTX、SSZ和HCQ的稳定剂量和施用途径。试验中心文件中包含MTX毒性情况下的剂量调整指南。

[0691] 皮质类固醇疗法

[0692] 用口服皮质类固醇治疗AS的受试者在首次施用研究试剂之前应该每天接受相当于 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松的稳定剂量至少2周, 并且截至第16周继续接受该剂量。在第16周和第60周

后,允许口服皮质类固醇一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,研究者可自行决定改变口服皮质类固醇的剂量和类型。未在基线时用口服皮质类固醇治疗的受试者必须在首次施用研究试剂之前至少2周停用口服皮质类固醇,并且他们必须至第60周不接受口服皮质类固醇用于AS。

[0693] 截至第60周中不允许静脉注射、肌内注射或硬膜外施用皮质类固醇用于治疗AS。

[0694] 截至第60周,不允许长期(>2周)口服或IV皮质类固醇用于除AS以外的适应症。用于除AS以外适应症的短期(≤2周)口服、IV、IM或硬膜外皮质类固醇应限于治疗医师认为没有足够替代品的情况。在整个研究过程中允许吸入、耳、眼、鼻内和其他粘膜递送皮质类固醇的途径。

[0695] 应该尝试避免关节内注射皮质类固醇,特别是在研究的前16周内。然而,如果需要,受试者可以在研究的60周期间在不超过2个受影响的部位接受最多2次关节内、腱鞘或法氏囊皮质类固醇注射。在单个关节中严重压痛或肿胀的情况下,建议在接受关节内皮质类固醇注射之前评价受试者的感染。

[0696] 非甾体类抗炎药和其他止痛药

[0697] 允许使用稳定剂量的NSAID和其它止痛药。

[0698] 用NSAID治疗的受试者,包括阿司匹林和选择性环氧合酶-2抑制剂,以及其他止痛药,应该接受在进行本研究的国家批准的通常市售剂量,并且应该在首次施用研究试剂之前至少2周处于稳定剂量。截至第16周,只有当受试者出现不可接受的副作用时,NSAID和其他止痛药的剂量和类型才可能改变。在第16周和截至第60周后,允许一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,才能改变NSAID和其他止痛药的处方。

[0699] 允许使用包括辣椒素和双氯芬酸的局部止痛药。

[0700] 在这项试验中,阿司匹林被认为是一种NSAID,除了用于心血管或脑血管疾病的低剂量阿司匹林。

[0701] 疾病修饰抗风湿性药物/全身免疫抑制剂

[0702] 除MTX、SSZ和HCQ外,必须在首次施用研究试剂前至少4周停用疾病修饰抗风湿性药物/全身免疫抑制剂,并且在截至第60周时禁止使用。这些DMARD包括但不限于氯喹、金制剂、青霉胺和来氟米特。如果受试者在首次施用研究试剂之前3个月内接受来氟米特,则受试者必须经历药物消除程序。截至第60周禁用的全身免疫抑制药物包括但不限于环孢菌素、他克莫司、麦考酚酸莫酯和硫唑嘌呤。全身免疫抑制剂不是指皮质类固醇。

[0703] 生物试剂、细胞毒性药物或研究试剂

[0704] 在本研究的60周期间不允许使用生物试剂(例如,SC戈利木单抗、阿那白滞素,依那西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗、阿法西普、依法利珠单抗、利妥昔单抗、那他珠单抗)、细胞毒性剂(例如,苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥子气、其他烷基化剂)或研究药物。如果使用这些药物中的任一种,受试者将停止进一步的研究试剂输注。

[0705] 补充疗法

[0706] 在本研究的60周期间,不允许使用补充疗法,包括阿育吠陀医学、传统中药或诸如针灸的非药物疗法。

[0707] 研究评价

[0708] 功效

[0709] 评价

[0710] Bath强直性脊柱炎疾病活动指数

[0711] BASDAI¹⁴定义如下:

[0712] 根据以下标准使用VAS (0至10cm) 进行受试者自我评估:

[0713] A. 疲劳

[0714] B. 脊椎疼痛

[0715] C. 关节疼痛

[0716] D. 肌腱端炎

[0717] E. 定性晨僵

[0718] F. 定量晨僵

[0719] $BASDAI = 0.2 (A+B+C+D+0.5 [E+F])$ 。

[0720] Bath强直性脊柱炎功能指数

[0721] BASFI是受试者的自我评估,表示为10个问题的平均值(VAS,0至10cm),其中8个与受试者的功能解剖学有关,其中2个与受试者应对日常生活的能力有关⁸。沿着量表的增加表明病症恶化。

[0722] 患者总体评估

[0723] 患者对疾病活动的总体评估将记录在VAS (0至10厘米;0=非常好,10=非常差)。

[0724] 总背痛

[0725] 受试者将被要求评估过去一周平均总背痛的VAS (0至10厘米;0=无疼痛,10=最严重的疼痛)。

[0726] 夜间背痛

[0727] 受试者将被要求评估过去一周期间他们在夜间背痛的VAS (0至10厘米;0=无疼痛,10=最严重的疼痛)。

[0728] 肌肉骨骼评估

[0729] 肌肉骨骼评估将包括BASMI、肌腱端炎指数和胸部扩张的每个成分。

[0730] 将在每个研究地点指定一名独立的肌肉骨骼评估员(IMA),他们在执行肌肉骨骼评估方面具有足够的训练和经验,以执行所有肌肉骨骼评估。强烈建议对受试者执行基线肌肉骨骼评估的同一IMA也应在截至第52周的每次随后访视中对该受试者执行肌肉骨骼评估。

[0731] 在每个地点筛查第一个受试者之前,赞助人将为每个地点指定的IMA提供培训。备用IMA必须在对受试者的研究访视执行肌肉骨骼评估之前完成培训。应在研究地点维护每个IMA的培训文档。如果可能,研究期间不应更改研究地点的独立评估员。

[0732] 如果IMA在过去3年内在之前的临床研究中由赞助人进行了培训,并且有足够的培训证明(认证),则该培训将被认为适合本研究;然而,鼓励在开始试验之前重复进行培训。

[0733] 所有在一个地点执行肌肉骨骼评价的IMA必须列在研究站点的授权日志中,并且应在每次访视时记录在源文档中。

[0734] 在第28周后,肌肉骨骼评估员不再需要独立。然而,建议在研究期间不要更改肌肉骨骼评估员。

[0735] Bath强直性脊柱炎计量指数

[0736] BASMI表示为5个成分的总分(范围从0至10),并将使用van der Heijde计算³¹计算,如表6所示。

[0737] 表6:建议用于将评估(A)转换为BASMI_{lin}的五个成分的评分(S)的公式

[0738]

	S = 0 如果:	介于 0 与 10 之间;	S = 10 如果:
腰椎侧屈*(cm)	$A \geq 21.1$	$S = (21.1 - A)/2.1$	$A \leq 0.1$
耳壁距*(cm)	$A \leq 8$	$S = (A - 8)/3$	$A \geq 38$
腰椎屈曲(改性 Schober)(cm)	$A \geq 7.4$	$S = (7.4 - A)/0.7$	$A \leq 0.4$

[0739]

踝间距(cm)	$A \geq 124.5$	$S = (124.5 - A)/10$	$A \leq 24.5$
宫颈旋转角度*(°)	$A \geq 89.3$	$S = (89.3 - A)/8.5$	$A \leq 4.3$

[0740] *对于腰椎侧屈、耳壁距和宫颈旋转,应采取左右平均值。如果评分超出0至10的范围,则必须分别使用值0或10。

[0741] BASMI_{lin}是五个S评分的平均值。

[0742] 将在这些地点收集5个成分的评估(A),并且将在执行分析时基于评估以编程方式计算评分(S)。

[0743] 强直性脊柱炎响应标准的评估

[0744] 根据ASAS国际工作组(ASAS 20)的标准^{1,23,33},响应改善20%定义为:

[0745] 1.在以下4个领域中的至少3个领域,在0至10cm,从基线开始改善 $\geq 20\%$,从基线开始绝对改善至少1个:

[0746] i.患者总体性

[0747] ii.总背痛

[0748] iii.功能(BASFI)

[0749] iv.炎症(BASDAI关于晨僵的最后2个问题的均值)

[0750] 2.在潜在的剩余域中没有从基线恶化($\geq 20\%$ 并且在0至10cm范围内至少1的恶化)。

[0751] ASAS 40定义为4个结构域中的3个具有 $\geq 40\%$ 的改善,在0至10cm范围内绝对改善至少2,并且剩余结构域没有恶化。

[0752] ASAS 5/6定义为疼痛域(VAS 0至10cm)、患者总体性(VAS 0至10cm)、功能(BASFI评分)、晨僵(来自BASDAI)、CRP和脊柱活动性(腰侧屈曲)6个中的任5个区域的改善 $\geq 20\%$,

[0753] 低疾病活动

[0754] 低水平的疾病活动将通过“ASAS部分消退”的标准来测量,该标准定义为在上述4个ASAS域中的每一个中0至10cm的范围内的值低于2。

[0755] 强直性脊柱炎的疾病活动评分

[0756] 国际脊柱关节炎学会(ASAS)的评估已经开发出用于AS,即ASDAS的疾病活动评分(DAS)^{21,32}。在本研究中,以下公式将用于计算ASDAS评分:

[0757] $ASDAS = 0.121 \times \text{总背痛} + 0.058 \times \text{晨僵持续时间} + 0.110 \times \text{患者总体评估} + 0.073 \times \text{外周疼痛/肿胀} + 0.579 \times \ln(\text{CRP (mg/L)} + 1)$ 。

[0758] ASDAS的主要改善定义为降低 ≥ 2.0 。无活动性疾病定义为ASDAS评分 < 1.3 。

[0759] ASDAS的临床重要改善定义为降低 $\geq 1.1^2$ 。

[0760] 肌腱端炎指数

[0761] 肌腱端炎是AS和其他脊柱关节病的重要特征。目前,加州大学旧金山分校(UCSF)用于临床研究的肌腱端炎指数将在本研究中执行^{6,15}。通过IMA评估列出的肌腱端将允许确定总肌腱端炎评分(表7)。

[0762] 表7:肌腱端炎指数

	肌腱末端	UCSF
	C1-2	X
	C7-T1	X
	T12-L1	X
	坐骨结节	L/R
	耻骨联合	X
[0763]	第5腰椎棘突	X
	髂嵴	L/R
	大转子	L/R
	内侧股骨髁	L/R
	跟腱插入	L/R
	足底插入	L/R
	总肌腱端	17

[0764] 将这些肌腱端评分为0(无触痛)或1(触痛)。

[0765] 胸部扩张

[0766] 胸部扩张是在最大吸气与最大呼气时胸部周长之间的差值(以cm计)。它在男性的第四肋间隙水平测量,并且在女性的乳房下方测量。

[0767] 36项短期健康调查

[0768] 医学成果研究健康测量SF-36问卷是作为兰德健康保险实验的一部分开发的,由8个多项目量表组成:

