



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.08

(21) Номер заявки
202193325

(22) Дата подачи заявки
2020.05.11

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ К ФНО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

(31) 62/856,295; 62/901,304; 62/924,895

(32) 2019.06.03; 2019.09.17; 2019.10.23

(33) US

(43) 2022.03.16

(86) PCT/IB2020/054435

(87) WO 2020/245676 2020.12.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Харрисон Дайен Д., Ся Элизабет С.,
Ким Ли-Лянь, Ло Ким Хун (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)

(56) Elaine Husni ET AL.: "Efficacy and Safety of Intravenous Golumumab through 1 Year in Patients with Active Psoriatic Arthritis", Arthritis Care and Research, 12 April 2019 (2019-04-12), XP055674841, DOI: 10.1002/acr.23905, Retrieved from the Internet: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acr.23905?af=R> [retrieved on 2020-03-09], the whole document, in particular table 1 and figures 1 and 2

ARTHUR KAVANAUGH ET AL.: "Safety and Efficacy of Intravenous Golumumab in Patients With Active Psoriatic Arthritis: Results Through Week Twenty-Four of the GO-VIBRANT Study", ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY (HOBOKEN), vol. 69, no. 11, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 2151-2161, XP055674814, US, ISSN: 2326-5191, DOI:

10.1002/art.40226, the whole document, in particular Patients and Methods, table 2 and discussion

P.J. MEASE ET AL.: "SAT0346?Clinically meaningful improvement in skin and nail psoriasis in bio-naïve active psoriatic arthritis patients treated with intravenous golumumab: results through week 24 of the go-vibrant study", SATURDAY, 16 JUNE 2018, 1 June 2018 (2018-06-01), pages 1038.2-1039, XP055714927, DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.1766, the whole document WO-A1-2018140121

Anonymous: "A Study of Golumumab in Participants With Active Psoriatic Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov", 4 July 2014 (2014-07-04), XP055715148, Retrieved from the Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02181673> [retrieved on 2020-07-15], the whole document

LAURA J. TUCKER ET AL.: "Assessing Disease Activity in Psoriatic Arthritis: A Literature Review", RHEUMATOLOGY AND THERAPY, vol. 6, no. 1, 23 November 2018 (2018-11-23), pages 23-32, XP055715159, ISSN: 2198-6576, DOI: 10.1007/s40744-018-0132-4, the whole document

M. ELAINE HUSNI ET AL.: "AB0754? CLINICALLY MEANINGFUL IMPROVEMENT IN SKIN AND NAIL PSORIASIS IN BIO-NAIVE ACTIVE PSORIATIC ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH INTRAVENOUS GOLIMUMAB: RESULTS THROUGH WEEK 52 FROM A PHASE-3 STUDY", ABSTRACTS ACCEPTED FOR PUBLICATION, 27 June 2019 (2019-06-27), pages 1843.2-1844, XP055714928, DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-eular.1282, the whole document

PHILIP MEASE ET AL.: "Inhibition of radiographic progression across levels of composite index-defined disease activity in patients with active psoriatic arthritis treated with intravenous golumumab: results from a phase-3, double-blind, placebo-controlled trial", ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY, vol. 22, no. 1, 6 March 2020 (2020-03-06), XP055674821, DOI: 10.1186/S13075-020-2126-1, the whole document, in particular discussion

(57) Изобретение относится к композициям и способам, в которых применяют антитела к ФНО или их антигенсвязывающие фрагменты в лечении активного псориатического артрита (PsA), например при лечении с применением антител к ФНО, имеющих тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII в виде файла с именем "JBI6103WOPCT1SeqListing.txt", созданного 1 мая 2020 г., размером 25 кБ. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, в которых применяют антитела к ФНО или их антигенсвязывающие фрагменты для лечения активного псориатического артрита (PsA), например для лечения с применением антитела к ФНО, содержащего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

Предпосылки создания изобретения

ФНО-альфа - это растворимый гомотример из белковых субъединиц с молекулярной массой 17 кДа. Кроме того, существует мембранно-связанная форма-предшественник ФНО с молекулярной массой 26 кДа.

Клетки, отличные от моноцитов или макрофагов, также продуцируют ФНО-альфа. Например, человеческие немоноцитарные опухолевые клеточные линии, Т-лимфоциты периферической крови CD4+ и CD8+, а также некоторые культивируемые линии Т- и В-клеток продуцируют ФНО-альфа.

ФНО-альфа обладает провоспалительной активностью, которая приводит к повреждению тканей, такому как деградация хряща и кости, к индукции молекул адгезии, индукции прокоагулянтной активности на клетках эндотелия сосудов, повышению адгезии нейтрофилов и лимфоцитов и стимулированию высвобождения фактора активации тромбоцитов из макрофагов, нейтрофилов и клеток эндотелия сосудов.

ФНО-альфа связывали с инфекциями, иммунными расстройствами, неопластическими патологиями, аутоиммунными патологиями и патологическими реакциями "трансплантат против хозяина". Связь ФНО-альфа с раком и инфекционными патологиями часто обусловлена состоянием катаболизма организма-хозяина. Пациенты с раком страдают от потери веса, обычно обусловленной анорексией.

Обширное истощение, связанное с раком и другими заболеваниями, известно как "кахексия". Кахексия включает прогрессирующее снижение веса, анорексию и устойчивую потерю безжирового компонента массы тела в ответ на появление злокачественного образования. Кахексическое состояние приводит к повышению онкологической заболеваемости и смертности. Существуют доказательства того, что ФНО-альфа участвует в кахексии, вызванной раком, инфекционной патологией и другими катаболическими состояниями.

Считается, что ФНО-альфа оказывает особое влияние на грамотрицательный сепсис и эндотоксический шок, включая лихорадку, слабость, анорексию и кахексию. Эндотоксин сильно активирует продукцию моноцитов/макрофагов и секрецию ФНО-альфа и других цитокинов. ФНО-альфа и другие цитокины, продуцируемые моноцитами, опосредуют метаболические и нейрогормональные ответы на эндотоксин. Введение эндотоксина людям-добровольцам приводит к возникновению острого заболевания с гриппоподобными симптомами, включая лихорадку, тахикардию, повышенную скорость метаболизма и высвобождение гормонов стресса. Уровень ФНО-альфа в кровотоке увеличивается у пациентов, страдающих грамотрицательным сепсисом.

Таким образом, ФНО-альфа вовлечен в воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, злокачественные опухоли и/или нейродегенеративные заболевания, и его используют в качестве мишени для специфической биологической терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит и болезнь Крона. В открытых исследованиях с использованием моноклональных антител к ФНО-альфа отмечены благоприятные эффекты с подавлением воспаления и успешным повторным лечением при рецидиве ревматоидного артрита и при болезни Крона. Благоприятные результаты также отмечены в рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях при ревматоидном артрите с подавлением воспаления.

Показано, что нейтрализующие антисыворотки или моноклональные антитела (мАт) к ФНО у не относящихся к человеку млекопитающих предотвращают нежелательные физиологические изменения и не допускают гибели после введения летальной дозы при экспериментальной эндотоксемии и бактериемии. Этот эффект продемонстрирован, например, в анализах летальности на грызунах и в моделях патологии на приматах.

Были описаны предполагаемые связывающиеся с рецептором локусы человеческого ФНО, и связывающиеся с рецептором локусы ФНО-альфа состоят из аминокислот 11-13, 37-42, 49-57 и 155-157 в ФНО.

Для не относящихся к человеку млекопитающих химерные, поликлональные (например, антисыворотки) и/или моноклональные антитела (мАт) и их фрагменты (например, продукты протеолитического расщепления или полученные из них гибридные белки) являются потенциальными терапевтическими агентами, которые исследуют в некоторых случаях для лечения определенных заболеваний. Однако та-

кие антитела или фрагменты могут индуцировать иммунный ответ при введении человеку. Такой иммунный ответ может приводить к опосредованному иммунными комплексами выведению антител или фрагментов из кровообращения, и делать повторное введение неприемлемым для терапии, и тем самым снижать терапевтический эффект для пациента и ограничивать повторное введение антитела или фрагмента. Например, повторное введение антител или фрагментов, содержащих нечеловеческие участки, может приводить к появлению сывороточной болезни и/или анафилаксии. Чтобы предотвратить эти и другие проблемы, применяли ряд подходов для снижения иммуногенности таких антител и их участков, включая химеризацию и гуманизацию, что хорошо известно в данной области. Однако эти и другие подходы по-прежнему могут приводить к получению антител или фрагментов, имеющих некоторую иммуногенность, низкую аффинность, низкую авидность или проблемы с клеточной культурой, увеличением масштаба, производством и/или низким выходом продукта. Таким образом, такие антитела или фрагменты могут не подходить идеально для производства или применения в качестве терапевтических белков.

В связи с необходимостью создания ингибиторов ФНО, преодолевающих одну или более из этих проблем, были разработаны представленные в настоящее время на рынке антитела к ФНО и другие ингибиторы ФНО, например, антитела к ФНО, такие как REMICADE® (инфликсимаб), HUMIRA® (адалимумаб) и SIMPONI® (голимумаб). Другие ингибиторы ФНО включают, например, CIMZIA® (цертолизумаб пегол), пегилированный фрагмент антитела, и ENBREL® (этанерцепт), растворимый гибридный белок ФНО-рецептора. Обзор ингибиторов ФНО см., например, в публикации Lis et al., Arch Med Sci. 2014 Dec 22; 10(6): 1175-1185.

Псориатический артрит (PsA) представляет собой хронический воспалительный, обычно отрицательный в отношении ревматоидного фактора (RF) артрит, который связан с псориазом. Распространенность псориаза в общей популяции европейской расы составляет приблизительно 2%. PsA развивается у приблизительно 6-39% пациентов с псориазом. Пик псориатического артрита приходится на возраст от 30 до 55 лет, и он одинаково поражает как мужчин, так и женщин. Псориатический артрит поражает периферические суставы, осевой скелет, крестцово-подвздошные суставы, ногти и места соединения сухожилий с костью и связан с псориатическими поражениями кожи. У более половины пациентов с PsA могут быть признаки эрозии на рентгеновских снимках, и тяжелая эрозивная артропатия развивается у до 40% пациентов. Псориатический артрит приводит к функциональному нарушению, снижению качества жизни и повышению смертности.

Взаимодействия между Т-клетками и моноцитами/макрофагами, которые являются первичным источником провоспалительных цитокинов, играют роль в патогенезе PsA. Повышенные уровни ФНО-α были обнаружены в суставной жидкости и тканях, а также в псориатических кожных поражениях у пациентов с PsA. Кроме того, показано, что биологические способы лечения, нацеленные на ФНО, включая инфликсимаб, подкожный (п/к) голимумаб, адалимумаб и цертолизумаб пегол, индуцируют быстрое и значимое улучшение артрита и псориаза у субъектов с активным PsA, при этом сохраняется приемлемый профиль безопасности. С учетом безопасности и эффективности голимумаба при п/к введении предположили, что голимумаб при в/в введении может также иметь приемлемый профиль безопасности, соответствующий другим ингибиторам ФНО-α.

Изложение сущности изобретения

Общие и предпочтительные варианты осуществления изобретения определены, соответственно, независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, прилагаемыми к настоящему документу, которые для краткости включены в настоящий документ путем ссылки. Другие предпочтительные варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания в комбинации с прилагаемыми на фигурах чертежами.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается ремиссия/низкая активность заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности PsA (PASDAS), ремиссия по шкале оценки клинического индекса активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у >45% пациентов наблюдается ремиссия/низкая активность заболевания по шкале оценки DAPSA, у >45% пациентов наблюдается отсутствие активности заболевания по шкале оценки PASDAS, у >25% пациентов наблюдается ремиссия по шкале оценки CDAI, у >40% пациентов наблюдается минимальная активность заболевания (MDA)

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается ремиссия/низкая активность заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности PsA (PASDAS), ремиссия по шкале оценки клинического индекса активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA), и при этом возраст указанных пациентов составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается ремиссия/низкая активность заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (PASDAS), ремиссия по шкале оценки клинического индекса активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается ремиссия/низкая активность заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (PASDAS), ремиссия по шкале оценки клинического индекса активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, таким образом: пациентам вводят антитела к ФНО в дозе 2 мг/кг на неделю 0, 4, а затем каждые 8 недель.

- 3 -

составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается низкая активность заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (PASDAS), ремиссия по шкале оценки клинического индекса активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, а лечение дополнительно включает введение композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом на исходном уровне пациенты имеют поражение псориазом $\geq 3\%$ площади поверхности тела (BSA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у $>70\%$ пациентов наблюдается PASI75, у $>55\%$ пациентов наблюдается PASI90 или у $>25\%$ пациентов наблюдается PASI100.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом у пациентов наблюдается улучшение на ≥ 5 баллов по шкале дерматологического индекса качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у $>60\%$ пациентов наблюдается PASI75 и улучшение по шкале DLQI на ≥ 5 баллов, у $>50\%$ пациентов наблюдается PASI75 и улучшение по шкале DLQI на ≥ 5 баллов или у $>20\%$ пациентов наблюдается PASI100 и улучшение по шкале DLQI на ≥ 5 баллов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом у пациентов наблюдается улучшение показателя индекса Американской коллегии ревматологов на 20% (ACR20).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом у пациентов наблюдается улучшение показателя индекса Американской коллегии ревматологов на 20% (ACR20).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом возраст указанных пациентов составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО и возраст указанных пациентов составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100), и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, а лечение дополнительно включает

введение композиции с метотрексатом или без него (MTX).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антителк ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом пациенты на исходном уровне имеют поражение псориазом $\geq 3\%$ площади поверхности тела (BSA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у >30% пациентов наблюдается улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение по шкале DLQI на ≥ 5 баллов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение по шкале дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг в недели 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥5 баллов, и при этом возраст указанных пациентов составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥5 баллов, и при этом лечение дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последова-

тельность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом указанное антитело к ФНО вводят пациентам в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, в дозе 2 мг/кг антитела к ФНО в недели 0, 4, а затем каждые 8 недель.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО и возраст указанных пациентов составляет ≥ 18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов, и при этом указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, и указанное лечение дополнительно включает введение композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на 52 неделе указанного лечения у пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, наблюдается значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем

значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S= $-0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S= $-0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S= $-1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S= $-0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S= $-1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, vdH-S= $0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, vdH-S= $-1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, vdH-S= $-0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, vdH-S= $-1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и vdH-S= $-0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S= $-0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S= $-0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S= $-1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S= $-0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S= $-1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, vdH-S= $0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, vdH-S= $-1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, vdH-S= $-0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, vdH-S= $-1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и vdH-S= $-0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S= $-0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых

выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанную композицию вводят в течение периода 30 ± 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент представляет собой взрослого пациента в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически доказанной безопасностью и эффективностью, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем лечение включает введение указанной композиции пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относи-

тельно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S=-0,88 $\pm$ 2,3 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-0,48 $\pm$ 1,82 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-1,01 $\pm$ 2,384 (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S=-0,20 $\pm$ 1,965 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S=-1,16 $\pm$ 2,46 (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, vdH-S=0,03 $\pm$ 2,44 (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, vdH-S=-1,49 $\pm$ 2,22 (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, vdH-S=-0,30 $\pm$ 2,52 (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, vdH-S=-1,06 $\pm$ 2,41 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и vdH-S=-0,81 $\pm$ 2,12 (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанное лечение дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S=-0,88 $\pm$ 2,3 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-0,48 $\pm$ 1,82 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-1,01 $\pm$ 2,384 (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S=-0,20 $\pm$ 1,965 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S=-1,16 $\pm$ 2,46 (CO) у паци-

ентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S=0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S=-1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S=-0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S=-1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S=-0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S=-0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S=-0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S=-1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S=-0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S=-1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S=0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S=-1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S=-0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S=-1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S=-0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S=-0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S=-0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у

которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанную композицию вводят в течение периода 30 ± 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент представляет собой взрослого пациента в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале $vdH-S$ для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде ($vdH-S$) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у

которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: $\text{vdH-S} = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $\text{vdH-S} = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $\text{vdH-S} = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $\text{vdH-S} = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $\text{vdH-S} = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $\text{vdH-S} = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $\text{vdH-S} = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $\text{vdH-S} = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $\text{vdH-S} = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $\text{vdH-S} = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, которые получали лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: $\text{vdH-S} = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $\text{vdH-S} = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $\text{vdH-S} = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $\text{vdH-S} = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $\text{vdH-S} = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $\text{vdH-S} = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $\text{vdH-S} = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $\text{vdH-S} = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $\text{vdH-S} = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $\text{vdH-S} = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом указанную композицию вводят таким образом: указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем способ дополнительно включает введение перед, одновременно или после указанного (а) введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из поддающейся обнаружению метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориатического средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, ци-

токина или антагониста цитокина.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО млекопитающего пациентам посредством в/в инфузии, при этом на неделе 52 указанного лечения у пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, наблюдается значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), па-

циентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S=-0,88 $\pm$ 2,3 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-0,48 $\pm$ 1,82 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-1,01 $\pm$ 2,384 (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S=-0,20 $\pm$ 1,965 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S=-1,16 $\pm$ 2,46 (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, vdH-S=0,03 $\pm$ 2,44 (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, vdH-S=-1,49 $\pm$ 2,22 (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, vdH-S=-0,30 $\pm$ 2,52 (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, vdH-S=-1,06 $\pm$ 2,41 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и vdH-S=-0,81 $\pm$ 2,12 (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО млекопитающего пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: vdH-S=-0,88 $\pm$ 2,3 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-0,48 $\pm$ 1,82 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, vdH-S=-1,01 $\pm$ 2,384 (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, vdH-S=-0,20 $\pm$ 1,965 (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, vdH-S=-1,16 $\pm$ 2,46 (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, vdH-S=0,03 $\pm$ 2,44 (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, vdH-S=-1,49 $\pm$ 2,22 (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, vdH-S=-0,30 $\pm$ 2,52 (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, vdH-S=-1,06 $\pm$ 2,41 (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и vdH-S=-0,81 $\pm$ 2,12 (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w), причем указанное по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего вводят в течение периода 30 $\pm$ 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО млекопитающего пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низ-

кая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент представляет собой взрослого пациента в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего для применения в лечении пациентов с активным псориатическим артритом с клинически подтвержденной безопасностью и клинически подтвержденной эффективностью, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, причем указанное лечение включает введение по меньшей мере одного выделенного антитела к ФНО млекопитающего пациентам посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 52 указанного лечения пациенты, получавшие лечение антителом к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, причем значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S выбрано из группы, состоящей из: $vdH-S = -0,88 \pm 2,3$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -0,48 \pm 1,82$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, $vdH-S = -1,01 \pm 2,384$ (CO) у пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по PASDAS, $vdH-S = -0,20 \pm 1,965$ (CO) у пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, $vdH-S = -1,16 \pm 2,46$ (CO) у пациентов, у которых выявлена MDA, $vdH-S = 0,03 \pm 2,44$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует MDA, $vdH-S = -1,49 \pm 2,22$ (CO) у пациентов, у которых выявлена VLDA, $vdH-S = -0,30 \pm 2,52$ (CO) у пациентов, у которых отсутствует VLDA, $vdH-S = -1,06 \pm 2,41$ (CO) у пациентов, у которых выявлена ремиссия по CDAI, и $vdH-S = -0,81 \pm 2,12$ (CO) у пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, при этом по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанное лечение дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хрониче-

ского заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует через 52 недели лечения, причем указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения выбрано из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по HAQ-DI= $-0,63 \pm 0,5$ стандартное отклонение (CO), среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 PCS= $9,4 \pm 8,1$ CO, среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 MCS= $5,3 \pm 10,2$ CO, среднего значения изменения относительно исходного уровня= $9,2 \pm 9,8$ Co, среднего значения изменения относительно исходного уровня по EQ-VAS= $20,2 \pm 24,2$ CO и среднего значения изменения относительно исходного уровня по DLQI= $-8,1 \pm 7,7$ CO.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом, что указанное антителовключающее введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанную композицию вводят в течение периода 30 ± 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент является взрослым пациентом в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем данный способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориазического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем способ дополнительно включает введе-

ние перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из поддающейся обнаружению метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противогрибкового средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует через 52 недели лечения, указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения выбрано из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по HAQ-DI= $-0,63 \pm 0,5$ стандартное отклонение (CO), среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 PCS= $9,4 \pm 8,1$ CO, среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 MCS= $5,3 \pm 10,2$ CO, среднего значения изменения относительно исходного уровня по EQ-VAS= $20,2 \pm 24,2$ CO и среднего значения изменения относительно исходного уровня по DLQI= $-8,1 \pm 7,7$ CO.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно ис-

ходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом, что указанное антителовключающее введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 недели лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанную композицию вводят в течение периода 30 ± 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 недели лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент является взрослым пациентом в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе лечения псориатического артрита у пациента, который включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 недели лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни

EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанную композицию вводят путем внутривенной инфузии таким образом: указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем данный способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует через 52 недели лечения, причем указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения выбрано из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по HAQ-DI= $-0,63 \pm 0,5$ стандартное отклонение (CO), среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 PCS= $9,4 \pm 8,1$ CO, среднего значения изменения относительно исходного уровня по SF-36 MCS= $5,3 \pm 10,2$ CO, среднего изменения относительно исходного уровня= $9,2 \pm 9,8$ Co, среднего значения изменения относительно исходного уровня по EQ-VAS= $20,2 \pm 24,2$ CO и среднего значения изменения относительно исходного уровня по DLQI= $-8,1 \pm 7,7$ CO.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем внутривенной инфузии в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его

антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем внутривенной инфузии в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанное антитело к ФНО вводят в течение периода 30 ± 10 мин.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем внутривенной инфузии в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем указанный пациент является взрослым пациентом в возрасте 18 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем внутривенной инфузии в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем данный способ дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО с метотрексатом (MTX) или без него.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвер-

жденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем внутривенной инфузии в дозе 2 мг/кг на неделе 0 и 4, а впоследствии каждые 8 недель (q8w), причем способ дополнительно включает введение перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из поддающейся обнаружению метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противогрибкового средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, содержащему одно или более из следующего: среднее значение изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднее значение изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднее значение изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднее значение изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднее значение изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальная аналоговая шкала (EQ-VAS) и среднее значение изменения относительно исходного уровня по дерматологическому

индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, содержащему одно или более из следующего: среднее значение изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднее значение изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднее значение изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднее значение изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднее значение изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкале (EQ-VAS) и среднее значение изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI) или их эквивалент.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту композиции, содержащей средства, которые приводят в контакт с ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного псориатического артрита у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей средства для приведения в контакт с ФНО, в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и имеет статистически значимое улучшение активности заболевания на 24 неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, причем улучшение сохраняется или прогрессирует до 52 недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего значения изменения относительно исходного уровня по опроснику оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса физического здоровья (SF-36 PCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по краткому опроснику-36 индекса психического здоровья (SF-36 MCS), среднего значения изменения относительно исходного уровня по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, среднего значения изменения относительно исходного уровня по Европейскому опроснику оценки качества жизни EuroQol-5D - визуальной аналоговой шкалы (EQ-VAS) и среднего значения изменения относительно исходного уровня по дерматологическому индексу качества жизни (DLQI).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает а.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; б.) лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь

(LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и с.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на 52 неделе указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает а.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; б.) лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и с.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S среди пациентов, включающих одного или более из пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает а.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; б.) лечение пациентов посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и с.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество антитела к ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S среди пациентов, включающих одного или более из пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI, или их эквивалент.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает а.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; б.) лечение пациентов путем введения посредством внутривенной (в/в) инфузии композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество средств, связы-

вающихся с ФНО; и с.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на неделе 52 указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество средства, связывающегося с ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния у пациентов, причем связанное с ФНО состояние представляет собой активный псориатический артрит, при этом способ включает а.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) у пациентов перед их лечением; б.) лечение пациентов путем введения посредством внутривенной инфузии фармацевтической композиции, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество средств, связывающихся с ФНО; и с.) определение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S для пациентов на 52 неделе указанного лечения; при этом указанные пациенты, получавшие лечение композицией, содержащей клинически подтвержденное безопасное и клинически подтвержденное эффективное количество средства, связывающегося с ФНО, имеют значимое среднее изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S у пациентов, выбранных из группы, состоящей из: пациентов, у которых выявлена ремиссия - низкая активность заболевания по шкале активности заболевания при PsA (DAPSA), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по DAPSA, пациентов, у которых выявлено отсутствие активности заболевания по шкале активности заболевания при PsA (PASDAS), пациентов, у которых выявлена умеренная активность заболевания по PASDAS, пациентов, у которых выявлена минимальная активность заболевания (MDA), пациентов, у которых отсутствует MDA, пациентов, у которых выявлена очень низкая активность заболевания (VLDA), пациентов, у которых не выявлена VLDA, пациентов, у которых выявлена ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), и пациентов, у которых выявлена низкая активность заболевания по CDAI.

Описание фигур

На фиг. 1 показано графическое представление, демонстрирующее анализ способности мАт TNV в супернатантах клеток гибридомы ингибировать связывание ФНО α с рекомбинантным ФНО-рецептором. Различные количества супернатантов клеток гибридомы, содержащих известные количества мАт TNV, предварительно инкубировали с фиксированной концентрацией (5 нг/мл) 125 I-меченного ФНО α . Смесь переносили в 96-луночные планшеты Optiplates, которые были предварительно покрыты p55-SF2, рекомбинантным гибридным белком рецептора ФНО/IgG. Количество ФНО α , связавшегося с рецептором p55 в присутствии мАт, определяли после отмывки от несвязанного материала и подсчета с помощью гамма-счетчика. Хотя в этих экспериментах исследовали восемь образцов мАт TNV, для простоты не показаны три мАт, которые по данным анализов последовательностей ДНК были идентичны одному из других мАт TNV. Каждый образец испытывали в двух повторностях. Представленные результаты отражают репрезентативные данные, полученные в ходе двух независимых экспериментов.

На фиг. 2A-B показаны последовательности ДНК переменных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии представляет собой ген DP-46. TNV обозначает, что показанная последовательность представляет собой последовательность TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. Первые три нуклеотида в последовательности TNV определяют кодон инициации трансляции Met. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 19 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации переменного участка. Трансляция аминокислот (однобуквенные аббревиатуры), начиная со зрелого мАт, показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) были связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии в данный момент времени. В тяжелых цепях мАт TNV используется соединительная область J6.

На фиг. 3 показаны последовательности ДНК переменных областей легкой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии является репрезентативным членом семейства Vg/38K человеческих ге-

нов зародышевой линии варибельного участка цепи каппа. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 16 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации варибельного участка. Аминокислотная трансляция зрелого мАт (однобуквенные сокращения) показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии. В легких цепях мАт TNV используют соединительную последовательность J3.

На фиг. 4 показаны выведенные аминокислотные последовательности варибельных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной последовательности (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена зародышевой линии DP-46 показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV идентична гену зародышевой линии. TNV148(B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. TNV означает, что показанная последовательность относится ко всем мАт TNV, если не показана другая последовательность. Штриховые линии в последовательности зародышевой линии (CDR3) означают, что последовательности не известны или отсутствуют в гене зародышевой линии.

На фиг. 5 показаны выведенные аминокислотные последовательности варибельных областей легкой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной последовательности (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена легкой цепи зародышевой линии Vg/38K-типа показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV идентична гену зародышевой линии. TNV148 (B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. "Все" означает, что показанная последовательность относится к TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и TNV186.

На фиг. 6 показаны схематические изображения экспрессирующих тяжелую и легкую цепи плазмид, которые применяют для получения гТNV148B-экспрессирующих клеток С466. р1783 представляет собой плазмиду тяжелой цепи, а р1776 представляет собой плазмиду легкой цепи. Домены, кодирующие варибельную и константную области гТNV148B, показаны черными прямоугольниками. Энхансеры иммуноглобулинов в интронах J-C показаны серыми прямоугольниками. Показаны значимые сайты рестрикции. Ориентация плазмидов показана таким образом, что транскрипция генов антител проходит в направлении по часовой стрелке. Плазида р1783 имеет длину 19,53 т.п.н., а плазида р1776 имеет длину 15,06 т.п.н. Известны полные нуклеотидные последовательности обеих плазмид. Последовательность, кодирующая варибельную область в р1783, может быть легко заменена другой последовательностью варибельной области тяжелой цепи путем замены рестрикционного фрагмента BsiWI/BstBI. Последовательность, кодирующая варибельную область в р1776, может быть заменена другой последовательностью варибельной области путем замены рестрикционного фрагмента SalI/AflII.

На фиг. 7 показано графическое представление анализов кривых роста пяти продуцирующих гТNV148B клеточных линий. Культуры иницировали на 0 день, высевая клетки во флаконы Т75 в среде I5Q+МНХ с плотностью жизнеспособных клеток $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в объеме 30 мл. Используемые в этих исследованиях клеточные культуры находились в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и субклонирования. В последующие дни клетки в Т-флаконах тщательно ресуспендировали и извлекали аликвоту культуры 0,3 мл. Исследования кривых роста завершали, когда количество клеток падало ниже $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Количество живых клеток в аликвоте определяли по исключению трипанового синего, а оставшуюся часть аликвоты хранили для последующего определения концентрации мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

На фиг. 8 показано графическое представление сравнения скоростей роста клеток в присутствии различных концентраций МНХ для селекции. Клеточные субклоны С466А и С466В размораживали в среде, не содержащей МНХ (IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамин) и культивировали в течение еще двух дней. Впоследствии обе клеточные культуры разделяли на три культуры, которые или не содержали МНХ, или содержали 0,2X МНХ или 1X МНХ. Через день в свежие флаконы Т75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 ч в течение одной недели. Время удвоения в течение первых 5 дней рассчитывали по формуле в SOP PD32.025, и эти данные

показаны над столбцами.

На фиг. 9 показаны графические изображения стабильности продукции мАт с течением времени для двух продуцирующих rTNV148B клеточных линий. Субклоны клеток, находившиеся в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и субклонирования, использовали для запуска длительных серийных культур в 24-луночных культуральных чашках. Клетки культивировали в среде I5Q с селекцией по МНХ и без нее. Клетки непрерывно пересеивали путем разделения культур каждые 4-6 дней для поддержания новых жизнеспособных культур, в то время как предыдущие культуры расходовали. Аликвоты супернатанта расходных клеток собирали вскоре после вывода культур в расход и хранили до определения концентраций мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

На фиг. 10 показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 4. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг. При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым в период 3-7 недель. Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования.

На фиг. 11А-С представлено прогрессирование тяжести заболевания, по данным индекса артрита, как представлено в примере 4. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг сА2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг сА2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг сА2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

На фиг. 12 показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 5. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на основании массы тела и получали внутрибрюшинную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытываемого препарата оценивали в группах 1-6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

На фиг. 13А-С представлены графики, демонстрирующие прогрессирование тяжести заболевания в примере 5 по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные, получавшие 3 мг/кг TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сА2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3-5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сА2.

На фиг. 14 показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 6. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу антитела (сА2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сА2.

На фиг. 15 представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита,

как показано в примере 6. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, причем 5 мг/кг сА2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1-3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сА2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сА2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами лечения (за исключением контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

На фиг. 16 показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 7. Сравнение эффективности однократного внутрибрюшинного введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

На фиг. 17 представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита, как показано в примере 7. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг сА2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутрибрюшинного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг сА2, не давала существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг сА2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в AI между группой, получавшей 1 мг/кг сА2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148B, в любой момент исследования.

На фиг. 18 показана схема модели исследования SIMPONI® (голимумаб) при внутривенном введении субъектам с активным псориатическим артритом (PsA).

На фиг. 19A-C показаны соотношения пациентов с исходным поражением кожи при псориазе $\geq 3\%$ от BSA, которые имеют ответ PASI75, PASI90 и PASI100 (фиг. 19A) в целом и пациенты, получавшие метотрексат (фиг. 19B) и не получавшие метотрексат (фиг. 19C) на исходном уровне. $*p < 0,0001$, $**p = 0,0020$, $***p = 0,0098$, значения p получены на основании теста Кохрана-Мантеля-Хензеля с применением метотрексата на исходном уровне (да/нет) в качестве переменной стратификации для всех пациентов и теста хи-квадрат по применению метотрексата на исходном уровне (да/нет). (BSA=площадь поверхности тела, в/в=внутривенно, n=количество пациентов, PASI=индекс тяжести поражения псориазом).