- [0769] • 由于健康问题导致的身体功能受限;
- [0770] • 由于身体健康问题导致的通常角色活动受限;
- [0771] • 身体疼痛;
- [0772] • 一般心理健康(心理困扰和健康);
- [0773] • 由于个人或情感问题导致的通常角色活动受限;
- [0774] • 由于身体或精神健康问题导致的社交功能受限;
- [0775] • 活力(能量和疲劳);
- [0776] • 一般健康感知。

[0777] 这些量表的评分从0到100,评分越高表示健康状况越好。另一种算法产生2个汇总评分,生理成分汇总(PCS)和心理成分汇总(MCS)。这些汇总评分也用更高的评分表示更好的健康,但是使用基于规范的系统进行评分,其中执行线性变换以基于一般的美国人口规

范将评分转换为平均值50和标准差10³⁵。由SF-36测量的概念并非特定于任何年龄、疾病或治疗组,从而允许比较不同疾病的相对负担和不同治疗的相对益处³⁶。

[0778] 医学成果研究睡眠量表

[0779] 将使用MOS-SS评估睡眠问题的程度¹⁷。MOS-SS测量睡眠的六个维度,包括起始、保持(例如,保持睡眠)、数量、充足性、嗜睡(例如,困倦)和呼吸障碍(例如,呼吸短促、打鼾)。MOS睡眠量表是一种通用的健康指标,用于评估与健康相关的生活质量(HRQOL)概念-睡眠与每个人的健康状况和健康相关,并且已知直接受疾病和治疗的影响。因此,MOS-SS并不特定于任何年龄、疾病或治疗组。已经在许多疾病领域评估了MOS-SS的可靠性和有效性,包括神经性疼痛和RA。

[0780] 强直性脊柱炎生命质量(ASQoL)调查问卷

[0781] 强直性脊柱炎生命质量是自我管理的患者报告结果工具¹²。它由18个项目组成,要求是或否回答与疼痛对睡眠、情绪、动机、应对能力、日常生活活动、独立性、关系和社交生活的影响相关的问题。对每个项目的“是”的响应给出评分1,并且将所有项目评分加到具有0至18的范围的总评分。评分越高表明健康相关的生活质量越差。受试者可以在不到四分钟的时间内完成工具。

[0782] EQ-5D调查问卷

[0783] EuroQol-5D(EQ-5D)是EuroQoL Group开发的标准化健康状况衡量标准,为临床和经济评估提供简单、通用的健康指标(EuroQoL Group,1990)¹³。EQ-5D适用于各种健康状况和治疗。EQ-5D基本上由2个元素组成:EQ-5D描述系统和EQ视觉模拟量表(EQ VAS)。EQ-5D描述系统包括以下5个维度:移动性、自我护理、常见活动、疼痛/不适和焦虑/抑郁。每个维度都有5个级别:无问题、轻微问题、中度问题、严重问题和极端问题。要求被访者通过在方框中打勾(或放个十字)来表明他/她的健康状况,以反映5个维度中每个维度最合适的陈述。该决定产生一个1位数字,表示为该维度选择的水平。5个维度的数字可以组合成一个5位数字,用于描述受访者的健康状况,通过应用将值(也称为权重)附加到每个维度中的每个水平的公式,可以将其转换为单个汇总指数(EQ-5D指数)。EQ VAS在垂直线VAS上记录受访者的自评健康状况,其中终点被标记为“最佳可想象的健康状态”和“最差想象的健康状态”。根据个体受访者的判断,EQ VAS可用作健康结果的定量测量。

[0784] 终点

[0785] 主要终点

[0786] 本研究的主要终点是在第16周时实现ASAS 20响应的受试者比例。

[0787] 如果与安慰剂组相比,在第16周时ASAS 20的受试者比例在戈利木单抗组中被证实在统计意义上显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[0788] 重要次要终点

[0789] 以下重要次要终点按重要性顺序列出,如下所示:

[0790] 1. 在第16周时实现ASAS 40响应的受试者比例。

[0791] 2. 在第16周时BASDAI与基线实现至少50%改善的受试者比例。

[0792] 3. 在第16周时,BASFI与基线的变化。

[0793] 其他次要终点

[0794] 对照次要终点(控制多重性的I类错误率)。

[0795] 除了主要和重要次要终点之外,还将分析以下对照次要终点,并按重要性顺序列出,如下所示:

[0796] 1. 在第16周时, SF-36 PCS与基线的变化。

[0797] 2. 在第16周时, SF-36 MCS与基线的变化。

[0798] 3. 在第16周时, 实现低疾病活动 (ASAS部分消退) 水平的受试者比例。

[0799] 4. 在第16周时, ASQoL与基线的变化。

[0800] 5. 在第16周时, BASMI与基线的变化。

[0801] 为了控制多重性, 仅当主要和所有重要次要终点实现统计意义上的显著性时, 才按照上述顺序依次测试上述终点。

[0802] 其他次要终点包括

[0803] 除了主要、重要次要和对照次要终点之外, 还将评价以下终点:

[0804] 1. 在第2周时实现ASAS 20响应的受试者比例。

[0805] 2. 随着时间的推移, 实现ASAS 20响应和ASAS 40响应的受试者比例。

[0806] 3. 随着时间的推移, 实现低疾病活动 (ASAS部分消退) 的受试者比例。

[0807] 4. 随着时间的推移, BASFI基线的变化。

[0808] 5. 随着时间的推移, BASMI与基线的变化。

[0809] 6. 随着时间的推移, SF-36的PCS评分和MCS评分与基线的变化。

[0810] 7. 随着时间的推移, 实现BASDAI评分 <3 的受试者比例。

[0811] 8. 随着时间的推移, ASDAS与基线的变化。

[0812] 9. 随着时间的推移, 实现ASDAS主要改善 (降低 ≥ 2.0) 的受试者比例。

[0813] 10. 随着时间的推移, 实现ASDAS无活动性疾病 (<1.3) 的受试者比例。

[0814] 11. 在基线时随着时间的推移, 患有肌腱端炎的受试者中的肌腱端炎评分与基线的变化。

[0815] 12. 随着时间的推移, ASQoL评分与基线的变化。

[0816] 受试者完成/退出

[0817] 完成

[0818] 如果受试者在本研究的第60周时完成评估, 则认为他或她已完成研究。因任何原因过早停止研究治疗的受试者将不被视为已完成研究。

[0819] 退出研究

[0820] 受试者将会由于以下原因中的任一种而退出研究:

[0821] • 失去随访

[0822] • 同意退出

[0823] • 死亡

[0824] 如果受试者失去随访, 则研究地点人员必须做出一切合理的努力来联系受试者并确定停止/退出的原因。必须记录采取后续措施。

[0825] 当受试者在完成研究之前退出时, 退出的原因应记录在eCRF和源文档中。分配给被退出受试者的研究药物可能不会被分配给另一个受试者。退出的受试者不会被替换。如果受试者在治疗结束前停止研究试剂施用, 则应获得治疗后评估。

[0826] 在留在主要研究中时撤回对任选研究样本收集的参与

[0827] 受试者可以在留在研究中时撤回对任选研究样本的同意。在此类情况下,任选的研究样本将被销毁。样本销毁过程将如上所述进行。

[0828] 退出未来研究中的样本使用

[0829] 受试者可以撤回对研究样本使用的同意在此类情况下,样本将在临床研究不再需要后被销毁。用于研究的样本保留的详细信息显示在主要的ICF和单独的ICF中,用于任选的研究样本。

[0830] 统计方法

[0831] 简单描述性汇总统计,诸如连续变量的n、平均值、SD、中值、IQ范围、最小值和最大值,以及离散变量的计数和百分比将用于汇总大多数数据。

[0832] 除非另有说明,否则通过早先使用抗TNF α 疗法分层的Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) 检验将用于比较分类变量,诸如对治疗有响应的受试者比例。一般来讲,除非另有说明,否则将先前使用抗TNF α 疗法作为因子的ANOVA用于分析连续变量。所有统计测试将在 $\alpha=0.05$ (双侧) 下执行。除统计分析之外,图形数据显示 (例如,线图) 和受试者列表也可用于汇总/呈现数据。

[0833] 受试者信息的疗效分析和汇总将基于意向治疗群体 (即,所有随机受试者)。包括在疗效分析中的受试者将根据其指定的治疗组进行汇总,无论他们是否接受指定的治疗。

[0834] 安全性和PK分析将包括接受至少一次研究治疗施用的所有受试者。

[0835] 功效分析

[0836] 主要终点分析

[0837] 本研究的主要终点是在第16周时实现ASAS 20响应的受试者比例。

[0838] 为了解决主要目标,将使用通过先前使用抗TNF α 疗法 (是或否) 分层的CMH测试,比较安慰剂组和戈利木单抗组在第16周时实现ASAS 20响应的受试者比例,显著性水平为0.05 (双侧)。

[0839] 在该主要疗效分析中,来自所有随机化受试者的数据将根据其指定的治疗组进行分析,而不管其接受的实际治疗。如果受试者在第16周时具有至少1个ASAS成分的数据,则将使用最后一个观察结果 (LOCF) 程序来估算缺失的ASAS成分。如果受试者在第16周时没有所有ASAS成分的数据,则受试者将被视为无响应者。另外,将应用治疗失败规则。

[0840] 另外,将执行亚组分析,以通过人口统计学特征、基线疾病特征和基线药物评价主要疗效终点的一致性。如果适当,还将提供亚组与治疗组之间的相互作用测试。

[0841] 重要次要分析

[0842] 以下重要次要分析将按重要性顺序执行,如下所示:

[0843] 1. 将对在第16周时实现ASAS 40的受试者比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0844] 2. 将对在第16周时BASDAI与基线实现至少50%改善的受试者比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0845] 3. 将对在第16周时BASFI与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0846] 由于只存在2个治疗组 (1个统计学比较), 因此不需要在每个疗效终点内调整多重性。

[0847] 为了控制多重性的I型错误率,仅当主要终点在0.05显著性水平 (双侧) 实现统计

意义上的显著性时,才测试第一个重要次要终点。仅当主要终点和前面的重要次要终点在0.05显著性水平(双侧)具有统计意义的显著性时,才会测试随后的重要次要终点。

[0848] 其他计划的疗效分析

[0849] 对照次要终点(控制多重性的I类错误率)。

[0850] 除了主要和重要次要分析之外,还将执行以下疗效分析:

[0851] 1.将对在第16周时SF-36 PCS与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0852] 2.将对在第16周时SF-36 MCS与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0853] 3.将对在第16周时实现低水平疾病活动(ASAS部分消退)的受试者比例进行总结,并在治疗组之间进行比较。

[0854] 4.将对在第16周时ASQoL与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0855] 5.将对在第16周时BASMI与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0856] 为了控制多重性,仅当所有主要和重要次要终点实现统计意义上的显著性时,才按照上述顺序依次执行上述分析。否则,将提供标称p值。

[0857] 其他次要终点包括

[0858] 按治疗组汇总以下终点。如果未指定终点的访视,则至第52周将随着时间的推移进行汇总。治疗组之间的比较将在第16周之前和第16周时进行。

[0859] 1.在第2周时实现ASAS 20响应的受试者比例将按治疗组进行汇总,并在组之间进行比较。

[0860] 2.实现ASAS 20响应和ASAS 40响应的受试者比例。

[0861] 3.实现低疾病活动(ASAS部分消退)的受试者比例。

[0862] 4.BASFI基线的变化。

[0863] 5.BASMI与基线的变化。

[0864] 6.SF-36的PCS评分和MCS评分与基线的变化。

[0865] 7.实现BASDAI评分<3的受试者比例。

[0866] 8.ASDAS与基线的变化。

[0867] 9.实现ASDAS主要改善(降低 ≥ 2.0)的受试者比例。

[0868] 10.实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)的受试者比例。

[0869] 11.在基线时,患有肌腱端炎的受试者中的肌腱端炎评分与基线的变化。

[0870] 12.ASQoL评分与基线的变化。

[0871] 终点的标准

[0872] 如果与安慰剂组相比,在第16周时ASAS 20的受试者比例在戈利木单抗组中被证实在统计意义上显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[0873] 研究药物信息

[0874] 研究药物的物理描述

[0875] 戈利木单抗

[0876] 提供的用于IV施用的50mg戈利木单抗最终瓶装产物(FVP)是,装在4mL I型玻璃小瓶中的含CNT0 148IgG的一次性使用无菌溶液。每个小瓶容纳pH为5.5的4mL溶液,在组氨酸、山梨糖醇和聚山梨醇酯80的水性介质中,戈利木单抗为12.5mg/mL。不存在防腐剂。

[0877] 安慰剂

[0878] 生理盐水将作为无菌液体提供,用于在一次性输液袋中实现IV输注。不存在防腐剂。

[0879] 制备、处理和储存

[0880] 在研究现场,必须将装有戈利木单抗溶液的小瓶储存在2℃至8℃ (35.6°F至46.4°F) 下的密封冰箱中,不得冷冻,并且需要避光。应避免剧烈摇晃产品。在施用之前,应以目视方式检查产品,是否出现颗粒物和变色。如果在溶液中观察到变色、可见颗粒或其他固体杂质,则不应使用该产品。

[0881] 玻璃小瓶中的研究试剂将随时可用。研究试剂IV输注液将由非盲药剂师或其他获得适当许可和授权的人员根据受试者的体重来制备。药剂师或其他获得适当许可和授权的人员将使用适当数量的小瓶来制备所需体积的研究试剂。

[0882] 在研究材料的制备和施用期间,必须使用无菌程序。在制备和施用期间,应避免暴露在直射阳光下。

[0883] 结果和结论

[0884] 截至第28周的结果显示静脉注射戈利木单抗治疗成人活动性强直性脊柱炎患者的安全性和有效性:

[0885] 引言:

[0886] GO-ALIVE是一项3期、多中心、随机化、双盲、安慰剂对照试验,被设计用于评估IV戈利木单抗在患有活动性AS成年患者中的安全性和疗效。患者(年龄≥18岁)诊断为明确的AS(按照修订的纽约标准),并且BASDAI≥4、总背痛视觉模拟量表≥4和CRP≥0.3mg/dL。对患者进行随机分配(1:1),以在第0周、第4周以及每8周,IV戈利木单抗2mg/kg,或在第0周、第4周和第12周,IV安慰剂,其中在第16周,交叉IV戈利木单抗。高达20%的患者可能用过先前的抗TNF药物(除了戈利木单抗),并且高达10%的患者可能具有完全的脊柱关节强直。主要终点是第16周的ASAS 20。重要次要终点是在第16周时ASAS 40、BASDAI 50和BASFI评分发生变化。其他统计控制评估是BASMI、ASAS部分消退、SF-36 PCS/MCS和ASQoL。监测患者的不良情况,并在此报告截至第28周的数据。截至研究结束(第60周)时,所有研究者和一些赞助人员将对治疗组的任务不知情;因此,此处未报告个别患者的治疗组分配。

[0887] 结果:

[0888] 208名患者随机接受研究试剂(安慰剂:103;戈利木单抗:105)。治疗组之间的基线人口统计学和疾病特征相似。78%的患者为男性,平均年龄为39岁;平均病程为5.5年,89.9%为HLA-B27阳性,5.8%为完全的脊柱关节强直,14.4%为先前的抗TNF。在第16周,戈利木单抗患者与安慰剂组的比例显著更高,ASAS 20(73.3%v与26.2%),ASAS 40(47.6%与8.7%)和BASDAI 50(41.0%与14.6%)的响应(所有 $p<0.001$;表)。使用戈利木单抗时,BASFI的降低也显著更大。在第16周,戈利木单抗组与安慰剂组相比,SF-36PCS/MCS和ASQoL的改善明显更大。早在第2周时,使用戈利木单抗的ASAS 20明显高于安慰剂组(37.1%与19.4%; $p=0.005$)。戈利木单抗组的响应保持截至第28周。在第16周时交叉至戈利木单抗的安慰剂患者在第20周的临床反应方面有所改善,保持截至第28周。截至第16周,23.3%的安慰剂患者和32.4%的戈利木单抗患者出现≥1的AE;感染是最常见的AE(安慰剂,7.8%;戈利木单抗,11.4%)。截至第28周,所有戈利木单抗治疗患者中有34.8%的患者有≥1的AE;鼻咽炎(5.4%)是最常见的。两名患者(1.0%)有SAE(胰腺炎, $n=1$;肺炎, $n=1$)。截至第

28周没有机会性感染、恶性肿瘤或死亡、输注反应率为低(1.4%)。3名患者有4个反应;未出现严重或恶性AE。

[0889] 结论:

[0890] 与安慰剂相比,IV戈利木单抗2mg/kg可有效减少AS的体征和症状。截至第28周,戈利木单抗具有了良好的耐受性、安全性与其他抗TNF(包括SC戈利木单抗)一致。

[0891] 表8:临床反应

[0892]

第 16 周的疗效。		
	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg
随机患者, n	103	105
临床疗效		
ASAS20, n (%)	27 (26.2%)	77 (73.3%)**
ASAS40, n (%)	9 (8.7%)	50 (47.6%)**
BASDAI 50, n (%)	15 (14.6%)	43 (41.0%)**
BASFI 与基线的变化		
n	98	105
平均值(SD)	-0.5 (2.0)	-2.4 (2.1)**
ASAS 部分消退, n (%)	4 (3.9%)	17 (16.2%)*
BASMI 与基线的变化 (线性)		
n	96	100
平均值(SD)	-0.1 (0.5)	-0.4 (0.6)**
健康相关的生活质量		
SF-36 PCS 评分中的基线的变化		
n	98	104
平均值(SD)	2.9 (6.2)	8.5 (7.5)**
SF-36 MCS 评分中自基线的变化		
n	98	104
平均值(SD)	0.8 (10.0)	6.5 (9.1)**
ASQoL 与基线的变化		
n	98	104
平均值(SD)	-1.8 (4.6)	-5.4 (5.0)**
* p < 0.01; **p ≤ 0.001 ASAS20/40, 强直性脊柱炎(ASAS)国际工作组标准的评估改善≥20%/40%; ASQoL, 强直性脊柱炎生活质量; BASDAI, 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数; BASFI, 巴斯强直性脊柱炎功能指数; BASMI, 巴斯强直性脊柱炎计量指数; SD: 标准偏差; SF-36 PCS/MCS, 36 项短期健康调查生理/心理成分汇总		

[0893] 表9:截至第28周实现ASDAS无活动性疾病(<1.3)的受试者数量;完整分析集合

[0894]

	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg
分析集: 全分析集	103	105
受试者在第 2 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	0	10 (9.5%)
%差值(95% CI) ^b		9.6 (3.93, 15.19)
p 值 ^c		0.001

[0895]

	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg
受试者在第 4 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	0	15 (14.3%)
%差值(95% CI) ^b		14.3 (7.60, 21.00)
p 值 ^c		<0.001
受试者在第 8 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	3 (2.9%)	22 (21.0%)
%差值(95% CI) ^b		18.1 (9.66, 26.51)
p 值 ^c		<0.001
受试者在第 12 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	1 (1.0%)	20 (19.0%)
%差值(95% CI) ^b		18.1 (10.34, 25.83)
p 值 ^c		<0.001
受试者在第 16 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	3 (2.9%)	29 (27.6%)
%差值(95% CI) ^b		24.8 (15.62, 33.90)
p 值 ^c		<0.001
受试者在第 20 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	29 (28.2%)	30 (28.6%)
受试者在第 28 周时可评估 ASDAS 无活动性疾病(<1.3) ^a	103	105
患有 ASDAS 无活动性疾病的受试者(<1.3)	24 (23.3%)	31 (29.5%)
^a ASDAS 无活动性疾病(<1.3)基于使用治疗失败的推算数据 (仅截至第 16 周) 和基于缺失数据的 LOCF。		
^b 置信区间基于先前抗 TNF 疗法的 Wald 统计控制 (是, 否)。		
^c p 值基于先前抗 TNF 治疗的 CMH 测试控制 (是, 否)。		

[0896] 参考文献-实施例9

[0897] 1.Anderson JJ,Baron G,van der Heijde D,Felson DT,Dougados

M. Ankylosing spondylitis assessment group preliminary definition of short-term improvement in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1876-1886.

[0898] 2. Assessment of SpondyloArthritis. Ankylosing spondylitis disease activity score. Available at: <http://www.asasgroup.org/research.php?id=01>. Accessed on 17 April 2014.

[0899] 3. Brandt J, Haibel H, Cornely D, et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum.* 2000;43(6):1346-1352.

[0900] 4. Brandt J, Khariouzov A, Listing J, et al. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1667-1675.

[0901] 5. Braun J, Bollow M, Neure L, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(4):499-505.

[0902] 6. Braun J, Brandt J, Listing J, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet.* 2002;359(9313):1187-1193.

[0903] 7. Breban M, Vignon E, Claudepierre P, et al. Efficacy of infliximab in refractory ankylosing spondylitis: results of a six-month open-label study. *Rheumatology.* 2002;41:1280-1285.

[0904] 8. Calin A, Garrett S, Whitelock H, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2281-2285.

[0905] 9. Canete JD, Llena J, Collado A, et al. Comparative cytokine gene expression in synovial tissue of early rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Br J Rheumatol.* 1997;36(1):38-42.

[0906] 10. Clegg DO, Reda DJ, Weisman MH, et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of ankylosing spondylitis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum.* 1996;39(12):2004-2012.

[0907] 11. Davis JC, van der Heijde D, Braun J, et al. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis. A randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3230-3236.

[0908] 12. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(1):20-26.

[0909] 13. EuroQol Group. EuroQol—a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy.* 1990;16:199-208.