На фиг. 20A-C показано среднее значение изменения относительно исходного уровня (фиг. 20A) mNAPSI^a и (фиг. 20B) DLQI^b в целом и у пациентов, получавших и не получавших метотрексат на исходном уровне, и (фиг. 20C) одновременное достижение клинически значимого улучшения относительно исходного уровня как по mNAPSI ($\geq 50\%/\geq 75\%/100\%$), так и по DLQI (улучшение на ≥ 5 баллов)^c. На фиг. 20A, $*p < 0,0001$, $**p = 0,0006$, значения P получены на основании ANCOVA с применением метотрексата (да/нет) на исходном уровне и оценки mNAPSI в качестве ковариат для всех пациентов и только на основании mNAPSI на исходном уровне с применением метотрексата (да/нет). На фиг. 20B, $*p < 0,0001$, значения P получены на основании ANCOVA с применением метотрексата (да/нет) на исходном уровне в качестве ковариата для всех пациентов и на основании ANOVA с применением метотрексата (да/нет). На фиг. 20C, $*p \leq 0,0002$, значения P получены на основании теста Кохрана-Мантеля-Хензеля с целью контроля применения метотрексата (да/нет) на исходном уровне для всех пациентов. (^amNAPSI оценивали у всех рандомизированных групп пациентов, имеющих mNAPSI > 0 на исходном уровне. ^bDLQI оценивали у всех рандомизированных групп пациентов, имеющих исходный уровень поражения кожи при псориазе $\geq 3\%$ BSA и исходным уровнем DLQI > 1 . ^cОценка проводилась во всех рандомизированных группах пациентов с исходным уровнем поражения кожи при псориазе $\geq 3\%$ BSA, mNAPSI > 0 и DLQI > 1 . ANCOVA=ковариационный анализ, ANOVA=дисперсионный анализ, BL=исходный уровень, BSA=площадь поверхности тела, DLQI=дерматологический индекс качества жизни, в/в=внутривенно, mNAPSI=модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей, n=число пациентов).

На фиг. 21A-b представлены соотношения пациентов, которые продемонстрировали ответ PASI 50/75/90/100 и улучшение по шкале DLQI^a (фиг. 21A) на ≥ 5 баллов или ответ ACR20^b (фиг. 21B). На фиг. 21A, $*p < 0,0001$, значения P получены на основании теста Кохрана-Мантеля-Хензеля с целью контроля применения метотрексата (да/нет) на исходном уровне для всех пациентов. На фиг. 21B, $*p < 0,0001$, значения P получены на основании теста Кохрана-Мантеля-Хензеля с целью контроля применения метот-

рексата (да/нет) на исходном уровне для всех пациентов. ^(a)В рандомизированных группах пациентов поражение кожи $\geq 3\%$ BSA и DLQI >1 на исходном уровне. ^(b)В рандомизированных группах пациентов поражение кожи $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне. ACR20=улучшение по критериям Американской коллегии ревматологов на 20%, BSA=площадь поверхности тела, DLQI=дерматологический индекс качества жизни, в/в=внутривенно, n=число пациентов, PASI=индекс тяжести поражения псориазом).

На фиг. 22A-F представлены соотношения пациентов с применением и без применения метотрексата на исходном уровне, которые продемонстрировали улучшения mNAPSI на $\geq 50\%/ \geq 75\%/100\%$ и улучшение по шкале DLQI^a (фиг. 22A-b) на ≥ 5 баллов, ответ по PASI 50/75/90/100 и улучшение по шкале DLQI^b (фиг. 22C-D) на ≥ 5 баллов или ответ^c ACR20 (фиг. 22E-F). На фиг. 22A, * $p < 0,0001$, ** $p = 0,0024$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. На фиг. 22B, * $p < 0,03$, ** $p > 0,05$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. На фиг. 22C, * $p < 0,0001$, ** $p = 0,0011$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. На фиг. 22D, * $p < 0,0001$, ** $p = 0,02$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. На фиг. 22E, * $p < 0,0001$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. На фиг. 22F, * $p < 0,0001$, ** $p < 0,04$, значения P получены на основании теста хи-квадратов. ^(a)В рандомизированных группах пациентов поражение кожи $\geq 3\%$ BSA, mNAPSI >0 и DLQI >1 на исходном уровне. ^(b)В рандомизированных группах пациентов поражение кожи $\geq 3\%$ BSA и DLQI >1 на исходном уровне. ^(c)В рандомизированных группах пациентов поражение кожи $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне. mNAPSI и DLQI основаны на импортированных данных с использованием LOCF в отношении недостающих данных. ACR20=улучшение по критериям Американского коллегия ревматологов на 20%, BSA=площадь поверхности тела, DLQI=дерматологический индекс качества жизни, в/в=внутривенно, LOCF=последнее наблюдение, mNAPSI=модифицированный индекс тяжести псориаза ногтей, n=число пациентов, PASI=индекс тяжести поражения псориазом).

Описание изобретения

В настоящем изобретении обеспечены композиции, содержащие антитела к ФНО, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, а также способы получения таких антител к ФНО.

В контексте настоящего документа термины "антитело к фактору некроза опухоли альфа", "антитело к ФНО", "участок антитела к ФНО" или "фрагмент антитела к ФНО" и/или "вариант антитела к ФНО" и т.п. включают любой белок или пептид, содержащий по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна определяющая комплементарность (CDR) область тяжелой или легкой цепи, либо ее связывающий лиганд участок, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, либо по меньшей мере один участок рецептора или связывающего белка ФНО, который можно встраивать в антитело настоящего изобретения. Такое антитело необязательно дополнительно воздействует на специфичный лиганд, например, без ограничений, такое антитело модулирует, снижает, повышает, выступает антагонистом, выступает агонистом, уменьшает, ослабляет, блокирует, ингибирует, уничтожает и/или препятствует по меньшей мере одной активности или связыванию ФНО, либо активности или связыванию рецептора ФНО *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. В качестве не имеющего ограничительного характера примера приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант настоящего изобретения может связываться по меньшей мере с одной молекулой ФНО или ее определенными участками, вариантами или доменами. Приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант может также необязательно влиять по меньшей мере на один вид активности или функции ФНО, например, без ограничений, синтез РНК, ДНК или белка, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО. Предполагается, что термин "антитело" будет дополнительно охватывать антитела, фрагменты расщепления, их определенные участки и варианты, включая миметики антител, или содержать участки антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или участка, включая одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ФНО млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с ФНО или его участками, включая, без ограничений, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), Facb (например, после расщепления плазмином), rFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и агрегации), Fv или scFv (например, полученные способами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, выше).

Такие фрагменты могут быть получены путем ферментативного расщепления, синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела могут также быть получены в различных укороченных формах с использованием генов антител, в которые были введены один или более стоп-кодонов ближе к 5' концу от сайта естественной остановки. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи F(ab')₂, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен CH₁ и/или шарнирную область тяжелой цепи.

Различные участки антител можно химически соединять обычными способами или можно получать в виде единого белка способами генной инженерии.

В контексте настоящего документа термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены C_L , C_H (например, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}), шарнир, (V_L , V_H)) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т.д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т.п.) и других млекопитающих определяются особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства, семейства. Химерные антитела дополнительно включают любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется или ослабевает иммуногенность у человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела. Следует отметить, что человеческое антитело может быть спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Когда человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может дополнительно содержать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

Можно также применять биспецифические (например, DuoBody®), гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания относится по меньшей мере к одному белку ФНО, а другая - к любому другому антигену. Способы получения биспецифических антител известны специалистам в данной области. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулинов, причем две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, причем только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка нужной молекулы, которую обычно выполняют с помощью аффинной хроматографии, может быть затруднительной и иметь низкий выход продукта, и для облегчения продукции биспецифических антител были разработаны различные стратегии.

Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение СНЗ-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

Термин "гомодимеризация" в данном документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин "гомодимер" в данном документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Термин "гетеродимеризация" в данном документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин "гетеродимер" в данном документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ и тем самым способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. По-

сле совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций в СНЗ-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образования биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации международной патентной заявки № WO 2011/131746. В способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене СНЗ, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи, получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCPEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

Специфичные к ФНО антитела (также называемые антителами к ФНО), используемые в способах и композиции настоящего изобретения, могут необязательно характеризоваться высокой аффинностью связывания с ФНО, причем необязательно и предпочтительно они имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, причем отдельные компоненты, такие как вариабельная область, константная область и каркас, по отдельности и/или в совокупности, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность. Антитела, которые можно использовать в изобретении, необязательно характеризуются способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. Под "низкой иммуногенностью" в настоящем документе понимают индукцию значимых ответов антител НАНА, НАСА или НАМА у менее около 75% или предпочтительно у менее около 50% получающих лечение пациентов, и/или индукцию низких титров у получающих лечение пациентов (менее около 300, предпочтительно менее около 100, по результатам измерения иммуноферментным анализом с двойным антигеном) (см. публикацию Elliott et al., *Lancet* 344:1125-1127 (1994), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

Полезные свойства. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно использовать для продукции по меньшей мере одного антитела к ФНО, или его определенного варианта, которые можно использовать для определения эффекта в клетке, ткани, органе или у животного (включая млекопитающих и человека), для диагностики, отслеживания, модулирования, лечения, ослабления, профилактики возникновения или для уменьшения симптомов по меньшей мере одного связанного с ФНО состояния, выбранного из, без ограничений, по меньшей мере одного из иммунного нарушения или заболевания, сердечно-сосудистого нарушения или заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического нарушения или заболевания.

Такой способ может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, организм

животного или пациента, которым требуется такое модулирование, лечение, ослабление, предотвращение или уменьшение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное количество может содержать количество от около 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсного), многократного или непрерывного введения, или для достижения концентрации в сыворотке крови 0,01-5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или любой эффективный интервал или значение, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях. Ссылки. Все цитируемые в настоящем документе публикации или патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки, поскольку они показывают уровень развития на момент настоящего изобретения и/или предоставляют описание и необходимую информацию для настоящего изобретения. К публикациям относятся любые научные или патентные публикации, или любая информация, доступная на любых носителях, включая все форматы записи, электронные и печатные форматы. Следующие ниже источники полностью включены в настоящий документ путем ссылки: Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001).

Антитела настоящего изобретения. По меньшей мере одно антитело к ФНО настоящего изобретения, содержащее все вариабельные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и/или все вариабельные области CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, 5 и 6, можно необязательно получать с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно специалистам в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Человеческие антитела, специфичные к человеческим белкам ФНО или их фрагментам, можно получать в ответ на соответствующий иммуногенный антиген, такой как выделенный белок ФНО и/или его участок (включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды). Другие специфичные или общие антитела млекопитающих можно получать аналогичным образом. Получение иммуногенных антигенов и продукцию моноклонального антитела можно выполнять любым приемлемым способом.

В одном подходе гибридомы получают путем слияния приемлемой иммортализованной клеточной линии (например, клеточной линии миеломы, такой как, без ограничений, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, 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, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMA1WA, NEURO 2A, или т.п., или гетеромиеломы, продукты их слияния, или любую клетку, или гибридную клетку, производную из них, или любую другую приемлемую клеточную линию, известную в данной области. См., например, www.atcc.org, www.lifetech.com. и т.п., причем антителопродуцирующие клетки, такие как, без ограничений, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие иммунные или клетки, содержащие В-клетки, или любые другие клетки, экспрессирующие константные, или вариабельные, или каркасные, или CDR-последовательности тяжелой или легкой цепи, в виде эндогенной или гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантных или эндогенных, относящихся к вирусам, бактериям, водорослям, прокариотам, амфибиям, насекомым, рептилиям, рыбам, млекопитающим, грызунам, лошадям, птицам, козам, овцам, приматам, эукариотам геномных ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальных ДНК или РНК, ДНК или РНК хлоропластов, гЯРНК, мРНК, тРНК, одно-, двух-или трехцепочечных, гибридизированных и т.п., или любых их комбинаций. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, *Immunology*, выше, глава 2, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов человека или других приемлемых животных, которые были иммунизированы интересующим антигеном. Для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, его определенный фрагмент или вариант настоящего изобретения, можно также использовать любую другую приемлемую клетку-хозяина. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделять с помощью селективных условий культивирования или других известных приемлемых способов и клонировать путем предельного разведения или сортировки клеток или других известных способов. Клетки, продуцирующие антитела с требуемой специфичностью, могут быть выбраны с помощью приемлемого анализа (например, ИФА).

Можно применять другие приемлемые способы продукции или выделения антител требуемой специфичности, включая, без ограничений, способы отбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, без ограничений, библиотеки дисплея бактериофагов, рибосом, олигонук-

леотидов, РНК, кДНК или т.п.; например, производства компаний Cambridge antibody Technologies, гр. Кембриджшир, Великобритания; MorphoSys, с. Мартинсрайд/к. Планегг, Германия; Biovation, г. Абердин, Шотландия, Великобритания; BioInvent, г. Лунд, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, г. Беркли, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (12.05.94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; PCT/US94/1234; WO 92/18619; WO 96/07754; (Scripps); EP 614989 (MorphoSys); WO 95/16027 (BioInvent); WO 88/06630; WO 90/3809 (Dyax); US 4704692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO 89/06283; EP 371998; EP 550400; (Хома); EP 229046; PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590689 (Ixsys, в настоящее время, Applied Molecular Evolution (AME); все включены в настоящий документ путем ссылки), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки, как и смежные патенты и заявки), которые способны продуцировать набор человеческих антител, как известно специалистам в данной области и/или описано в настоящем документе. Такие способы включают, без ограничений, рибосомный дисплей (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); технологии продукции антител из одиночной клетки (например, способ получения антител из отобранных лимфоцитов (SLAM) (патент США № 5627052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, г. Кембридж, штат Массачусетс, США; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); отбор В-клеток (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

Кроме того, можно применять и хорошо известные специалистам в данной области способы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу гуманизированное или модифицированное геной инженерией антитело имеет один или более аминокислотных остатков из источника, не относящегося к человеку, например, без ограничений, мыши, крысы, кролика, примата (исключая человека) или других млекопитающих. Эти аминокислотные остатки человеческого происхождения часто называют "импортированными" остатками, поскольку их обычно берут из "импортированных" переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.

Известные последовательности Ig человека описаны во множестве публикаций и веб-сайтов, например:

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/;
www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com/;
www.pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
www.isac-net.org/sites_geo.html;
www.aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
www.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/;
www.abgen.cvm.tamu.edu/lab/;
www.abgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHNP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/frproducts.html;
www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Как известно специалистам в данной области, такие импортированные последовательности можно применять для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, периода полужизни или любой другой приемлемой характеристики. Как правило, сохраняются целиком или частично нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей замещают человеческими или другими аминокислотами. Антитела могут также быть необязательно гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные антитела можно необязательно получать в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с помощью трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известными специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, демонстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. Исследование этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, т.е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из консенсусной и импортированной последовательностей так, чтобы получить требуемую характеристику антитела, такую как повышенную аффинность к целевому (ым) антигену (ам). В целом остатки CDR напрямую и в очень значительной степени влияют на связывание с антигеном. Гуманизацию или конструирование антител настоящего изобретения можно выполнять с помощью любого известного способа, такого как, без ограничений, способ, описанный в: Winter (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534 (1988)), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT: US 98/16280, US 96/18978, US 91/09630, US 91/05939, US 94/01234, GB 89/01334, GB 91/01134, GB 92/01755; WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, EP 229246, причем каждый полностью включен в настоящий документ путем ссылки, включая приведенные в нем ссылки.

Антитело к ФНО можно также необязательно создавать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата (за исключением человека) и т.п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ФНО, можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с использованием приемлемых способов, таких как описанные в настоящем документе.

Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными способами (например, без ограничений, описанными в патентах США №: 5770428, 5569825, 5545806, 5625126, 5625825, 5633425, 5661016 и 5789650, выданных Lonberg et al.; выданных Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710719 A1, Surani et al. патент США № 5545807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438474 B1, Lonberg et al. EP 0814259 A2, Lonberg et al. GB 2272440 A, в Lonberg et al. *Nature* 368:856-859 (1994), Taylor et al., *Int. Immunol.* 6(4): 579-591 (1994), Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20(23): 6287-6295 (1992), Tuaillon et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995) и Fishwald et al., *Nat Biotechnol* 14(7):845-851 (1996), причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем

ссылки). По существу такие мыши имеют по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен или который можно подвергать функциональной перестройке. Эндогенный локус иммуноглобулина у таких мышей можно разрушать или делетировать, чтобы таким образом лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

Скрининг антител на специфичность связывания со сходными белками или фрагментами удобно проводить с использованием библиотек пептидного дисплея. Данный способ включает скрининг больших наборов пептидов для выявления отдельных пептидов, имеющих требуемую функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках пептидных дисплеев хорошо известен специалистам в данной области. Длина отображаемых пептидных последовательностей может составлять от 3 до 5000 или более аминокислот, зачастую длина составляет 5-100 аминокислот и часто длина составляет от около 8 до 25 аминокислот. В дополнение к способам получения пептидных библиотек прямым химическим синтезом, было описано несколько способов с рекомбинантными ДНК. Один из таких способов предусматривает отображение пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278. Другие системы для создания пептидных библиотек имеют аспекты как способов химического синтеза *in vitro*, так и рекомбинантных способов. См. патентные публикации РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5658754; и 5643768. В продаже имеются библиотеки пептидных дисплеев, векторы и наборы для скрининга таких производителей, как Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (гп. Кембриджшир, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, выданные Enzo; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, выданные Duax, 5427908, 5580717, выданные Affymax; 5885793, выданный Cambridge antibody Technologies; 5750373, выданный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, выданные Хома, Colligan, выше; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения можно также получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы и т.п., которые продуцируют такие антитела в своем молоке. Таких животных можно создавать с помощью известных способов. См., например, без ограничений, патенты США № 5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616; 5565362; 5304489 и т.п., каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения можно дополнительно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничений, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или полученных из них клеточных культурах. В качестве не имеющего ограничительного характера примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцируемого промотора. См., например, Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240: 95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Кроме того, трансгенный маис использовали для экспрессии белков млекопитающих на уровне промышленного производства, причем их биологическая активность была эквивалентна активности белков, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Антитела, включая и фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), также продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе из семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) и приведенные в этой публикации ссылки. Таким образом, антитела настоящего изобретения можно также продуцировать с использованием трансгенных растений в соответствии с известными способами. См. также, например, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); и приведенные в этих публикациях ссылки. См. также общую информацию об экспрессии антител в растениях. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения могут связываться с человеческим ФНО в широком интервале аффинностей (K_D). В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно человеческое мАт настоящего изобретения может необязательно связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью. Например, мАт человека может связываться с человеческим ФНО с показателем K_D , равным около 10^{-7} или менее М, например, без ограничений, 0,1-9,9 (или в любом интервале, или с любым значением в нем) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , или в любом интервале, или с любым значением в нем.

Аффинность или авидность антитела для антигена можно определять экспериментально любым приемлемым способом (см., например, Berzofsky, et al., Antibody-Antigen Interactions in Fundamental

Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, NY (1992); а также способами, описанными в настоящем документе). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может изменяться в зависимости от измерения в разных условиях (например, концентрации солей, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена (например, K_D , K_a , K_d) предпочтительно выполнять в стандартизованных растворах антитела и антигена и в стандартизованном буфере, таком как буфер, описанный в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновых кислот. Используя приведенную в настоящем документе информацию, такую как нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70-100% смежных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, их указанные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности, или депонированный вектор, содержащий по меньшей мере одну из этих последовательностей, может быть получена молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующая по меньшей мере одно антитело к ФНО, содержащее все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, 5 и 6, с использованием способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в данной области.

Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут иметь форму РНК, такой как мРНК, гРНК, тРНК или любой другой формы, или форму ДНК, включая, без ограничений, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования, путем синтеза или любых их комбинаций. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной, одноцепочечной или комбинированной. Любая часть по меньшей мере одной цепи ДНК или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как прямая цепь, или не кодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронами, например, без ограничений, по меньшей мере для одного определенного участка по меньшей мере одного CDR, такого как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 1-3) или легкой цепи (например, SEQ ID NO: 4-6); молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность антитела к ФНО или переменной области (например, SEQ ID NO: 7,8); и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от нуклеотидных последовательностей, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ФНО, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Разумеется, генетический код хорошо известен специалистам в данной области. Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание таких вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к ФНО настоящего изобретения. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие ограничительного характера примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения включают SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, соответствующие не имеющим ограничительного характера примерам нуклеиновой кислоты, кодирующей соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, переменную область HC и переменную область LC.

Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ФНО, могут включать, без ограничений, молекулу, отдельно кодирующую аминокислотную последовательность фрагмента антитела; кодирующую последовательность для полноразмерного антитела или его участка; кодирующую последовательность для антитела, фрагмента или участка, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность для по меньшей мере одного сигнального лидерного или слитого пептида при наличии или в отсутствие вышеуказанных дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными не кодирующими последовательностями, включающими, без ограничений, не кодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые участвуют в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, которые обеспечивают дополнительную функциональность. Таким образом, кодирующая антитело последовательность может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, что облегчает очистку слитого антитела, содержащего фрагмент или участок антитела.

Полинуклеотиды, селективно гибридизующиеся с описанным в настоящем документе полинуклеотидом. В настоящем изобретении обеспечены выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации гибридизуются с полинуклеотидом, описанным в настоящем документе. Таким образом, полинуклеотиды настоящего варианта осуществления можно применять для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, содержащих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды настоящего изобретения можно использовать для идентификации,

выделения или амплификации частичных или полноразмерных клонов в депонированной библиотеке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды представляют собой последовательности геномной ДНК или кДНК, выделенные или иным образом комплементарные к кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

Библиотека кДНК предпочтительно содержит по меньшей мере 80% полноразмерных последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 85% или 90% полноразмерных последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% полноразмерных последовательностей. Библиотеки кДНК можно нормализовать для увеличения представительства редких последовательностей. Для последовательностей с низкой или умеренной идентичностью относительно комплементарных последовательностей гибридизацию обычно, но не исключительно осуществляют в условиях низкой или умеренной жесткости. Для последовательностей с большей идентичностью необязательно применяют условия средней и высокой жесткости. Условия низкой жесткости допускают селективную гибридизацию последовательностей с уровнем идентичности около 70%, и их можно применять для идентификации ортологических или паралогических последовательностей.

Необязательно полинуклеотиды настоящего изобретения кодируют по меньшей мере часть антители, кодируемого полинуклеотидами, описанными в настоящем документе. Полинуклеотиды настоящего изобретения охватывают последовательности нуклеотидов, которые можно использовать для селективной гибридизации с полинуклеотидом, кодирующим антитело настоящего изобретения. См., например, Ausubel, выше; Colligan, выше, каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Конструирование нуклеиновых кислот. Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получать с помощью (а) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (с) способов очистки или их комбинаций.

Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду настоящего изобретения. Например, в нуклеиновую кислоту можно встраивать сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида. Кроме того, можно встраивать транслируемые последовательности, чтобы облегчить выделение транслированного полинуклеотида настоящего изобретения. К примеру, удобным средством очистки белков настоящего изобретения служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота настоящего изобретения, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно представлять собой вектор, адаптер или линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или улучшать введение полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, экспрессионных векторов, адаптеров и линкеров хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Рекомбинантные способы конструирования нуклеиновых кислот. Композиции выделенных нуклеиновых кислот настоящего изобретения, таких как РНК, кДНК, геномная ДНК или любая их комбинация, можно получать из биологических источников с помощью любого числа способов клонирования, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для идентификации желательной последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК используют олигонуклеотидные зонды, которые селективно гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами настоящего изобретения. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномных библиотек хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Способы скрининга и выделения нуклеиновых кислот. Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью зонда на основании последовательности полинуклеотида настоящего изобретения, такого как описанные в настоящем документе. Зонды можно использовать для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделять гомологичные гены в тех же самых или разных организмах. Специалистам в данной области должно быть понятно, что для анализа можно использовать различные степени жесткости гибридизации; и что жесткой может быть либо гибридизация, либо среда для отмывки. По мере того как условия гибридизации становятся более жесткими, требуемая для образования дуплекса степень комплементарности между зондом и мишенью возрастает. Жесткость условий можно контролировать одним или более из следующих параметров: температура, ионная сила, pH и присутствие частично денатурирующего растворителя, такого как формамид. Например, жесткость условий гибридизации обычно изменяют путем смены полярности раствора реагентов, например посредством изменения концентрации формамида в интервале от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичности последовательностей), необходимая для детектируемого связывания, варьирует в соответствии с жесткостью среды для гибридизации и/или среды для отмывки. Оптимальная степень комплементарности составляет 100%, или 70-100%, или любой интервал, или значение в нем. Однако следует понимать, что небольшие вариации последовательностей в зондах и праймерах возможно компенсировать путем уменьшения строгости среды гибридизации и/или среды для промывания.

Способы амплификации РНК или ДНК хорошо известны специалистам в данной области и могут применяться в соответствии с настоящим изобретением без лишних экспериментов на основании представленных в настоящем документе инструкций и рекомендаций.

Известные способы амплификации ДНК или РНК включают, без ограничений, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и связанные с ней процессы амплификации (см., например, патенты США № 4683195, 4683202, 4800159, 4965188, выданные Mullis, et al.; 4795699 и 4921794, выданные Tabor, et al; 5142033, выданный Innis; 5,122,464, выданный Wilson, et al.; 5091310, выданный Innis; 5066584, выданный Gyllenstein, et al; 4889818, выданный Gelfand, et al; 4994370, выданный Silver, et al; 4766067, выданный Biswas; 4656134, выданный Ringold), и опосредованную РНК амплификацию, в которой используют в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК антисмысловую РНК к последовательности-мишени (патент США № 5130238, выданный Malek, et al, с торговым названием NASBA), полное содержание всех этих ссылок включено в настоящий документ путем ссылки. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше.)

Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов настоящего изобретения, и связанных с ними генов прямо из библиотек геномной ДНК или кДНК. ПЦР и другие способы амплификации *in vitro* можно также использовать, например, для клонирования последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, которые требуется экспрессировать, чтобы применять зонды нуклеиновых кислот для обнаружения наличия желательной мРНК в пробах, секвенирования нуклеиновых кислот или иных целей. Примеры способов, достаточные для определения специалистам в данной области способов амплификации *in vitro*, можно найти в Berger, выше, Sambrook, выше, и Ausubel, выше, а также в Mullis, et al., патенте США № 4683202 (1987); и Innis, et al., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Имеющиеся в продаже наборы для амплификации геномной последовательности ПЦР известны специалистам в данной области. См., например, набор Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Кроме того, возможно использование, например, белка 32 гена T4 (Boehringer Mannheim) для увеличения выхода реакции при ПЦР длинных фрагментов.

Синтетические способы конструирования нуклеиновых кислот. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно также получать прямым химическим синтезом с помощью известных способов (см., например, Ausubel, et al., выше). Химическим синтезом по существу получают одноцепочечный олигонуклеотид, который можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью либо полимеризации с ДНК-полимеразой и одиночной цепью в качестве матрицы. Специалистам в данной области известно, что химический синтез ДНК может ограничиваться последовательностями длиной в 100 или более оснований, однако можно лигировать короткие последовательности, получая более длинные последовательности.

Рекомбинантные экспрессионные кассеты. В настоящем изобретении дополнительно обеспечены рекомбинантные экспрессионные кассеты, содержащие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения. Последовательность нуклеотидов настоящего изобретения, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело настоящего изобретения, можно использовать для конструирования рекомбинантной экспрессионной кассеты, которую можно вводить в по меньшей мере одну требуемую клетку-хозяина. Рекомбинантная экспрессионная кассета, как правило, содержит полинуклеотид настоящего изобретения, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют транскрипцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот настоящего изобретения можно применять как гетерологичные, так и негетерологичные (т.е. эндогенные) промоторы.

В некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промотора, энхансера или других элементов, можно встраивать в соответствующее положение (выше, ниже или в интроне) негетерологичной формы полинуклеотида настоящего изобретения таким образом, чтобы стимулировать или подавлять экспрессию полинуклеотида настоящего изобретения. Например, эндогенные промоторы можно изменять *in vivo* или *in vitro* путем мутации, делеции и/или замены.

Векторы и клетки-хозяева. Настоящее изобретение также относится к векторам, включающим выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, клеткам-хозяевам, созданным методом геной инженерии с применением рекомбинантных векторов, и к выработке по меньшей мере одного антитела к ФНО с применением хорошо известных специалистам рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., выше; Ausubel, et al., выше; каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. Как правило, плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, его можно упаковывать *in vitro* с помощью приемлемой упаковочной клеточной линии и впоследствии вводить внутрь клеток-хозяев.

Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскриби-

руемой области - сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодированный участок зрелых транскриптов, экспрессируемых конструктами, предпочтительно содержит сайт инициации трансляции в начале, а также терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем для экспрессии в клетках млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничений, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США № 5122464; 5770359; 5827739) для культуры эукариотических клеток и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E.coli* и других бактериях или прокариотах (вышеуказанные патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Пригодные культуральные среды и условия для вышеуказанных клеток-хозяев известны в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструкта в клетку-хозяина можно осуществлять путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных способов. Такие способы описаны в данной области, например, в Sambrook выше, главы 1-4 и 16-18; Ausubel выше, главы 1, 9, 13, 15, 16.

По меньшей мере одно антитело настоящего изобретения можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как гибридный белок, и оно может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, особенно заряженные аминокислоты, для повышения стабильности и персистенции антитела в клетке-хозяине, а также в ходе очистки или в ходе последующих манипуляций и хранения. Кроме того, к антителу настоящего изобретения для упрощения очистки можно добавлять пептидные звенья. Такие области можно удалять перед получением антитела или по меньшей мере одного его фрагмента. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например, Sambrook, упомянутое, главы 17.29-17.42 и 18.1-18.74; Ausubel, упомянутое, главы 16, 17 и 18.

Специалистам в данной области известно множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок настоящего изобретения.

В альтернативном варианте осуществления нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем манипуляции) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области, например, описаны в патентах США № 5580734, 5641670, 5733746 и 5733761, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки.

Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных участков или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используют в виде монослоев клеток, однако можно также использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности клеточные линии COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т.п., например, производства Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США. Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки CHO и клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Особенно предпочтительны клетки-хозяева CHO, P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851).

Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5168062; 5385839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1 alpha (патент США № 5266491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого T-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для продукции нуклеиновых кислот или белков настоящего изобретения используют и другие известные и/или предоставляемые клетки, например, по каталогу "Американская коллекция типовых культур клеточных линий и гибридом", либо из других известных или коммерческих источников.

В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор обычно встраивают последовательности полиаденилирования или терминации транскрипции. Например, в качестве последовательности терминации можно использовать последовательность полиаденилирования из гена бычьего гормона роста. Возможно также добавление последовательностей для точного сплайсинга транскрипта. Приме-

ром последовательности сплайсинга служит интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно добавлять последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине, известные в данной области.

Очистка антитела. Антитело к ФНО может быть извлечено и очищено из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включающими, без ограничений, очистку на белке А, осаждение сульфатом аммония или спиртом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилapatite и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, причем каждая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения включают очищенные естественным путем продукты, продукты химического синтеза и продукты, получаемые при помощи рекомбинантных технологий из эукариотических клеток-хозяев, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в способе рекомбинантной продукции, антитело настоящего изобретения может быть гликозилированным или может быть негликозилированным, причем гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например Sambrook, выше, разделы 17.37-17.42; Ausubel, выше, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, Protein Science, выше, главы 12-14, все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ФНО.