- [0910] 14.Garrett S,Jenkinson T,Kennedy LG,Whitelock H,Gaisford P,Calin A.A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis:the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index.J Rheumatol.1994;21(12):2286-2291.
- [0911] 15.Gorman JD,Sack KE,Davis JC Jr.Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor α .N Engl J Med.2002;346(18):1349-1356.
- [0912] 16.Gratacos J,Collado A,Filella X,et al.Serum cytokines(IL-6,TNF- α ,IL-1 β and IFN- γ)in ankylosing spondylitis:a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity.Br J Rheumatol.1994;33(10):927-931.
- [0913] 17.Hays RD,Martin SA,Sesti AM,Spritzer KL.Psychometric properties of the Medical Outcomes Study Sleep measure.Sleep Med.2005;6(1):41-44.
- [0914] 18.Inman RD,Davis JC Jr,Heijde Dv,et.al.Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis:results of a randomized, double-blind,placebo-controlled,phase III trial.Arthritis Rheum.2008;58(11):3402.
- [0915] 19.LandewéR,Braun J,Deodhar A,et.al.Efficacy of certolizumab pegol on signs and symptoms of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis:24-week results of a double-blind randomised placebocontrolled Phase 3 study.Ann Rheum Dis.2013;0:1-9.
- [0916] 20.Lange U,Teichmann J,Stracke H.Correlation between plasma TNF- α ,IGF-1,biochemical markers of bone metabolism,markers of inflammation/disease activity,and clinical manifestations in ankylosing spondylitis.Eur J Med Res.2000;5(12):507-511.
- [0917] 21.Machado P,LandewéR,Lie E,et al.Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score(ASDAS):defining cutoff values for disease activity states and improvement scores for the Assessment of SpondyloArthritis international Society.Ann Rheum Dis.2011;70:47-53.
- [0918] 22.Reveille JD.Epidemiology of spondyloarthritis in North America.Am J Med Sci.2011;341(4):284-286.
- [0919] 23.Sieper J,Rudwaleit M,Baraliakos X,et al.The Assessment of SpondyloArthritis international Society(ASAS)handbook:a guide to assess spondyloarthritis.Ann Rheum Dis.2009;68(2):ii1-ii44.
- [0920] 24.Stone M,Salonen D,Lax M,Payne U,Lapp V,Inman R.Clinical and imaging correlates of response to treatment with infliximab in patients with ankylosing spondylitis.J Rheumatol.2001;28(7):1605-1614.
- [0921] 25.Temekonidis TI,Alamanos Y,Nikas SN,et al.Infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis:an open label 12 month study.Ann Rheum Dis.2003;62(12):1218-1220.

- [0922] 26.Tousssirot E,Lafforgue P,Boucraut J,et al.Serum levels of interleukin 1-beta,tumor necrosis factor-alpha,soluble interleukin 2receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies.Rheumatol Int.1994;13 (5):175-180.
- [0923] 27.Van den Bosch F,Kruithof E,Baeten D,et al.Effects of a loading dose regimen of three infusions of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (infliximab) in spondyloarthropathy:an open pilot study.Ann Rheum Dis.2000;59 (6):428-433.
- [0924] 28.Van den Bosch F,Kruithof E,Baeten D,et al.Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondylarthropathy.Arthritis Rheum.2002; 46 (3):755-765.
- [0925] 29.van der Heijde D,Dijkmans B,Geusens P,et al.Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis:results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT).Arthritis Rheum.2005a;52 (2):582-591.
- [0926] 30.van der Heijde D,Kivitz A,Schiff MH,et.al.Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis:results of a multicenter, randomized,double-blind,placebo-controlled trial.Arthritis Rheum.2006;54 (7): 2136-2146.
- [0927] 31.van der Heijde D,Landewé R,Feldtkeller E.Proposal of a linear definition of the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) and comparison with the 2-step and 10-step definitions.Ann Rheum Dis.2008;67:489-493.
- [0928] 32.van der Heijde D,Lie E,Kvien T K,et al.A highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis: For the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS).Ann Rheum Dis.2009;68:1811-1818.
- [0929] 33.van der Heijde D,Sieper J,Maksymowych WP,Assessment of SpondyloArthritis international Society,et al.2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis.Ann Rheum Dis.2011;70 (6):905-908
- [0930] 34.van der Linden S,van der Heijde D.Ankylosing Spondylitis.In:Ruddy S,Harris ED,Sledge CB,ed.Kelley's Textbook of Rheumatology.6th ed,2001;1039-1053.
- [0931] 35.Ware JE,Kosinski M,Keller SD.Interpretation:Norm-Based.In:SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales:A User's Manual.Boston,MA:The Health Institute;1994:8:1-8:42.
- [0932] 36.Ware JE Jr,Sherbourne CD.The MOS 36 item short form health survey (SF 36),I.Conceptual framework and item selection.Med Care.1992;30 (6):473

483.

序列表

<110> Janssen Biotech, Inc.
Diane D. Harrison
Elizabeth C. Hsia
Lee-Lian Kim
Kim Hung Lo

<120> 用于治疗活动性强直性脊柱炎的抗 TNF 抗体、组合物和方法

<130> JBI5109WOPCT

<140> 未知

<141> 随附

<150> 62/455,651

<151> 2017-02-07

<160> 37

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

[0001] <213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 其他特征

<222> (1).. (5)

<223> 重链互补决定区 1 (CDR1)。

<400> 1

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 其他特征

<222> (1).. (17)

<223> 重链互补决定区 2 (CDR2)。

<220>

	<221>	其他特征
	<222>	(1)..(1)
	<223>	1 位处的 Xaa 选自 Ile、Phe 或 Val。
	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(2)..(2)
	<223>	2 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Met。
	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(3)..(3)
	<223>	3 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Leu。
	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(4)..(4)
	<223>	4 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(10)..(10)
	<223>	10 位处的 Xaa 选自 Lys 或 Tyr。
[0002]	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(11)..(11)
	<223>	11 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Tyr。
	<220>	
	<221>	其他特征
	<222>	(17)..(17)
	<223>	17 位处的 Xaa 选自 Asp 或 Gly。
	<400>	2
	Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys	
	1 5 10 15	
	Xaa	
	<210>	3
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	智人 (Homo sapiens)
	<220>	

<221> 其他特征
<222> (1)..(17)
<223> 重链互补决定区 3 (CDR3)。

<220>
<221> 其他特征
<222> (4)..(4)
<223> 4 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Val。

<220>
<221> 其他特征
<222> (5)..(5)
<223> 5 位处的 Xaa 选自 Ser、Ala 或 Gly。

<220>
<221> 其他特征
<222> (9)..(9)
<223> 9 位处的 Xaa 选自 Asn 或 Tyr。

<400> 3

Asp	Arg	Gly	Xaa	Xaa	Ala	Gly	Gly	Xaa	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
1				5					10					15	

[0003]

Val

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(11)
<223> 轻链互补决定区 1 (CDR1)。

<220>
<221> 其他特征
<222> (7)..(7)
<223> 7 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Tyr。

<400> 4

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Xaa	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(7)
<223> 轻链互补决定区 2 (CDR2)。

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0004] <220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(10)
<223> 轻链互补决定区 3 (CDR3)。

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(126)
<223> 重链可变区序列，如原始图 4 中所示

<220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(30)
<223> 框架 1

<220>

- <221> 其他特征
<222> (28)..(28)
<223> 28 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Thr。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (31)..(35)
<223> 互补决定区 1 (CDR1)。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (36)..(49)
<223> 框架 2
- <220>
<221> 其他特征
<222> (43)..(43)
<223> 43 位处的 Xaa 选自 Lys 或 Asn。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (50)..(66)
<223> 互补决定区 2 (CDR2)。
- [0005] <220>
<221> 其他特征
<222> (50)..(50)
<223> 50 位处的 Xaa 选自 Ile、Phe 或 Val。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (51)..(51)
<223> 51 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Met。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (52)..(52)
<223> 52 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Leu。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (53)..(53)
<223> 53 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (59)..(59)
<223> 59 位处的 Xaa 选自 Lys 或 Tyr。
- <220>
<221> 其他特征

- <222> (60).. (60)
<223> 60 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Tyr。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (66).. (66)
<223> 66 位处的 Xaa 选自 Asp 或 Gly。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (67).. (98)
<223> 框架 3
- <220>
<221> 其他特征
<222> (70).. (70)
<223> 70 位处的 Xaa 选自 Val 或 Ile。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (75).. (75)
<223> 75 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Pro。
- [0006] <220>
<221> 其他特征
<222> (78).. (78)
<223> 78 位处的 Xaa 选自 Thr 或 Ala。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (80).. (80)
<223> 80 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (94).. (94)
<223> 94 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (99).. (115)
<223> 互补决定区 3 (CDR3)。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (102).. (102)
<223> 102 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Val。
- <220>
<221> 其他特征
<222> (116).. (126)

<223> J6 区域

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Xaa Arg Phe Thr Xaa Ser Arg Asp Asn Xaa Lys Asn Xaa Leu Xaa
65 70 75 80

[0007]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Xaa Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Xaa Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 其他特征

<222> (1)..(108)

<223> 轻链可变区序列, 如原始图 5 中所示

<220>

<221> 其他特征

<222> (1)..(23)

<223> 框架 1

<220>
<221> 其他特征
<222> (24)..(34)
<223> 互补决定区 1 (CDR1)。

<220>
<221> 其他特征
<222> (35)..(49)
<223> 框架 2

<220>
<221> 其他特征
<222> (50)..(56)
<223> 互补决定区 2 (CDR2)。

<220>
<221> 其他特征
<222> (57)..(88)
<223> 框架 3

<220>
<221> 其他特征
<222> (89)..(98)
<223> 互补决定区 3 (CDR3)。

[0008]

<220>
<221> 其他特征
<222> (99)..(108)
<223> J3 区域

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

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

<220>
<221> 其他特征
<222> (1)..(157)
<223> 人 TNF α 单体序列

<400> 9

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

[0009]

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10
ttggtccagt cggactgg 18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

[0010]

<400> 11
cacctgcact cggtgctt 18

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12
cactgttttg agtgtgtacg ggcttaagtt 30

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13
gccgcacgtg tggaaggg 18

<210> 14
<211> 25
<212> DNA

	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 14 agtcaaggtc ggactggctt aagtt	25
	<210> 15 <211> 28 <212> DNA <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 15 gttgccccct ctcacaatct tcgaattt	28
	<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 16 ggcggtagac tactcgtc	18
[0011]	<210> 17 <211> 7 <212> PRT <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 17 Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile 1 5	
	<210> 18 <211> 35 <212> DNA <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 18 tttcgtacgc caccatggac tggacctgga gcatc	35
	<210> 19 <211> 34 <212> DNA <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 19 tttcgtacgc caccatgggg ttgggctga gctg	34

	<210> 20	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 20	
	tttcgtacgc caccatggag ttgggctga gcatg	35
	<210> 21	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 21	
	tttcgtacgc caccatgaaa cacctgtggt tcctc	35
	<210> 22	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0012]	<400> 22	
	tttcgtacgc caccatgggg tcaaccgcca tcctc	35
	<210> 23	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 23	
	Thr Val Thr Val Ser Ser	
	1 5	
	<210> 24	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 24	
	gtgccagtgg cagaggagtc cattcaagct taagtt	36
	<210> 25	
	<211> 5	