Выделенные антитела настоящего изобретения, содержащие все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, 5 и 6, включают аминокислотные последовательности антител, описанные в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, либо любого выделенного или полученного антитела. Предпочтительно человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим ФНО и таким образом частично или по существу полностью нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности белка. Антитело, или его определенный участок или вариант, которые частично или предпочтительно по существу нейтрализуют по меньшей мере один вид биологической активности по меньшей мере одного белка или фрагмента ФНО, может связывать белок или фрагмент и таким образом ингибировать активности, опосредованные связыванием ФНО с рецептором к ФНО или с другими зависимыми от ФНО или опосредованные им механизмами. В контексте настоящего документа термин "нейтрализующее антитело" относится к антителу, которое может ингибировать зависимость от ФНО активность на около 20-120%, предпочтительно на по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более в зависимости от способа анализа. Способность антитела к ФНО ингибировать зависимость от ФНО активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого способа анализа белка ФНО или его рецептора, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Человеческое антитело изобретения может представлять собой антитело любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т.п.) или изотипа и может содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления человеческое антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела этого типа можно получать с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного не относящегося к человеку млекопитающего, содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA) и IgM (например, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческое антитело к человеческому ФНО содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

При использовании в настоящем документе термины "антитело" или "антитела" относятся к молекулам биоаналогов антител, утвержденным в соответствии с Законом о ценовой конкуренции и инновациях биологических лекарств 2009 г. (закон BPCI) и аналогичными законами и нормативами во всем мире. В соответствии с законом BPCI может быть продемонстрировано, что антитело является биоаналогом, если данные показывают, что оно "очень схоже" с эталонным продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и "ожидается", что оно даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт, с точки зрения безопасности, чистоты и активности (Endocrine Practice: февраль 2018 г., Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). Эти молекулы-биоаналоги антител обеспечивают по сокращенной схеме утверждения, при которой заявитель полагается на клинические данные эталонного продукта изобретателя для получения одобрения регулирующих органов. По сравнению с исходным эталонным изобретенным антителом, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований, молекула-биоаналог антитела в настоящем документе называется "биопрепаратом второго эшелона". Как представлено в настоящем документе, SIMPONI® (голимумаб) представляет собой ори-

гинальное инновационное референтное антитело к ФНО, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований. Голимумаб продается в США с 2009 года.

Примеры последовательностей

В различных вариантах осуществления ингибитор ФНО содержит антитело к ФНО SIMPONI® (голимумаб) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, показанные ниже. Дополнительную информацию об антителе к ФНО SIMPONI® (голимумаб) и других антителах к ФНО см., например, патенты США №: 7250165; 7691378; 7521206; 7815909; 7820169; 8241899; 8603778; 9321836; и 9828424.

Пример последовательностей антитела к ФНО α , например, SIMPONI® (голимумаб).

CDR (комплементарно детерминированная область) тяжелой цепи (HCDR) и CDR легкой цепи (LCDR) подчеркнуты в тяжелой цепи и легкой цепи голимумаба (определяемых по Кабату).

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (HC) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO: 36)

1 QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAE
MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GIAAGGNYYY
YGMDVWGQGT

121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
ALTSGVHTFP

181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD
KTHTCPPCPA

241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL

361 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSKLT

421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 456

Аминокислотная последовательность легкой цепи (LC) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO: 37)

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLIYD
ASNRATGIPA

61 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT
VAAPSVFIFP

121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS
QESVTEQDSK DSTYLSSTL

181 TLSKADYEKH KVVACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO: 38)

1 QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAE
MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GIAAGGNYYY
YGMDVWGQGT

121 TVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи (VL) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO: 39)

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLIYD
ASNRATGIPA

61 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT V

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HCDR1) голимумаба: (SEQ ID NO: 40)

SYAMH

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HCDR2) антитела голимумаб: (SEQ ID NO: 41)

FMSYDGSNKKYADSVKG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) голимумаба: (SEQ ID NO: 42)

DRGIAAGGNYYYYGMDV

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (LCDR1) голимумаба: (SEQ ID NO: 43)

RASQSVYSYLA

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (LCDR2) голимумаба: (SEQ ID NO: 44)

DASNRAT

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (LCDRL) голимумаба: (SEQ ID NO: 45)

QQRSNWPPFT

По меньшей мере одно антитело изобретения связывает по меньшей мере один определенный эпитоп, специфичный к по меньшей мере одному белку ФНО, его субъединице, фрагменту, участку или любой их комбинации. По меньшей мере один эпитоп может содержать по меньшей мере одну область связывания с антителом, которая содержит по меньшей мере один участок указанного белка, причем данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере один внеклеточный, растворимый, гидрофильный, внешний или цитоплазматический участок указанного белка. По меньшей мере один определенный эпитоп может содержать любую комбинацию из по меньшей мере одной последовательности аминокислот, состоящей из по меньшей мере 1-3 аминокислот, и до полного определенного участка из последовательных аминокислот с SEQ ID NO: 9.

По существу человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения содержит антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант по меньшей мере одной вариативной области тяжелой цепи и по меньшей мере одной определяющей комплементарность области человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной вариативной области легкой цепи. В качестве не налагающего ограничения примера антитело или антигенсвязывающий участок или вариант могут содержать по меньшей мере одну CDR3 тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3, и/или CDR3 легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6. В конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одной CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую последовательность аминокислот, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 1, 2 и/или 3). В другом конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий участок или вариант может иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере участок по меньшей мере одной CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 4, 5, и/или 6). В предпочтительном варианте осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента имеют последовательность аминокислот соответствующей CDR по меньшей мере одного из мАт TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV118, TNV32, TNV86, описанных в настоящем документе. Такие антитела можно получать путем химического связывания различных участков (например, CDR, каркасной области) антитела с помощью обычных способов получения и экспрессии молекулы (т.е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью обычных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

Специфичное антитело к ФНО может содержать по меньшей мере одну из вариативных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ФНО содержит по меньшей мере одну вариативную область тяжелой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и/или по меньшей мере одну вариативную область легкой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, причем антитела, которые связываются с ФНО человека и которые содержат определенный вариативный участок тяжелой или легкой цепей, могут быть получены приемлемыми способами, такими как фаговый дисплей (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med., 1(5):863-868 (1998)), или способами, в которых используют трансгенные животные, известными специалистам в данной области и/или описанными в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген, содержащий ДНК локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который может подвергаться функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ФНО или его фрагментом, чтобы индуцировать продукцию антител. При желании можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие immortalized клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитело, определенный участок или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее участка.

Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, цепям иммуноглобулина и областям CDR, содержащим аминокислоты в последовательности, по существу совпадающей с

аминокислотной последовательностью антитела, описанной в настоящем документе. Предпочтительно такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты и антитела, содержащие такие цепи или области CDR, могут связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью (например, с K_D равной около 10^{-9} М или менее). Аминокислотные последовательности, по существу совпадающие с последовательностями, описанными в настоящем документе, включают последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены, а также делеции и/или вставки аминокислот. Консервативной аминокислотной заменой называется замена первой аминокислоты на вторую аминокислоту, физические и/или химические свойства которой (например, заряд, структура, полярность, гидрофобность/гидрофильность) сходны со свойствами первой аминокислоты. Консервативные замены включают замену одной аминокислоты на другую в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H); аспартат (D) и глутамат (E); аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), K, R, H, D и E; аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), триптофан (W), метионин (M), цистеин (C) и глицин (G); F, W и Y; C, S и T.

Коды аминокислот. Аминокислоты, составляющие антитела к ФНО настоящего изобретения, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно обозначать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

ОДНОБУКВЕННЫЙ КОД	ТРЕХБУКВЕННЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
A	Ala	Аланин	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Цистеин	UGC, UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC, GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA, GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC, UUU
G	Gly	Глицин	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Гистидин	CAC, CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Лизин	AAA, AAG
L	Leu	Лейцин	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC, AAU
P	Pro	Пролин	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA, CAG
R	Arg	Аргинин	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Серин	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Треонин	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Валин	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC, UAU

Антитело к ФНО настоящего изобретения может включать одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в настоящем документе.

Несомненно, число аминокислотных замен, которое может произвести квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Вообще говоря, число замен, вставок или делеций аминокислот любого данного антитела к ФНО, фрагмента или варианта будет составлять не более 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, например 1-30, или любой интервал, или значение в нем, как указано в настоящем документе.

Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в антителе к ФНО, которые необходимы для его функции, известными способами, такими как сайт-направленный мутагенез или сканирующий аланином мутагенез (например, Ausubel, см. выше, главы 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций алани-

на в каждом остатке в молекуле. Впоследствии полученные мутантные молекулы испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна активность по нейтрализации ФНО. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа структуры, например путем кристаллизации, ядерного магнитного резонанса или фотоаффинного мечения (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) и de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

Антитела к ФНО могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из от 1 до всех последовательных аминокислот, из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Антитело к ФНО может необязательно дополнительно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70-100% последовательных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 7, 8.

В одном варианте осуществления последовательность аминокислот цепи иммуноглобулина или ее участок (например, варибельная область, CDR) имеет идентичность около 70-100% (например, 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 или любой интервал, или значение в нем) с последовательностью аминокислот соответствующей цепи по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 7, 8. Например, аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи можно сравнивать с последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи можно сравнивать с SEQ ID NO: 7. 70-100% идентичности аминокислот (например, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) предпочтительно определяют с помощью приемлемого компьютерного алгоритма, известного специалистам в данной области.

Примеры последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NO: 7, 8. Антитела настоящего изобретения или их определенные варианты могут содержать любое число остатков смежных аминокислот из антитела настоящего изобретения, причем это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10-100% от числа последовательных остатков в антителе к ФНО. Длина данной подпоследовательности последовательных аминокислот необязательно составляет по меньшей мере около 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 или более аминокислот, или любой интервал, или значение в нем. Кроме того, количество таких подпоследовательностей может представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

Согласно определению специалистов в данной области настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело настоящего изобретения. Биологически активные антитела обладают удельной активностью, составляющей по меньшей мере 20, 30 или 40%, и предпочтительно по меньшей мере 50, 60 или 70%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80, 90 или 95-1000% от активности нативного (несинтетического), эндогенного или родственного ему и известного антитела. Способы качественного и количественного анализа ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны специалистам в данной области.

В другом аспекте изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящем документе, которые модифицируют путем ковалентного присоединения органической функциональной группы. Такая модификация позволяет создавать антитело или антигенсвязывающий фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным периодом полужизни *in vivo* в сыворотке). В качестве органической функциональной группы можно использовать линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от около 800 до около 120000 дальтон и представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG)), углеводный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпирролидон, а группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут содержать одну или более органических функциональных групп, которые имеют прямую или непрямую ковалентную связь с антителом. Каждая органическая функциональная группа, связанная с антителом или с антигенсвязывающим фрагментом изобретения, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин "жирная кислота" охватывает одноосновные и двухосновные карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин "гидрофильная полимерная группа" обозначает органический полимер, обладающий лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворяется в воде, чем в октане. Таким образом, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, включено в изобретение. Гидрофильные полимеры, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т.п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т.п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспаратат и т.п.), оксиды полиалканов (например, полиэти-

леноксид, полипропиленоксид и т.п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело изобретения, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150000 дальтон, как отдельный фрагмент молекулы. Например, PEG₅₀₀₀ и PEG_{20,000}, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей - групп алкила, жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминогруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N,N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.

Жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть насыщенными или могут содержать одну или более ненасыщенных связей. Жирные кислоты, приемлемые для модификации антител изобретения, включают, например, n-додеканоат (C₁₂, лаурат), n-тетрадеканоат (C₁₄, мирилат), n-октадеканоат (C₁₈, стеарат), n-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), n-докозаноат (C₂₂, бегенат), n-триаконтаноат (C₃₀), n-тетрааконтаноат (C₄₀), цис-Δ⁹-октадеканоат (C₁₈, олеат), полностью цис-Δ^{5,8,11,14}-эйкозатетраеноат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т.п. Приемлемые сложные эфиры жирных кислот включают сложные моноэфиры дикарбоновых кислот, содержащие линейную или разветвленную группу низшего алкила. Группа низшего алкила может содержать от одного до около двенадцати, предпочтительно от одного до около шести атомов углерода.

Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью приемлемого способа, например путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин "модифицирующий агент" относится к приемлемой органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, сложному эфиру жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. "Активирующая группа" означает химический фрагмент или функциональную группу, которые при подходящих условиях могут вступать в реакцию со второй химической группой и таким образом образовывать ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила (NHS) и т.п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йодацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т.п. Функциональная группа альдегида может быть связана с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азида может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые способы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через линкерное звено, например двухвалентную группу C₁-C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут быть замещены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- и -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-. Модифицирующие агенты, которые содержат линкерную функциональную группу, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамина (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Защитную группу Вос можно удалять из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с открытием первичного амина, который может быть связан с другим карбоксилатом, как описано выше, или он может вступать в реакцию с малеиновым ангидридом с замыканием полученного продукта в цикл и получением активированного малеимидного производного жирной кислоты (см., например, публикацию Thompson, et al., WO 92/16221, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Модифицированные антитела изобретения можно получать путем реакции человеческого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические функциональные группы могут быть связаны с антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента, например сложного эфира NHS и PEG. Модифицированные человеческие антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно также получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии взаимодействовать с реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела изобретения. Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие органическую функциональную группу, которая связано с определенными участками антитела настоящего изобретения, можно получать с помощью приемлемых способов, таких как обрат-

ный протеолиз (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), а также способов, описанных в Hermonson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Антиидиотипические антитела к композициям антитела к ФНО. Помимо моноклональных или химерных антител к ФНО настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому (анти-Id) антителу, специфичному к таким антителам изобретения. Антитело к Id представляет собой антитело, распознающее уникальные детерминанты, по существу связанные с антигенсвязывающей областью другого антитела. Анти-Id-антитело можно получать путем иммунизации животного того же вида и генетического типа (например, линии мышей), что и источник Id-антитела, антителом или его CDR-содержащей областью. Иммунизированное животное будет распознавать идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела и будет продуцировать анти-Id-антитело. Анти-Id-антитело можно также применять в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело.