	<212> PRT	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 25	
	Met Asp Met Arg Val	
	1 5	
	<210> 26	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 26	
	ttgtcgaca ccatggacat gaggtcctc c	31
	<210> 27	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 27	
	ttgtcgaca ccatggaagc ccagctc	28
[0013]		
	<210> 28	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 28	
	Thr Lys Val Asp Ile Lys	
	1 5	
	<210> 29	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 29	
	ctggtttcac ctatagtttg cattcagaat tcggcgctt t	41
	<210> 30	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	

	<400> 30 catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatc	35
	<210> 31 <211> 35 <212> DNA <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 31 gtagaggtct ctgttaaggt tcttgtgcga catag	35
	<210> 32 <211> 19 <212> PRT <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220> <221> 其他特征 <222> (1).. (19) <223> 重链可变区序列的信号序列，如原始图 4 中所示	
[0014]	<400> 32 Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly 1 5 10 15 Val Gln Cys	
	<210> 33 <211> 20 <212> PRT <213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220> <221> 其他特征 <222> (1).. (20) <223> 轻链可变区序列的信号序列，如原始图 5 中所示	
	<400> 33 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro 1 5 10 15	

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 34
<211> 428
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> 其他特征
<223> 重链可变区 DNA 序列, 如具有编码序列 1 至 421 的原始图 2A 至图 2B 中所示

<400> 34
atggggtttg ggctgagctg ggttttctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggttcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc caggtccgg 180
caaggggctg gagtgggtgg cagttatata atatgatgga aaataaatac tacgcagact 240
ccgtgaaggg ccgattcacc atctagagac aattccaaga acacgtgta tctgcaaata 300
[0015] aacagccaga gctgaggaca cggtctgtga ttactgtgag agagatcgag gtatatcagc 360
aggtggaata ctactactac tacggtatgg acgtctgggg gcaagggacc acggtcaccg 420
tctcctca 428

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

<220>
<221> 其他特征
<223> 轻链可变区 DNA 序列, 如具有编码序列 1 至 387 的原始图 3 中所示

<400> 35
atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagttttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcttcatt cactttcggc 360
cctgggacca aagtggatat caaacgt 387

<210> 36
<211> 456
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> 其他特征
<222> (1).. (456)
<223> 戈利木单抗重链(HC)

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

[0016]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
	130						135					140					
	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
	145					150					155					160	
	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
					165					170						175	
	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
		195					200						205				
	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	
	210						215					220					
[0017]	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
	225					230					235					240	
	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
					245					250					255		
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
				260					265					270			
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
		275						280					285				
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
	290						295					300					
	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
	305					310					315					320	
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	

	325	330	335
	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
	340	345	350
	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
	355	360	365
	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	370	375	380
	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	385	390	395
	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	405	410	415
	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[0018]	420	425	430
	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	435	440	445
	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	450	455	
	<210> 37		
	<211> 215		
	<212> PRT		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
	<220>		
	<221> 其他特征		
	<222> (1).. (215)		
	<223> 戈利木单抗轻链(LC)		
	<400> 37		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1	5	10
			15

	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
		35						40					45				
	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
	65					70					75				80		
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro	
					85					90					95		
	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
				100					105						110		
[0019]	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
			115					120					125				
	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
		130					135					140					
	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
	145					150					155				160		
	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
					165					170					175		
	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				180					185					190			
	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195						200					205				
	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210					215										