Композиции антитела к ФНО. В настоящем изобретении также обеспечена по меньшей мере одна композиция антитела к ФНО, содержащая по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к ФНО, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области, представленных в виде не встречающейся в природе композиции, смеси или формы. Такие композиции представляют собой композиции неприродного происхождения, содержащие по меньшей мере один или два полноразмерных, имеющих С- и/или N-концевую делецию варианта, домена, фрагмента или определенных варианта аминокислотной последовательности антитела к ФНО, выбранной из группы, состоящей из 70-100% последовательных аминокислот с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или определенных их фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антитела к ФНО включают по меньшей мере одну или две полноразмерных последовательности, фрагмента, домена или варианта участков, содержащих по меньшей мере одну CDR или LBP из последовательности антитела к ФНО с 70-100% сходством с последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, или их указанными фрагментами, доменами или вариантами. Предпочтительные композиции дополнительно содержат, например, 40-99% по меньшей мере одной из 70-100% последовательностей с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Процентные доли такой композиции определяют по массе, объему, концентрации, молярности или моляльности в жидких или сухих растворах, смесях, суспензиях, эмульсиях или коллоидах, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Композиции антитела к ФНО настоящего изобретения могут дополнительно содержать по меньшей мере одно приемлемое и эффективное количество композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, вводимое в клетку, ткань, орган, животного или пациента, нуждающегося в такой модуляции, лечении или терапии, и необязательно дополнительно включать по меньшей мере одно средство, выбранное из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их слитых белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного агента, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорины, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, агента против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Не имеющие ограничительного характера примеры таких цитокинов вклю-

чают, без ограничений, любой из от IL-1 до IL-23. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Такие противораковые или противоионфекционные средства могут также включать молекулы токсина, которые ассоциированы, связаны, объединены в один состав или вводятся совместно по меньшей мере с одним антителом настоящего изобретения. Эффект токсина может быть необязательно направлен на селективное уничтожение патологической клетки или ткани. Патологическая клетка может представлять собой раковую клетку или другую клетку. Такие токсины могут представлять собой, без ограничений, очищенный или рекомбинантный токсин или фрагмент токсина, содержащий по меньшей мере один функциональный цитотоксический домен токсина, например, выбранный из по меньшей мере одного из рицина, дифтерийного токсина, токсина яда или бактериального токсина. Термин "токсин" также включает как эндотоксины, так и экзотоксины, продуцируемые любыми естественными, мутантными или рекомбинантными бактериями или вирусами, которые могут вызывать любое патологическое состояние у человека и других млекопитающих, включая токсический шок, который может приводить к летальному исходу. Такие токсины могут включать, без ограничений, энтеротоксигенный термолabileный энтеротоксин (LT) *E.coli*, термостабильный энтеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, энтеротоксины *Aeromonas*, токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1), стафилококковый энтеротоксин A (SEA), B (SEB) или C (SEC), стрептококковые энтеротоксины и т.п. Такие бактерии включают, без ограничений, штаммы видов энтеротоксигенной *E.coli* (ETEC), энтерогеморрагической *E.coli* (например, штаммы серотипа 0157:H7), виды *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), виды *Shigella* (например, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* и *Shigella sonnei*), виды *Salmonella* (например, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), виды *Clostridium* (например, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), виды *Campylobacter* (например, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), виды *Helicobacter*, (например, *Helicobacter pylori*), виды *Aeromonas* (например, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* (например, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*), *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococci*. См., например, публикации Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al, *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack et al, *Science*, 248:705-711 (1990), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Соединения, композиции или комбинации антител к ФНО, применяемые в способе настоящего изобретения, могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых вспомогательных веществ, таких как, без ограничений, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант или т.п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Не имеющие ограничительного характера примеры таких стерильных растворов и способы их получения хорошо известны специалистам в данной области, например, без ограничений, описаны в Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут быть выбраны обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ФНО, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в представленной композиции, включают, без ограничений, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п.; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в комбинации, составляя отдельно или в комбинации 1-99,99% по массе или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (rHA), желатин, казеин и т.п. Типичные компоненты аминокислот/антител, которые могут также выполнять буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

Углеводные эксципиенты, приемлемые для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. Предпочтительными углеводными эксципиентами для приме-

нения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

Композиции антитела к ФНО могут также включать буфер или агент, регулирующий pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; буферы Трис, гидрохлорида трометамин или фосфата. Предпочтительными буферами для применения в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Композиции антитела к ФНО изобретения могут дополнительно включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как ТВИН-20 и ТВИН-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к ФНО, их участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной области, например перечислены в публикациях Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19th ed., Williams & Williams, (1995) и Physician's Desk Reference, 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Предпочтительными материалами-носителями или эксципиентами являются углеводы (например, сахараиды и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты.

Составы. Как указано выше, в изобретении обеспечены стабильные составы, которые предпочтительно представляют собой фосфатный буфер с физиологическим раствором или выбранной солью, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также консервированные составы для многократного применения, пригодные для фармацевтического или ветеринарного применения, содержащие по меньшей мере одно антитело к ФНО в фармацевтически приемлемом составе. Консервированные составы содержат по меньшей мере один консервант, известный или необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Как известно специалистам в данной области, можно использовать любую приемлемую концентрацию или смесь, такую как 0,001-5%, или любой интервал, или значение в нем, например, без ограничений, 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, или любой интервал, или значение в нем. Не имеющие ограничительного характера примеры включают отсутствие консервантов, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005, 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабена (ов) (например, 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%) и т.п.

Как отмечено выше, в изобретении обеспечено промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного специфического антитела к ФНО с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с указанием, что такой раствор можно хранить в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 ч или дольше. Изобретение дополнительно содержит промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное по меньшей мере одно антитело к ФНО, и второй флакон, содержащий водный разбавитель, состоящий из предписанного буфера или консерванта, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с инструкцией для пациента о том, как разводить по меньшей мере антитело к ФНО в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода в двадцать четыре часа или дольше.

По меньшей мере одно антитело к ФНО, применяемое в соответствии с настоящим изобретением, можно продуцировать рекомбинантными способами, в том числе из клетки млекопитающего или трансгенных препаратов, либо его можно очищать из других биологических источников, как описано в настоящем документе или как известно специалистам в данной области.

Диапазон количества по меньшей мере одного антитела к ФНО в продукте настоящего изобретения включает количества, которые после разведения (при использовании влажной/сухой системы) достигают концентраций от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, хотя меньшие и большие концентрации приемлемы и зависят от предполагаемой несущей среды для введения, например, составы раствора различаются для способов с трансдермальным пластырем, введением через легкие, через слизистые оболочки, или

осмотическим способом, или с помощью микродозатора.

Дополнительно водный разбавитель предпочтительно необязательно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Предпочтительные консерванты включают выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия или их смесей. Концентрации консерванта, применяемой в составе, должно быть достаточно для обеспечения противомикробного действия. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта, и квалифицированный специалист в данной области без труда определяет ее.

Предпочтительно в разбавитель можно необязательно добавлять другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используют в известных концентрациях. Для улучшения контроля pH предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от около pH 5 до около pH 9 и наиболее предпочтительно от около pH 6,0 до около pH 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

Для уменьшения агрегации в составы или композиции можно необязательно добавлять другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, например твин-20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат), твин-40 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонопальмитат), твин-80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), Pluronic F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полосамер 184 или 188, полиолы Pluronic®, другие блок-сополимеры, и хелатирующие вещества, такие как ЭДТА и ЭГТА. Эти добавки, в частности, используют, если для введения состава применяют насос или пластиковый контейнер. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

Составы настоящего изобретения можно получать способом, включающим смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и консерванта, выбранного из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и консерванта в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, для получения приемлемого состава соединяют отмеренное количество по меньшей мере одного антитела к ФНО в буферном растворе с необходимым консервантом в буферном растворе в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двойных флаконов, в том числе флакона с лиофилизированным по меньшей мере одним антителом к ФНО, которое разводят содержащимися во втором флаконе водой, консервантом и/или эксципиентами, предпочтительно фосфатным буфером и/или физиологическим раствором и выбранной солью, в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Настоящие заявленные промышленные изделия используют в течение периода от немедленного введения до двадцати четырех часов или дольше. Соответственно, заявленные в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значимые преимущества для пациентов. Составы изобретения можно необязательно безопасно хранить при температурах от около 2 до около 40°C и сохранять биологическую активность белка в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке может быть этикетка с указанием, что раствор можно хранить и/или использовать в течение периода 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 или 96 ч или более. При использовании разбавителя с консервантом на такой этикетке может быть указан срок годности до 1-12 месяцев, полугодия, полутора и/или двух лет.

Растворы по меньшей мере одного антитела к ФНО по изобретению можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью обычных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и необязательно консерванта или буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, в том числе флакона по меньшей мере с одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон по меньшей мере с одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. В этом случае объем прозрачного раствора может составлять до одного литра или даже больший объем, тем самым обеспечивая большой сосуд, из которого в аптеке или клинике можно дозировать малыми порциями раствор по меньшей мере одного антитела, однократно или многократно, для переливания во флаконы меньшего размера и предоставления покупателям и/или пациентам.

Известные устройства, содержащие такие системы с одним флаконом, включают в себя устройства - шприц-ручки для доставки раствора, такие как B-D® (инжекторное устройство - шприц-ручка), NOVOPEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка), AUTOPEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка), OPTIPEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка), GENOTROPIN PEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка), HUMATROPEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка), BIOJECTOR® (инжекторное устройство - шприц-ручка), Reco-Pen, Humaject, J-tip Needle-Free Injector, Intraject, Medi-Ject, например, произведенные или разработанные компаниями: Becton Dickenson (Франклин Лейкс, Нью-Джерси, www.bectondickenson.com), Disetronic (Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com; Bioject, г. Портланд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, www.mediject.com). К известным устройствам, содержащим двухфлаконные системы, относятся, в частности, шприцы-ручки для разбавления лиофилизированного ЛС в картридже для введения разбавленного раствора, например HUMATROPEN® (инжекторное устройство - шприц-ручка).

Изделия, заявленные в настоящем документе, могут включать упаковочный материал. В дополнение к информации по требованию контролирующих органов, на упаковочном материале также указывают условия, при которых можно использовать продукт. Упаковочный материал настоящего изобретения предусматривает инструкции для пациента по разведению по меньшей мере одного антитела к ФНО в водном разбавителе с получением раствора и по использованию раствора в течение периода 2-24 ч или дольше в случае двух флаконов - влажного/сухого, с продуктом. Для одного флакона с продуктом в виде раствора, на упаковке указывают, что такой раствор можно использовать в течение периода 2-24 ч или дольше. Заявленные в настоящем документе продукты предназначены для использования человеком в фармацевтических целях.

Составы настоящего изобретения можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание по меньшей мере одного антитела и буфера в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый состав, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют с требуемым буферным агентом в воде в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, в том числе флакона по меньшей мере с одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимся во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

По меньшей мере одно антитело к ФНО в стабильных или консервированных составах или растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая подкожную или внутримышечную инъекцию; трансдермальное введение, введение в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной области, как хорошо известно в данной области.

Терапевтические варианты применения. В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с ФНО заболевания в клетке, ткани, органе,

организме животного или пациента, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе, с использованием по меньшей мере одного двойного антитела к интегрину настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с ФНО, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из ожирения, иммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного заболевания, злокачественного заболевания или неврологического заболевания.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с иммунной системой заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системными проявлениями, анкилозирующий спондилит, язва желудка, серонегативные артропатии, остеоартрит, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, иридоциклит/увеит/неврит зрительного нерва, идиопатический легочный фиброз, системный васкулит/гранулематоз Вегенера, саркоидоз, орхит/обратные процедуры вазэктомии, аллергические/атопические заболевания, астма, аллергический ринит, экзема, аллергический контактный дерматит, аллергический конъюнктивит, пневмонит с гиперчувствительностью, трансплантация, отторжение трансплантатов органов, болезнь "трансплантат против хозяина", синдром системной воспалительной реакции, синдром сепсиса, грам-положительный сепсис, грам-отрицательный сепсис, сепсис с отрицательными результатами посева, грибковый сепсис, нейтропеническая лихорадка, уросепсис, менингококкемия, травма/кровотечение, ожоги, воздействие ионизирующего облучения, острый панкреатит, синдром респираторного дистресса взрослых, алкогольный гепатит, хронические воспалительные патологические состояния, саркоидоз, болезнь Крона, серповидно-клеточная анемия, диабет, нефроз, atopические заболевания, реакции гиперчувствительности, аллергический ринит, сенная лихорадка, длительный ринит, конъюнктивит, эндометриоз, астма, крапивница, системная анафилаксия, дерматит, злокачественная анемия, гемолитическое заболевание, тромбоцитопения, отторжение трансплантата любого органа или ткани, отторжение трансплантата почки, отторжение трансплантата сердца, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата поджелудочной железы, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата костного мозга (ТКМ), отторжение аллотрансплантата кожи, отторжение трансплантата хряща, отторжение трансплантата кости, отторжение трансплантата тонкой кишки, отторжение имплантата тимуса плода, отторжение трансплантата парашитовидной железы, отторжение ксенотрансплантата любого органа или ткани, отторжение аллотрансплантата, реакции гиперчувствительности антирецепторов, болезнь Грейвса, болезнь Рейно, инсулинорезистентный сахарный диабет типа В, астма, злокачественная миастения, опосредованная антителом цитотоксичность, реакции гиперчувствительности типа III, системная красная волчанка, синдром POEMS (синдром полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммапатии, изменения кожи), полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия, синдром изменения кожи, антифосфолипидный синдром, пузырчатка, склеродермия, смешанное заболевание соединительной ткани, идиопатическая болезнь Аддисона, сахарный диабет, хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз, витилиго, васкулит, синдром кардиотомии после ИМ, гиперчувствительность типа IV, контактный дерматит, пневмонит с гиперчувствительностью, отторжение аллотрансплантата, гранулемы, вызванные внутриклеточными организмами, чувствительность к лекарственному средству метаболическая/идиопатическая, болезнь Вильсона, гемахроматоз, дефицит альфа-1-антитрипсина, диабетическая ретинопатия, тиреоидит Хасимото, остеопороз, первичный билиарный цирроз, тиреоидит, энцефаломиелит, кахексия, муковисцидоз, хроническое заболевание легких у новорожденных, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, дерматологические состояния, псориаз, алопеция, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острая почечная недостаточность, гемодиализ, уремия, токсичность, преэклампсия, терапия ОКТЗ, терапия антителом к CD3, терапия цитокинами, химиотерапия, лучевая терапия (например, включая, без ограничений, астению, анемию, кахексию и т.п.), хроническая интоксикация салицилатами и т.п. См., например, Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного сердечно-сосудистого заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: синдром оглушенного миокарда, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, инсульт, ишемический инсульт, кровоизлияние, артериосклероз, атеросклероз, рестеноз, диабетическое артериосклеротическое заболевание, гипертензия, артериальную гипертензия, реноваскулярная гипертензия, обморок, шок, сифилис сердечно-сосудистой системы, сердечная недостаточность, легочное сердце, первичная легочная гипертензия, сердечные аритмии, предсердная эктопическая активность, трепетание предсердий, фибрилляция предсердий (устойчивая или пароксизмальная), постперфузионный синдром, воспалительный ответ на искусст-

венное кровообращение, хаотическая или многоочаговая тахикардия предсердий, регулярная тахикардия с узкими комплексами QRS, специфические аритмии, мерцание желудочков, аритмии пучка Гиса, атрио-вентрикулярная блокада, блокада ножки пучка Гиса, ишемические заболевания миокарда, ишемическая болезнь коронарных артерий, стенокардия, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, дилатационная застойная кардиомиопатия, рестриктивная кардиомиопатия, заболевания клапанов сердца, эндокардит, болезнь перикарда, опухоли сердца, аневризмы аорты и периферических сосудов, расслоение аорты, воспаление аорты, окклюзия брюшной аорты и ее ветвей, болезни периферических сосудов, окклюзионные артериальные расстройства, атеросклеротические заболевания периферических сосудов, облитерирующий тромбоангиит, функциональные расстройства периферических артерий, явление и болезнь Рейно, акроцианоз, эритромелалгия, заболевания вен, венозный тромбоз, варикозные вены, артериовенозная фистула, лимфедема, липедема, неустойчивая стенокардия, реперфузионное повреждение, постгемодиализный синдром, ишемическо-реперфузионное повреждение и т.п. Такой способ может необязательно содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии.

Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного инфекционного заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих заболеваний: острая или хроническая бактериальная инфекция, острые и хронические паразитарные или инфекционные процессы, включая бактериальные, вирусные и грибковые инфекции, ВИЧ-инфекцию/ВИЧ-нейропатию, менингит, гепатит (А, В или С или т.п.), септический артрит, перитонит, пневмония, эпиглоттит, *e.coli* 0157:h7, гемолитический уремический синдром/тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, малярия, геморрагическая лихорадка денге, лейшманиоз, проказа, синдром токсического шока, стрептококковый миозит, газовая гангрена, микобактериальный туберкулез, внутриклеточные инфекции *Mycobacterium avium*, пневмония, вызванная *Pneumocystis carinii*, воспалительное заболевание тазовых органов, орхит/эпидидимит, легионелла, болезнь Лайма, грипп А, вирус Эпштейна-Барр, вирус-ассоциированный гемафагоцитарный синдром, вирусный энцефалит/асептический менингит и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, помимо прочего, по меньшей мере одно из следующего: лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), В-клеточный, Т-клеточный или FAB-ОЛЛ, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), лимфома, болезнь Ходжкина, злокачественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, множественная миелома, саркома Капоши, колоректальная карцинома, карцинома поджелудочной железы, карцинома носоглотки, злокачественный гистiocитоз, паранеопластический синдром/гиперкальциемия злокачественной опухоли, солидные опухоли, аденокарциномы, саркомы, злокачественная меланома, гемангиома, метастатическое заболевание, связанная с раком резорбция костной ткани, связанная с раком боль в костной ткани и т.п.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного неврологического заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из: нейродегенеративных заболеваний, рассеянного склероза, мигрени, комплекса СПИД-деменции, демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз и острый поперечный миелит; экстрапирамидальные и мозжечковые расстройства, такие как поражения кортикоспинальной системы; расстройства базальных ганглиальных или мозжечковые расстройства; гиперкинетические двигательные расстройства, такие как хорея Хантингтона и старческая хорея; расстройства движений, вызванных лекарственными средствами, такие как расстройства, индуцированные лекарственными средствами, блокирующими рецепторы дофамина в ЦНС; гипокинетические двигательные расстройства, такие как болезнь Паркинсона; прогрессирующий супрануклеарный парез взора; структурные поражения мозжечка; спинально-мозжечковые дегенерации, такие как спинальная атаксия, атаксия Фридерейха, дегенерация в коре мозжечка, мультисистемные дегенерации (Менсела, Дежерина-Томаса, Ши-Дрегера и Мачадо-Джозефа); системные расстройства (болезнь Рефсума, абеталипопротеинемия, атаксия, телеангиэктазия и митохондриальное мультисистемное расстройство); основные демиелинизирующие расстройства, такие как рассеянный склероз, острый поперечный миелит; и расстройства мотонейронов, такие как нейрогенные мышечные атрофии (дегенерация клеток переднего рога, например амиотрофический боковой склероз, детская спинальная мышечная атрофия и юношеская спинальная мышечная атрофия); болезнь Альцгеймера; синдром Дауна в среднем возрасте; диффузная болезнь с тельцами Леви; старческая деменция с тельцами Леви; синдром Вернике-Корсакова; хронический алкоголизм; болезнь Крейтцфельда-Якоба; подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Галлервордена - Шпатца; и деменция боксеров, и т.п. Такой способ может необязательно включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, или определенную часть или вариант, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. См., например, публикацию Merck Man-

ual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

Любой способ настоящего изобретения может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориазного лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорины, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

К антагонистам ФНО, приемлемым для композиций, комбинированной терапии, совместного введения, устройств и/или способов настоящего изобретения (дополнительно содержащим по меньшей мере одно антитело, его указанную часть и вариант настоящего изобретения), относятся, без ограничений, антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты и молекулы рецепторов, которые специфически связываются с ФНО; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют синтез ФНО, высвобождение ФНО или его действие на клетки-мишени, например талидомид, тенидап, ингибиторы фосфодиэстеразы (например, пентоксифиллин и ролипрам), агонисты аденозиновых рецепторов A2b и усилители аденозиновых рецепторов A2b; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют сигнализацию ФНО-рецептора, такие как ингибиторы митоген-активируемых киназ (MAP); соединения, которые блокируют и/или ингибируют расщепление мембранного ФНО, такие как ингибиторы металлопротеиназы; соединения, которые блокируют и/или ингибируют активность ФНО, такие как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ACE) (например, каптоприл); и соединения, которые блокируют и/или ингибируют продукцию ФНО и/или синтез ФНО, такие как ингибиторы MAP-киназ.

В настоящем документе "антитело к фактору некроза опухоли", "антитело к ФНО", "антитело к ФНО α " или его фрагмент и т.п. уменьшает, блокирует, ингибирует, уничтожает или нарушает активность ФНО α в условиях *in vitro*, *in situ* и/или предпочтительно *in vivo*. Например, приемлемое человеческое антитело к ФНО настоящего изобретения может связываться с ФНО α и включает антитело к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты, а также их определенные мутанты или домены, которые специфически связываются с ФНО α . Приемлемое антитело к ФНО или его фрагмент также могут уменьшать, блокировать, устранять, не допускать, предотвращать и/или ингибировать синтез РНК, ДНК или белка ФНО, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО.

Химерное антитело сA2 состоит из антигенсвязывающей переменной области высокоаффинного

нейтрализующего мышинового антитела типа IgG1 к человеческому ФНО α , обозначенного как A2, и константных областей человеческого IgG1, каппа-иммуноглобулина. Область Fc человеческого IgG1 улучшает эффекторную функцию аллогенного антитела, увеличивает его период полужизни в сыворотке и уменьшает иммуногенность антитела. Авидность и эпитопная специфичность химерного антитела cA2 обусловлены вариабельной областью мышинового антитела A2. В конкретном варианте осуществления предпочтительным источником нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельную область мышинового антитела A2, является гибридная клеточная линия A2.

Химерное антитело A2 (cA2) дозозависимым образом нейтрализует цитотоксический эффект как природного, так и рекомбинантного человеческого ФНО α . С помощью анализов связывания химерного антитела cA2 и рекомбинантного человеческого ФНО α было рассчитано, что константа аффинности химерного антитела cA2 составляет $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Предпочтительные способы определения специфичности и аффинности моноклональных антител посредством конкурентного ингибирования можно найти в публикациях Harlow, et al., *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al., *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); и Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В конкретном варианте осуществления мышинное моноклональное антитело A2 продуцируется клеточной линией, обозначенной как c134A. Химерное антитело cA2 продуцируется клеточной линией, обозначенной c168A.

Дополнительные примеры моноклональных антител к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны в данной области (см., например, патент США № 5231024; Möller, A. et al., *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); заявку на патент США № 07/943852 (подана 11 сентября 1992 г.); Rathjen et al., Международную публикацию № WO 91/02078 (опубликована 21 февраля 1991 г.); Rubin et al., патентную публикацию EPO № 0218868 (опубликована 22 апреля 1987 г.); Yone et al., патентную публикацию EPO № 0288088 (26 октября 1988 г.); Liang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager, et al., *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly et al., *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, et al., *Hybridoma* 6:489-507 (1987); and Hirai, et al., *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Молекулы рецептора ФНО. Предпочтительными молекулами рецептора ФНО, используемыми в настоящем изобретении, являются молекулы, которые связываются с ФНО α с высокой аффинностью (см. например, Feldmann et al., международная патентная публикация WO 92/07076 (опубликована 30 апреля 1992 г.); Schall et al., *Cell* 61:361-370 (1990); и Loetscher et al., *Cell* 61:351-359 (1990), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) и необязательно обладают низкой иммуногенностью. В частности, в настоящем изобретении используют находящиеся на клеточной поверхности рецепторы к ФНО массой 55 кДа (p55 ФНО-R) и массой 75 кДа (p75 ФНО-R). Усеченные формы этих рецепторов, содержащие внеклеточные домены (ECD) рецепторов или их функциональные участки (см. например, Corcoran et al., *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), также используют в настоящем изобретении. Усеченные формы рецепторов к ФНО, содержащие ECD, обнаруживают в моче и сыворотке в виде ингибирующих связывающих ФНО α белков массой 30 кДа и 40 кДа (Engelmann, H. et al., *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Мультимерные молекулы рецептора к ФНО, гибридные молекулы иммунорецепторов к ФНО и их производные, фрагменты или участки представляют собой дополнительные примеры молекул рецептора к ФНО, используемых в способах и композициях настоящего изобретения. Молекулы рецептора к ФНО, которые можно использовать в изобретении, характеризуются своей способностью обеспечивать лечение пациентов в течение длительных периодов с хорошим или отличным облегчением симптомов и низкой токсичностью. Низкая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие неидентифицированные свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов.

Мультимерные молекулы рецепторов к ФНО, используемые в настоящем изобретении, содержат ECD целиком, или функциональный участок ECD двух или более рецепторов к ФНО, связанных посредством одного или более полипептидных линкеров или других непептидных линкеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Мультимерные молекулы могут дополнительно содержать сигнальный пептид секретируемого белка для управления экспрессией мультимерной молекулы. Эти мультимерные молекулы и способы их получения описаны в заявке на патент США № 08/437533 (поданной 9 мая 1995 г.), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО, используемые в способах и композициях настоящего изобретения, содержат по меньшей мере одну часть одной или более молекул иммуноглобулина и целую молекулу или функциональный участок одного или более рецепторов к ФНО. Эти гибридные иммунорецепторные молекулы могут быть собраны в виде мономеров или гетеро-или гомомультимеров. Гибридные иммунорецепторные молекулы могут также быть одновалентными или мультивалентными. Примером такой гибридной иммунорецепторной молекулы к ФНО является гибридный белок рецептор

ФНО/IgG. Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО и способы их получения описаны в данной области (Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler et al., Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker et al., Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler et al., патента США № 5447851; и заявке на патент США № 08/442133 (поданной 16 мая 1995 года), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Способы получения гибридных иммунорецепторных молекул можно также найти в публикациях Caron et al., патент США № 5116964; Caron et al., патент США № 5225538; и Caron et al., Nature 337:525-531 (1989), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Функциональный эквивалент, производное, фрагмент или область молекулы рецептора к ФНО относится к участку молекулы рецептора к ФНО или к участку последовательности молекулы рецептора к ФНО, которая кодирует молекулу рецептора к ФНО, и имеет достаточный размер и последовательность для функционального сходства с молекулами рецептора к ФНО, которые могут быть использованы в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО также включает модифицированные молекулы рецептора к ФНО, функционально сходные с молекулами рецептора к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Например, функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО может содержать "молчащий" кодон или одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений (например, замена одной кислой аминокислоты на другую кислотную аминокислоту; или замену одного кодона, кодирующего ту же или другую гидрофобную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий гидрофобную аминокислоту). См. публикацию Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000).

Термин "цитокины" включают любой известный цитокин. См., например, CopewithCytokines.com. Термин "антагонисты цитокинов" включают, без ограничений, любое антитело, фрагмент или миметик, любой растворимый рецептор, фрагмент или миметик, любой низкомолекулярный антагонист или любую их комбинацию.

Терапевтические способы лечения. Любой способ настоящего изобретения может включать способ лечения обусловленного ФНО заболевания, включающий введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного по меньшей мере из одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорины, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антимаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина.

Термин "безопасность" в отношении композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО настоящего изобретения (например, антитела к ФНО голимумаба) относится к благоприятному соотношению риск:польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью неблагоприятных явлений (НЯ) и серьезных неблагоприятных явлений (СНЯ) по сравнению со стандартным лекарственным препаратом или другим препаратом сравнения, отличным от агентов-антител к ФНО. Неблагоприятное явление - это неблагоприятное медицинское событие у пациента, которому ввели лекарственный препарат. В частности, "безопасность" в отношении композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО в соответствии с настоящим изобретением относится к приемлемой частоте и/или приемлемой степени тяжести неблагоприятных явлений, включая, например, реакции на инфузии, аномалии гепатобилиарных лабораторных показателей, инфекции, включая туберкулез, и злокачественные опухоли.

В настоящем документе термины "эффективность" и "эффективный" в контексте композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа относятся к эффективности конкретной композиции, дозы, введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО настоящего изобретения (например, антитела к ФНО голимумаба). Эффективность можно измерять на основании изменений течения заболевания в ответ на введение агента настоящего изобретения. Например, антитело к ФНО настоящего изобретения (например, устекинумаб) вводят пациенту в количестве и в течение времени, которых достаточно для индуцирования улучшения, предпочтительно стойкого улучшения, в отношении по меньшей мере одного показателя, который отражает тяжесть расстройства, подвергаемого лечению. Для определения, достаточно ли количества и времени лечения, оценивают различные показатели, отражающие степень патологии, заболевания или состояния субъекта. Такие показатели включают, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомов или проявлений рассматриваемого расстройства. Степень улучшения по существу определяется врачом или другим лицом, имеющим должную квалификацию, который может сделать это на основании признаков, симптомов, биопсий или других результатов анализов, указывающих на облегчение клинических симптомов или любую другую меру активности заболевания. Например, антитело к ФНО настоящего изобретения можно вводить для улучшения у субъекта состояния, связанного с псориатическим артритом (PsA). Улучшение состояния пациента, относящегося к PsA, можно оценить с использованием одного или более критериев, включая, например, показатель инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья (HAQ-DI), оценку энтезита, оценку дактилита, общий показатель физического здоровья по краткому опроснику для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36 PCS) и/или общий показатель психического компонента по краткому опроснику для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36 MCS). HAQ-DI - инструмент с 20 вопросами, который оценивает степень сложности выполнения человеком задач в 8 функциональных областях (одевание, вставание, прием пищи, ходьба, гигиенические процедуры, дотягивание, хватание и повседневная деятельность). Энтезит можно оценить путем анализа наличия или отсутствия боли путем локального приложения давления к энтезисам, включая, например, левый и правый боковой локтевой надмыщелок, левый и правый медиальные мыщелки бедренной кости, а также место прикрепления левого и правого ахилловых сухожилий. Дактилит можно оценить на наличие и тяжесть в обеих руках и обеих ногах. SF-36 представляет собой опросник, состоящий из 8 многоэлементных шкал с подсчетом баллов, а SF-36 PCS и SF-36 MCS представляют собой общие оценки, полученные из SF-36, которые позволяют сравнивать относительное бремя различных заболеваний и относительную пользу различных типов лечения.

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин "клинически доказанный" (используемый независимо или для модификации терминов "безопасный" и/или "эффективный", например, клинически доказанный безопасный и/или клинически доказанный эффективный) означает, что доказательство было получено в клиническом исследовании, причем клиническое исследование соответствовало стандартам Управления по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов США, Европейского агентства лекарственных средств (EMA) или соответствующего национального регулирующего органа. Например, клиническое исследование может представлять собой рандомизированное двойное слепое исследование соответствующего объема, применяемое для клинического подтверждения эффектов лекарственного средства.

Как правило, лечение патологических состояний осуществляют путем введения безопасного и эффективного количества или дозы по меньшей мере одной композиции антитела к ФНО, которая суммарно в среднем содержит от по меньшей мере около 0,01 до 500 мг по меньшей мере одного антитела к ФНО на килограмм массы тела пациента на дозу, а предпочтительно от по меньшей мере около 0,1 до 100 мг антитела на килограмм массы тела пациента за одно или множество введений, в зависимости от конкретной активности, присущей композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1-5000 мкг/мл сыворотки за одно или множество введений. Приемлемые дозы известны медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического количества может потребоваться выполнение повторного введения, т.е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, причем отдельные введения повторяют до достижения требуемой суточной

ной дозы или эффекта.

Предпочтительные дозы могут необязательно включать 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 и/или 100-500 мг/кг за введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона, либо количество для достижения в сыворотке концентрации 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, 12, 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 и/или 5000 мкг/мл сыворотки за однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона.

В альтернативном варианте осуществления вводимые дозы могут варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного агента, режим и способ его введения; возраст, состояние здоровья и масса реципиента; природа и степень выраженности симптомов, тип сопутствующего лечения, частота введения и требуемый эффект. Обычно доза активного ингредиента составляет от около 0,1 до 100 мг на килограмм массы тела. Как правило, доза от 0,1 до 50 и предпочтительно от 0,1 до 10 мг на килограмм за одно введение или в лекарственной форме с замедленным высвобождением будет эффективной для достижения требуемых результатов.

В качестве не налагающего ограничения примера, лечение людей или животных можно проводить в виде однократного или периодического введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения в дозе от 0,1 до 100 мг/кг, например 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 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из суток 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 или 40, либо в альтернативном или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере на одной из недель 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 или 52, либо в альтернативном или дополнительном варианте осуществления в по меньшей мере один год из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, либо в любой их комбинации с введением однократной, инфузионной или повторных доз.

Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, обычно содержат от около 0,1 мг до около 500 мг активного ингредиента на единицу или контейнер. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве около 0,5-99,999 мас.% в расчете на общую массу композиции.

Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1-10%. Кроме того, можно применять липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми способами.

Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.

Альтернативные способы введения. В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств по меньшей мере одного антитела к ФНО настоящего изобретения можно применять множество известных и разработанных способов введения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты.