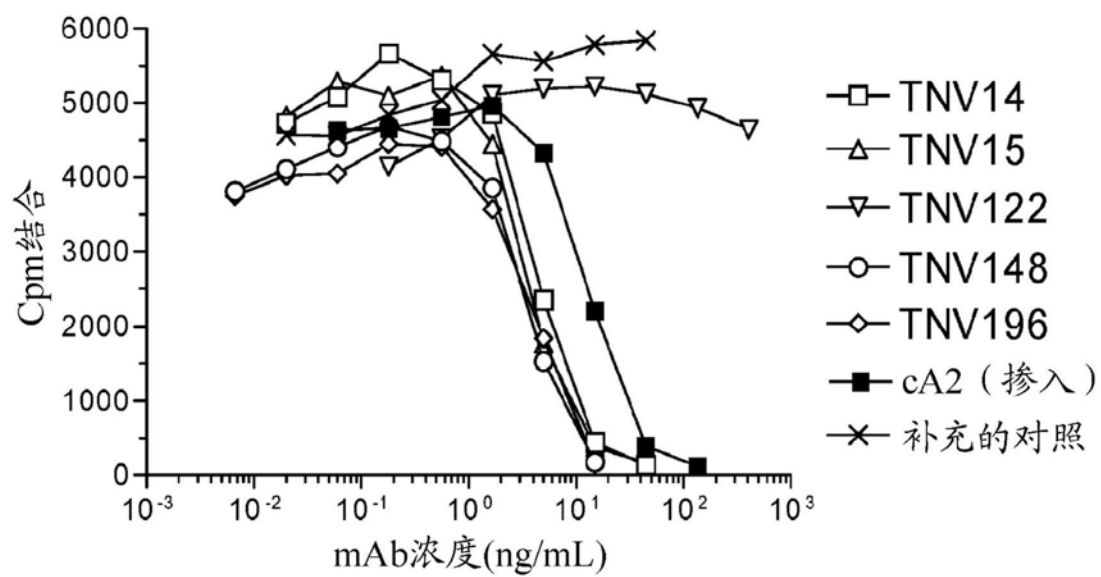


图1

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

图2A

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

图2B

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

图3

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

图4

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

图5

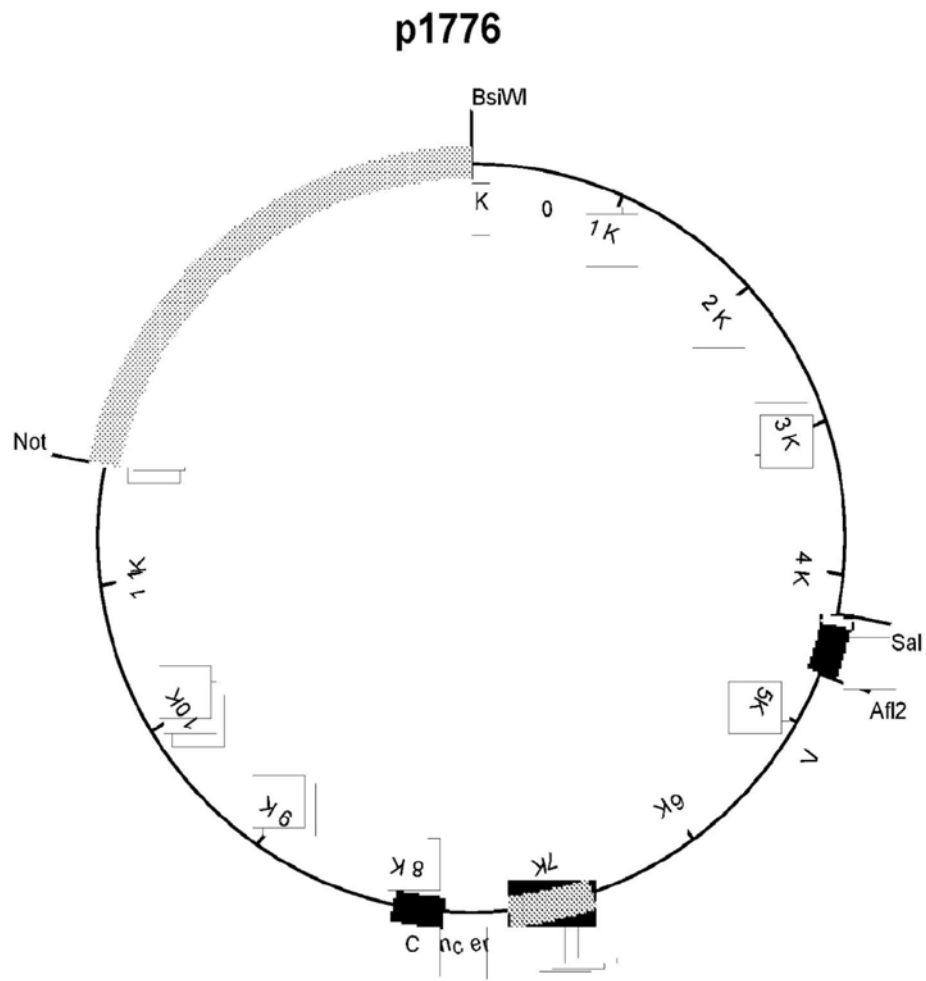


图6

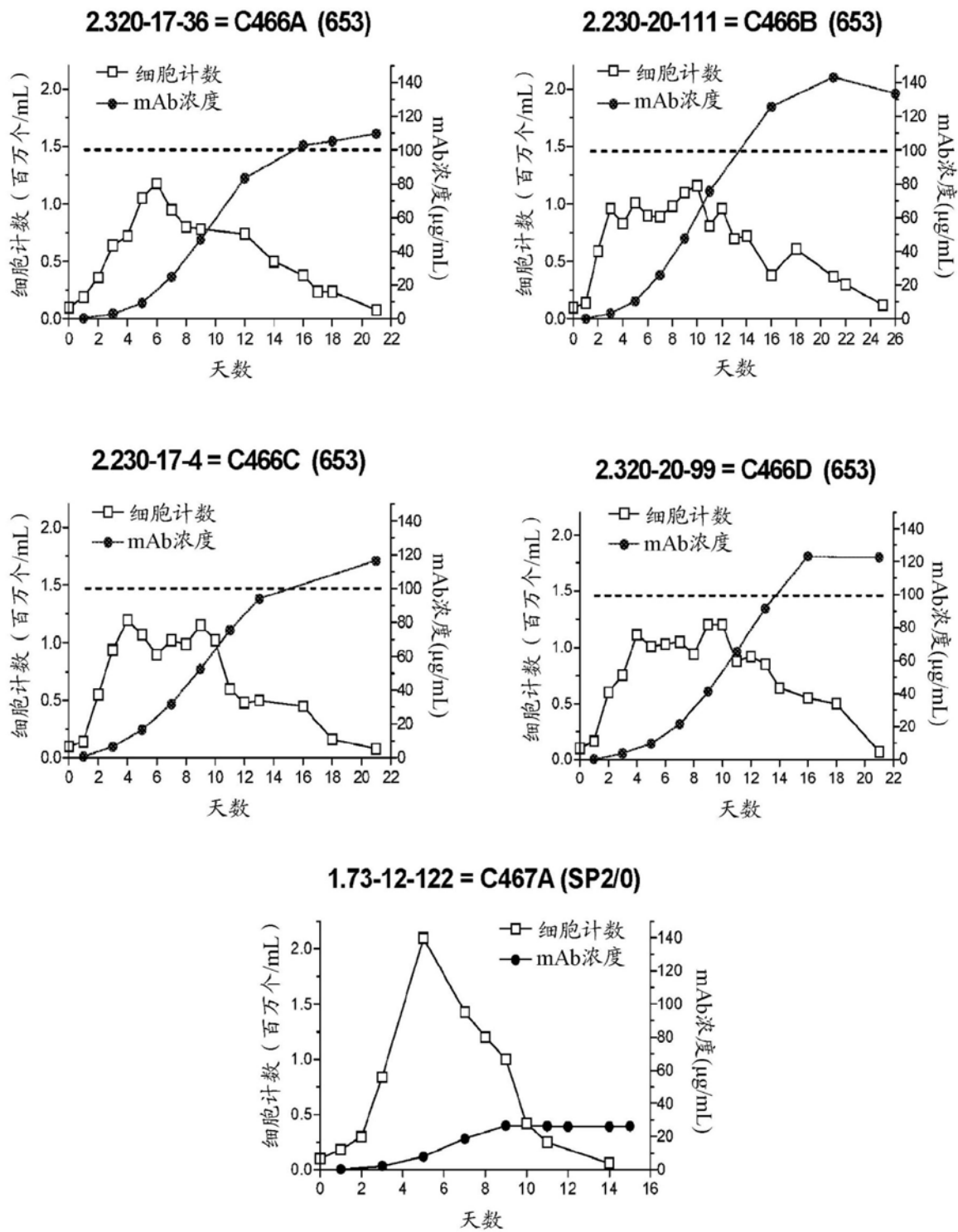


图7

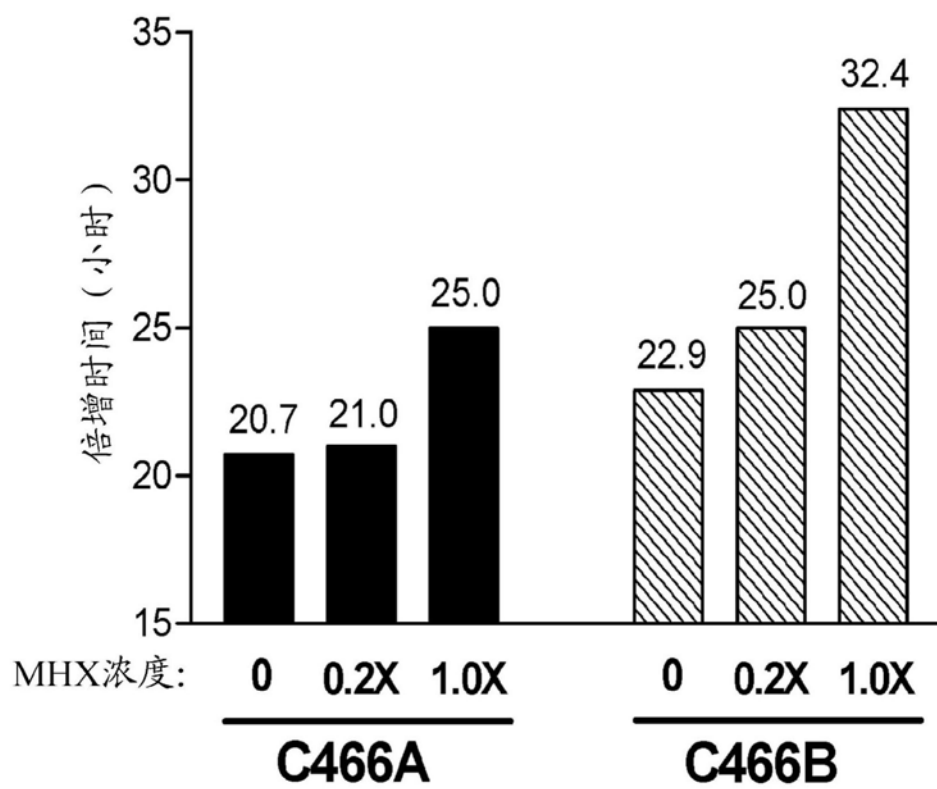


图8

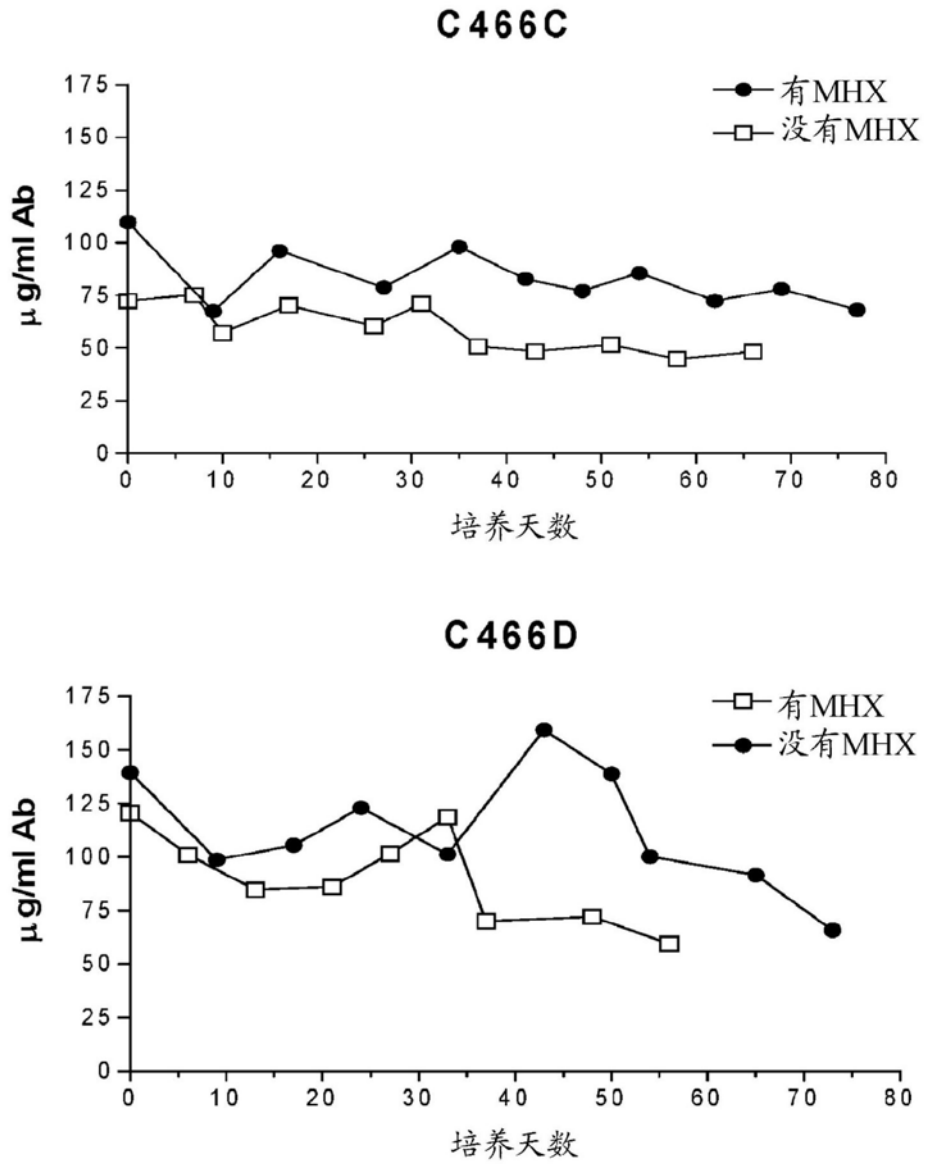


图9

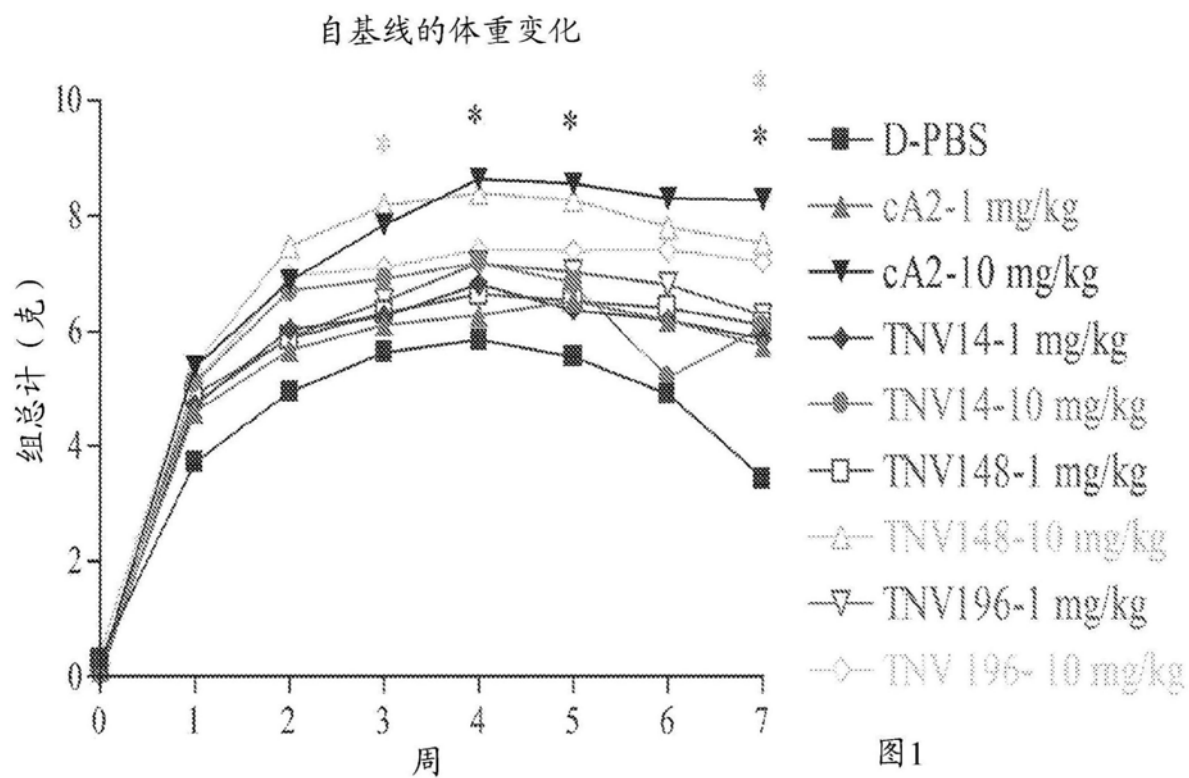


图10

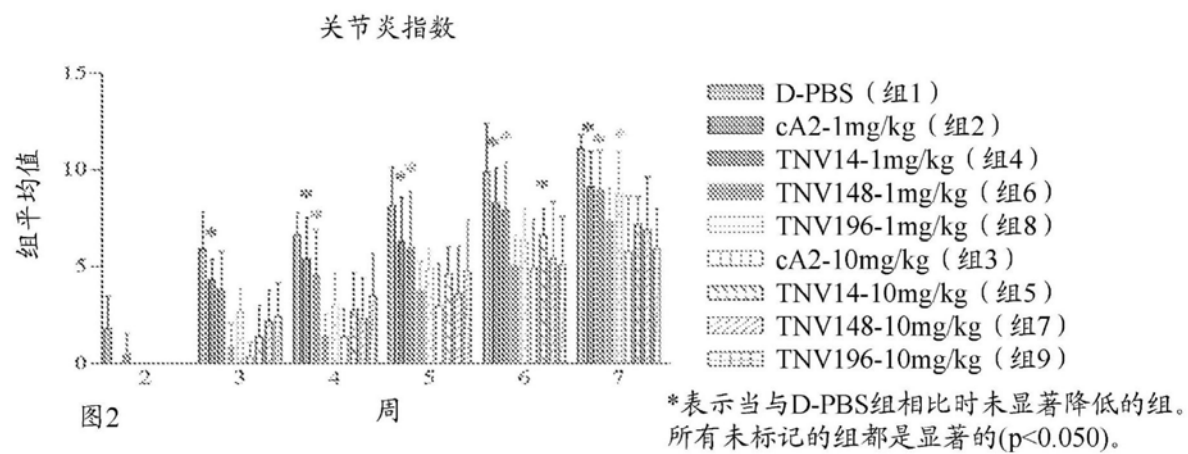


图11A

体重变化 (组平均值)

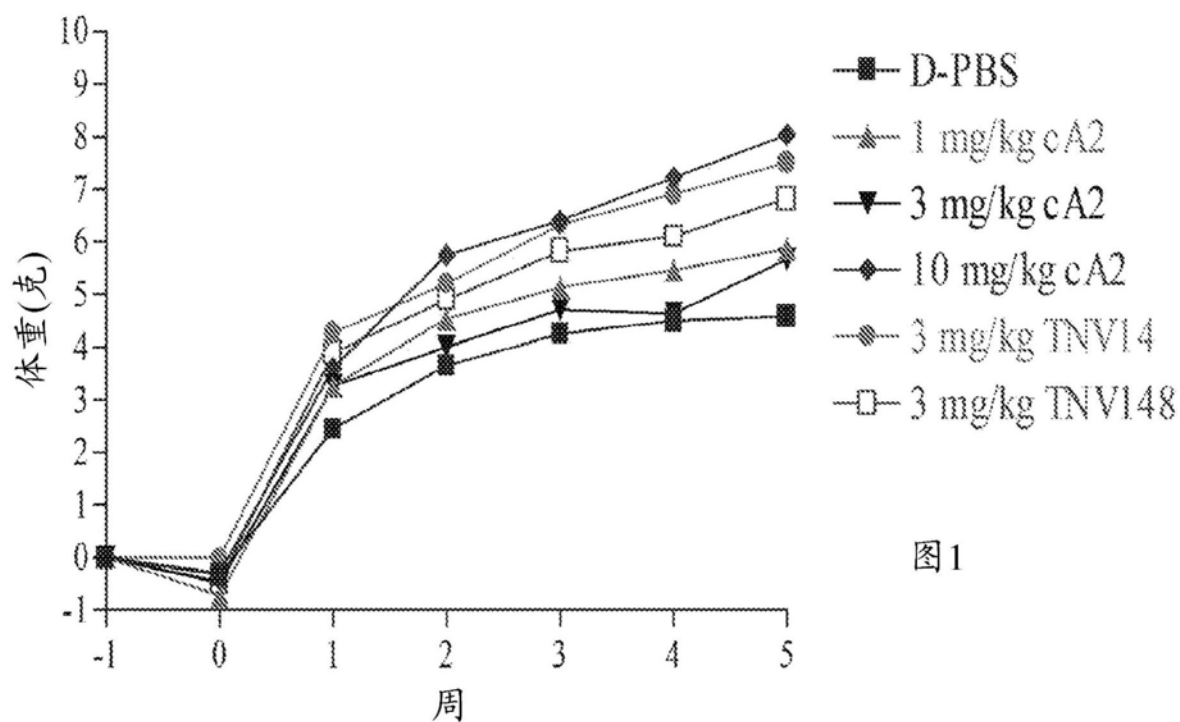


图1

图12

关节炎指数

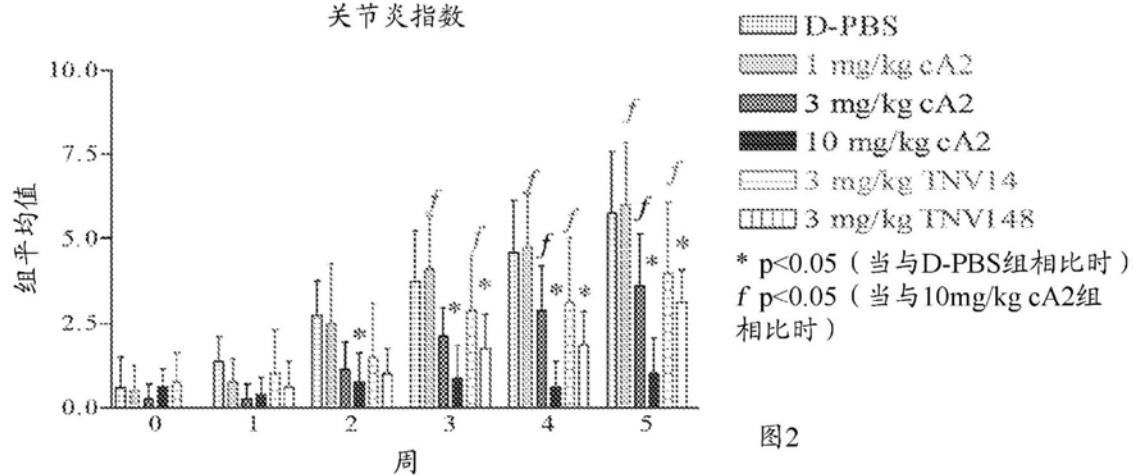


图2

图13A

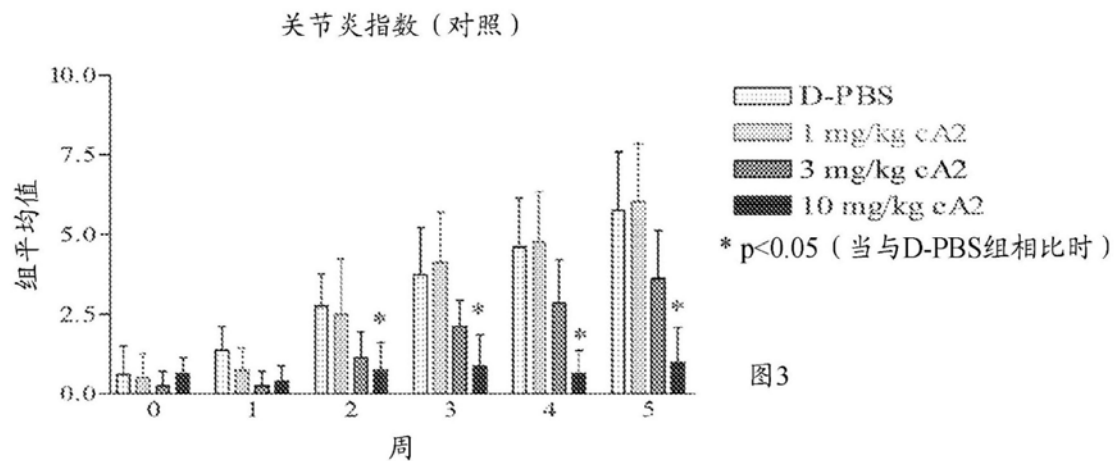


图13B

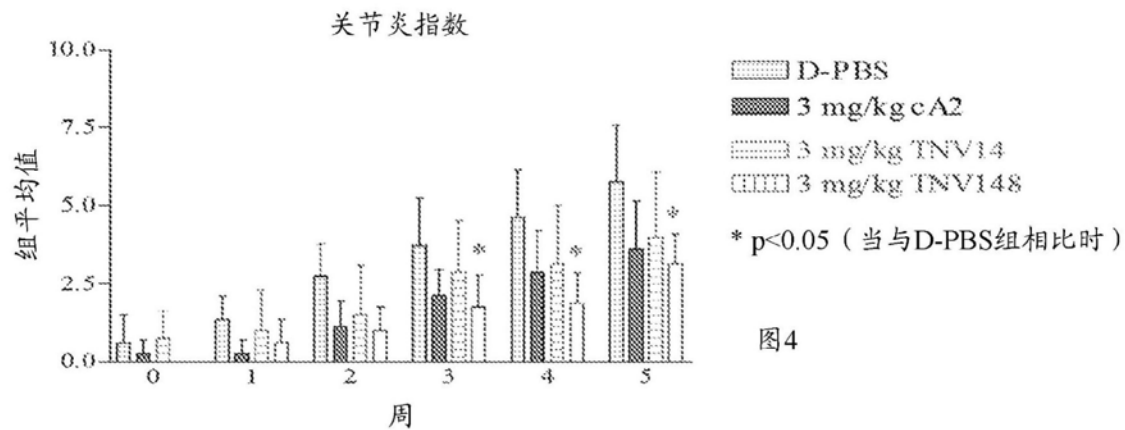


图13C

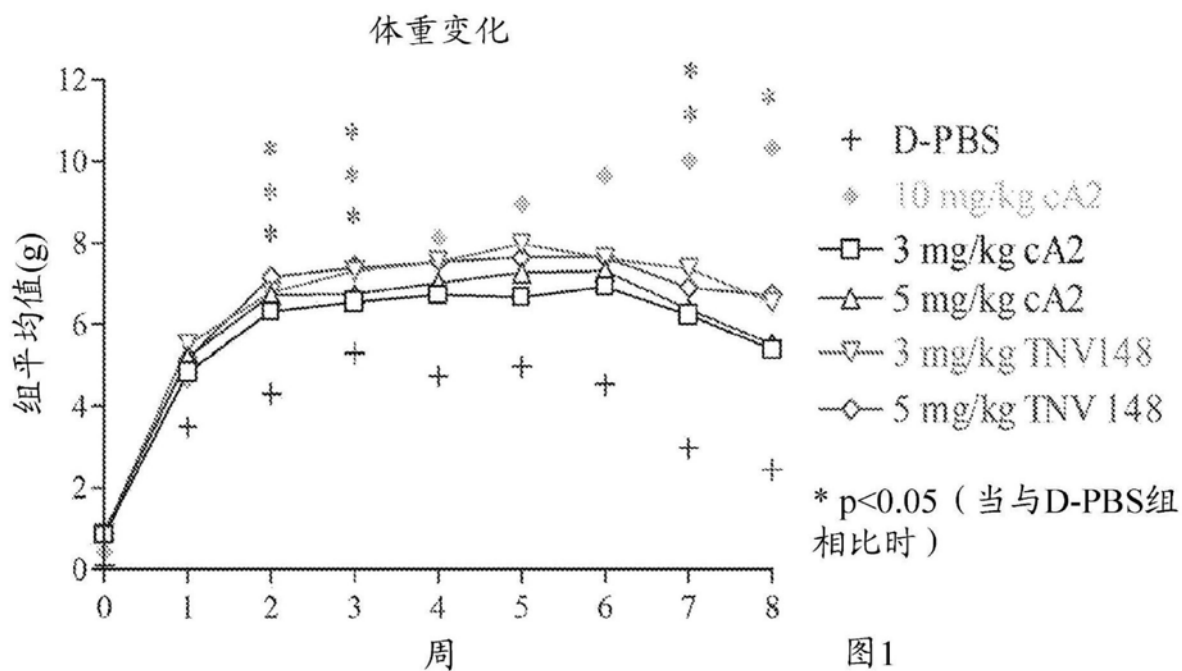


图14

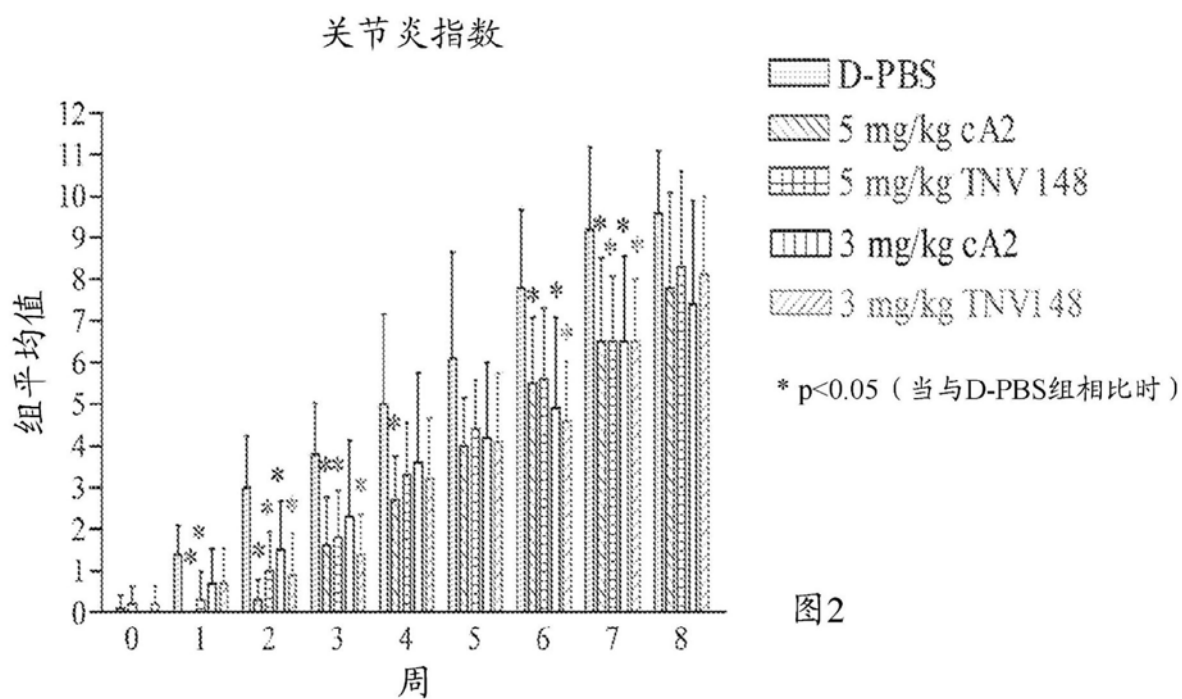


图15

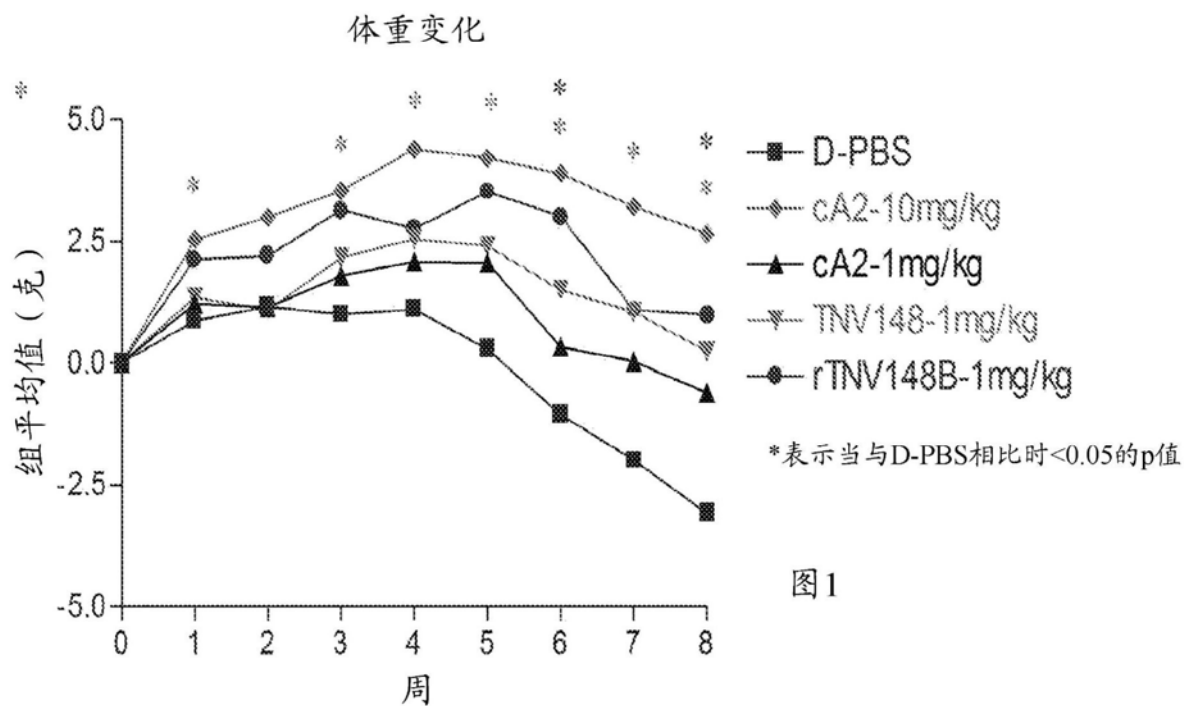


图16

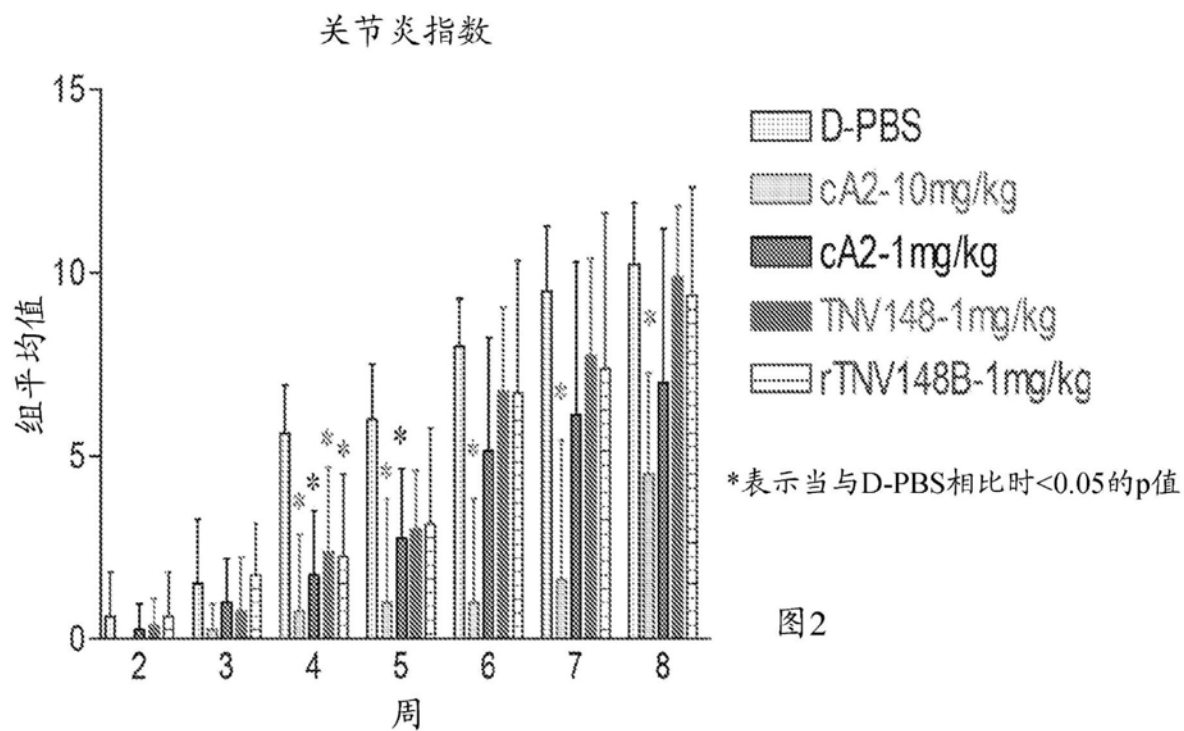


图17

研究的示意概览

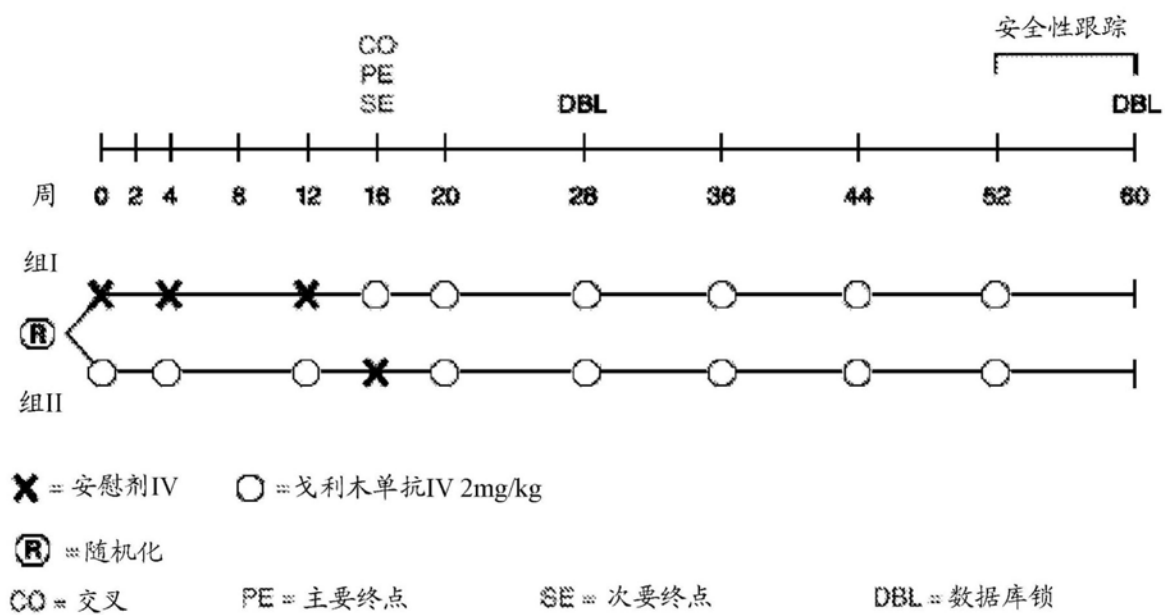


图18