Антитела к ФНО настоящего изобретения можно доставлять в носителе в виде раствора, эмульсии, коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из множества устройств и способов, приемлемых для введения путем ингаляции или другими способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

Парентеральные составы и введение. Составы для парентерального введения могут в качестве обычных эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т.п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций можно использовать нетоксичный, пригодный для неперорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, или стерильный раствор для инъекций, или суспензию в растворителе. В качестве пригодной несущей среды или растворителя допустимо использовать воду, раствор Рингера, изотонический

раствор и т.п.; в качестве обычного растворителя или суспендирующего растворителя можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этого можно использовать нелетучее масло и жирную кислоту любого вида, включая природные или синтетические либо полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические либо полусинтетические моно-, ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничений, общепринятые средства инъекции, пневматическое безыгольное инъекционное устройство, описанное в патенте США № 5851198, и лазерный перфоратор, описанный в патенте США № 5839446, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Альтернативные способы доставки. Изобретение дополнительно относится к введению по меньшей мере одного антитела к ФНО путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшинного, интракапсулярного, внутрихрящевого, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интра ректального, интра ренального, интра ретинального, интра спинального, интра синовиального, внутри грудного, внутриматочного, внутрипузырного, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию по меньшей мере одного антитела к ФНО можно готовить для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для применения вагинальным или ректальным способом введения, в частности, в мягких формах, таких как, без ограничений, кремы и суппозитории; для трансбуккального или подъязычного введения, например, без ограничений, в форме таблеток или капсул; или для интраназального введения, например, без ограничений, в форме порошков, капель в нос или аэрозолей, либо в виде определенных агентов; или для введения трансдермально, например, без ограничений, в виде систем доставки в геле, мази, лосьоне, суспензии или пластыре с химическими ускорителями, такими как диметилсульфоксид, либо для модификации структуры кожи, либо для повышения концентрации лекарственного средства в трансдермальном пластыре (Junginger, et al. Drug Permeation Enhancement; Hsieh, D.S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки), или с окислителями, которые облегчают нанесение составов, содержащих белки и пептиды, на кожу (WO 98/53847), или с применением электрического поля для создания временных траекторий доставки, например, путем электропорации, или для ускорения движения заряженных лекарственных средств через кожу, например, путем ионофореза, или применения ультразвука, например сонофореза (патенты США № 4309989 и 4767402) (приведенные выше публикации и патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

Легочное/назальное введение. При введении через легкие предпочтительно по меньшей мере одну композицию антитела к ФНО доставляют в виде частиц, размер которых эффективно достигает нижних дыхательных путей легких или пазух. В соответствии с изобретением по меньшей мере одно антитело к ФНО может быть доставлено с помощью любого из множества ингаляционных или назальных устройств, известных специалистам и предназначенных для введения терапевтического агента ингаляцией. Такие устройства, предназначенные для нанесения аэрозольных препаратов в полость пазухи или альвеол пациента, включают ингаляторы отмеренных доз, небулайзеры, генераторы сухого порошка, распылители и т.п. В данной области также известны другие устройства, приемлемые для направленного легочного или назального введения антител. Во всех таких устройствах можно использовать составы, приемлемые для введения антитела в виде аэрозоля. Такие аэрозоли могут содержать либо раствор (как водный, так и неводный), либо твердые частицы. В ингаляторах отмеренных доз, таких как VENTOLIN® (ингалятор отмеренных доз), обычно используют газ-пропеллент, и во время вдоха требуется активация устройства (см. например, WO 94/16970, WO 98/35888). В порошковых ингаляторах, таких как Turbuhaler (Astra), Rotahaler (Glaxo), DISKUS® (ингалятор) (Glaxo), SPIROS® (ингалятор) (Dura), устройства, продаваемые компанией Inhale Therapeutics и порошковые ингаляторы Spinhaler (Fisons), используют активацию смешанного порошка под действием дыхания (публикации US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Небулайзеры, такие как AERX® (небулайзер) Aradigm, ULTRAVENT® (небулайзер) (Mallinckrodt) и небулайзер Acorn II (Marquest Medical Products) (публикации US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), причем публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки, позволяют получать аэрозоли из растворов, тогда как ингаляторы отмеренных доз, ингаляторы сухого порошка и т.п. образуют аэрозоли из мелких частиц. Эти конкретные примеры доступных в продаже ингаляционных устройств предназначены для иллюстрации конкретных устройств, приемлемых для практического применения в настоящем изобретении, и не предназначены для ограничения объема изобретения. Предпочтительно доставлять композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело к ФНО, с помощью ингалятора сухого порошка или распылителя. Ингаляционное устройство для введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения имеет несколько желатель-

ных признаков. Например, преимуществом является надежность, воспроизводимость и точность доставки ингаляционным устройством. Ингаляционное устройство может необязательно доставлять небольшие сухие частицы, например менее приблизительно 10 мкм, предпочтительно приблизительно 1-5 мкм, для обеспечения хорошей пригодности для вдыхания.

Введение композиций антител к ФНО в виде спрея. Спрей, включающий белок композиции антител к ФНО, может быть получен путем пропускания суспензии или раствора по меньшей мере одного антитела к ФНО через сопло под давлением. Размер и конфигурация сопла, применяемое давление и скорость подачи жидкости могут быть выбраны таким образом, чтобы достичь требуемого выхода и размера частиц. Например, электрораспыление можно производить с помощью электрического поля в комбинации с подачей через капилляр или сопло. Преимуществом является то, что частицы по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, доставляемые распылителем, имеют размер частиц менее около 10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

Составы по меньшей мере с одним белком композиции антитела к ФНО, приемлемые для применения с распылителем, как правило, включают белок композиции антител в водном растворе в концентрации от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка композиции антител к ФНО на мл раствора или мг/г, или в любом интервале или значении в нем, например, без ограничений, 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 или 100 мг/мл, или мг/г. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации белка композиции антител, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения композиций антител, относятся альбумин, протамин или т.п. К типичным углеводам, используемым для получения белков композиций антител, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т.п. Состав с белком композиции антител может также включать поверхностно-активное вещество, которое может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию белка композиции антител, вызванную атомизацией раствора с образованием аэрозоля. Можно использовать различные традиционные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 14% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат 20 или т.п. В состав могут также быть включены известные в данной области дополнительные агенты, предназначенные для получения белка, такого как антитела к ФНО, или их указанные участки или варианты.

Введение композиций антител к ФНО с помощью небулайзера. Белок композиции антител можно вводить с помощью небулайзера, такого как струйный небулайзер или ультразвуковой небулайзер. Как правило, в струйном небулайзере для создания высокоскоростной струи воздуха через отверстие используют источник сжатого воздуха. По мере расширения газа за соплом образуется область низкого давления, под действием которой раствор белка, содержащего композицию антител, засасывается через капиллярную трубку, соединенную с резервуаром с жидкостью. На выходе из капиллярной трубки поток жидкости разделяется на нестабильные волокна и капли и образуют аэрозоль. Для получения требуемых рабочих характеристик данного струйного небулайзера можно использовать диапазон конфигураций, скоростей потока и типов дефлекторов. В ультразвуковом небулайзере высокочастотная электрическая энергия преобразуется в вибрационную механическую энергию, обычно при помощи пьезоэлектрического преобразователя. Эта энергия подается на состав белка композиции антител либо напрямую, либо через связующую жидкость, в результате чего образуется аэрозоль, содержащий белок композиции антител. Преимуществом является то, что частицы композиции антитела к ФНО, доставляемые небулайзером, имеют размер частиц менее около 10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

Составы по меньшей мере с одним антителом к ФНО, приемлемые для использования с небулайзером, струйным или ультразвуковым, как правило, имеют концентрацию от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка антител к ФНО на миллилитр раствора. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, относятся альбумин, протамин или т.п. К типичным углеводам, используемым для получения по меньшей мере одного антитела к ФНО, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т.п. Состав по меньшей мере с одним антителом к ФНО может также включать поверхностно-активное вещество, которое может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию по меньшей мере одного антитела к ФНО, вызванную атомизацией раствора с образованием аэрозоля. Можно использовать различные традиционные поверхностно-активные

вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 4% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат 20 или т.п. В препарат белка, такого как белок антитела, могут также быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты.

Введение композиций антител к ФНО с помощью ингалятора отмеренных доз. В ингаляторе отмеренных доз (MDI) пропеллент, по меньшей мере одно антитело к ФНО и любые эксципиенты или другие добавки содержатся в резервуаре в виде смеси, содержащей сжиженный сжатый газ. Приведение в действие дозирующего клапана высвобождает смесь в виде аэрозоля, предпочтительно с частицами размером менее около 10 мкм, предпочтительно от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм. Требуемый размер частиц аэрозоля можно получить с использованием состава белка композиции антитела, полученного различными способами, известными специалистам в данной области, включая помол в струйной мельнице, распылительную сушку, конденсацию при критической температуре или т.п. Предпочтительные ингаляторы отмеренных доз включают ингаляторы с использованием пропеллента гидрофторуглерода, производимые компаниями 3М или Glaxo.

Составы по меньшей мере с одним антителом к ФНО для применения в ингаляторе отмеренных доз обычно включают мелкодисперсный порошок, содержащий по меньшей мере одно антитело к ФНО в виде суспензии в неводной среде, например суспензии в пропелленте, полученной с помощью поверхностно-активного вещества. Пропеллент может представлять собой любой традиционно используемый для этой цели материал, такой как хлорфторуглерод, гидрохлорфторуглерод, гидрофторуглерод или углеводород, в том числе трихлорфторметан, дихлордифторметан, тетрафтордихлорэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан, HFA-134 а (гидрофторалкан-134а), HFA-227 (гидрофторалкан-227) или т.п. Пропеллент предпочтительно представляет собой гидрофторуглерод. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано для стабилизации по меньшей мере одного антитела к ФНО в виде суспензии в пропелленте для защиты активного агента от химического разложения и т.п. Приемлемые поверхностно-активные вещества включают сорбитантриолеат, соевый лецитин, олеиновую кислоту или т.п. В некоторых случаях предпочтительными являются аэрозоли растворов, в которых используют растворители, такие как этанол. В состав также могут быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты, применяемые для получения препаратов белка.

Специалисту в данной области будет понятно, что способы настоящего изобретения могут быть достигнуты путем введения через легкие по меньшей мере одной композиции антитела к ФНО через устройства, не описанные в настоящем документе.

Пероральные составы и способ введения. Препараты для перорального применения основаны на одновременном введении вспомогательных веществ (например, резорцинов и неионных поверхностно-активных веществ, таких как полиоксиэтиленолеиловый эфир и n-гексадецилполиэтиленовый эфир) для искусственного увеличения проницаемости стенок кишечника, а также на одновременном введении ингибиторов ферментов (например, ингибиторов трипсина поджелудочной железы, диизопропилфторфосфата (DFF) и трозилола) для ингибирования ферментативного расщепления. Активное составляющее твердой лекарственной формы для перорального введения можно смешивать по меньшей мере с одной добавкой, включая сахарозу, лактозу, целлюлозу, маннит, трегалозу, рафинозу, мальтит, декстран, крахмалы, агар, аргинаты, хитины, хитозаны, пектины, трагакантовую камедь, гуммиарабик, желатин, коллаген, казеин, альбумин, синтетический или полусинтетический полимер и глицерид. Эти лекарственные формы могут также содержать добавки другого (их) типа (ов), например неактивный разбавитель, смазывающее вещество, такое как стеарат магния, парабен, консервант, такой как сорбиновая кислота, аскорбиновая кислота, альфа-токоферол, антиоксидант, такой как цистеин, дезинтегратор, связующее вещество, загуститель, буферный агент, подсластитель, ароматизатор, отдушка и т.п.

Таблетки и пилюли можно дополнительно обрабатывать с получением препаратов с кишечнорастворимым покрытием. Жидкие препараты для перорального введения включают эмульсию, сироп, эликсир, суспензию и раствор, подходящие для медицинского применения. Эти препараты могут содержать неактивные разбавители, обычно используемые в указанной области техники, например воду. В качестве систем доставки инсулина и гепарина также описаны липосомы (патент США № 4239754). В последнее время для доставки фармацевтических препаратов используют микросферы из искусственных полимеров смешанных аминокислот (протеиноидов) (патент США № 4925673). Кроме того, в данной области известны соединения-носители, описанные в патенте США № 5879681 и патенте США № 5871753, и используемые для перорального введения биологически активных веществ.

Составы и способ введения через слизистую. Для абсорбции через слизистые оболочки композиции и способы введения по меньшей мере одного антитела к ФНО включают эмульсию, содержащую множество субмикронных частиц, мукоадгезивную макромолекулу, биоактивный пептид и непрерывную водную фазу, которая способствует абсорбции через слизистые оболочки за счет достижения адгезии частиц эмульсии к слизистой оболочке (патент США № 5514670). Способы введения через слизистые оболочки, приемлемые для введения эмульсий настоящего изобретения, могут включать роговичный, конъюнктив-

важный, буккальный, сублингвальный, назальный, вагинальный, легочный, желудочный, кишечный и ректальный способы введения. Составы для вагинального или ректального введения, например суппозитории, в качестве эксципиентов могут содержать, например, полиалкиленгликоли, вазелин, масло какао и т.п. Составы для интраназального введения могут быть твердыми и содержать в качестве эксципиентов, например, лактозу, или могут представлять собой водные или масляные растворы для закапывания в нос. К эксципиентам для буккального введения относятся сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и т.п. (патент США № 5849695).

Чрескожные составы и способ введения. Для чрескожного введения по меньшей мере одно антитело к ФНО инкапсулируют в устройство доставки, такое как липосомы или полимерные наночастицы, микрочастицы, микрокапсулы или микросферы (в совокупности называемые микрочастицами, если не указано иное). Известен ряд приемлемых устройств, в том числе микрочастицы, изготовленные из синтетических полимеров, таких как полигидроксикислоты, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и их сополимеры, полиортоэферы, полиангидриды, полифосфазены, и натуральные полимеры, такие как коллаген, полиаминокислоты, альбумин и другие белки, альгинат и другие полисахариды и их комбинации (патент США № 5814599).

Пролонгированное введение и составы. Иногда может потребоваться доставка соединения настоящего изобретения субъекту в течение длительных периодов времени, например в течение периодов от одной недели до одного года, путем однократного введения. Можно использовать различные лекарственные формы с медленным высвобождением, депо или имплантаты. Например, лекарственная форма может содержать фармацевтически приемлемую нетоксичную соль соединений, которая имеет низкую степень растворимости в физиологических жидкостях, например: (а) соль присоединения кислоты с многоосновной кислотой, такой как фосфорная кислота, серная кислота, лимонная кислота, винная кислота, дубильная кислота, палмовая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинмоно-или дисульфоновая кислота, полигалактуроновая кислота и т.п.; (b) соль многовалентного катиона металла, например цинка, кальция, висмута, бария, магния, алюминия, меди, кобальта, никеля, кадмия и т.п., или с органическим катионом, образованным из, например, N,N'-дибензилэтилендиамином или этилендиамином; или (с) комбинации (а) и (b), например соль таннат цинка. Кроме того, соединения настоящего изобретения или предпочтительно относительно нерастворимая соль, такая как описанные выше, могут быть получены в виде геля, например геля моностеарата алюминия, например, с кунжутным маслом, приемлемого для инъекций. Особенно предпочтительными солями являются соли цинка, соли танната цинка, соли памоата цинка и т.п. Другой тип депонирующего состава с замедленным высвобождением для инъекций будет содержать соединение или соль, диспергированные для инкапсулирования в медленно разлагающемся нетоксичном неантигенном полимере, таком как полимер полимолочная кислота/полигликолевая кислота, например, как описано в патенте США № 3773919. Соединения или предпочтительно относительно нерастворимые соли, такие как описанные выше, можно также готовить в виде пеллет из силастика с холестериновым матриксом, в частности, для применения у животных. В литературе также известны другие препараты для медленного высвобождения, депонирования или имплантации, например газовые или жидкие липосомы (патент США № 5770222 и публикация "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Приведенное выше описание изобретения по существу дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими.

Пример 1. Клонирование и экспрессия антитела к ФНО в клетках млекопитающих.

Типичный экспрессионный вектор млекопитающих содержит по меньшей мере один промоторный элемент, опосредующий инициацию транскрипции мРНК, последовательность, кодирующую антитело, и сигналы, необходимые для терминирования транскрипции и полиаденилирования транскрипта. К дополнительным элементам относятся энхансеры, последовательности Козака и интроны, фланкированные донорным и акцепторным сайтами для сплайсинга РНК. Высокоэффективной транскрипции можно достигнуть с помощью ранних и поздних промоторов из SV40, длинных концевых повторов (LTR) из ретровирусов, например RSV, HTLV, HIV, и раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Однако можно также использовать элементы клеток (например, промотор актина человека). Приемлемые экспрессионные векторы для применения на практике настоящего изобретения включают, например, такие векторы, как pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clontech Labs, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) или pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL и PMSG (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) и pBC12MI (ATCC 67109). Клетки-хозяева млекопитающих, которые можно применять, включают клетки человека Hela 293, H9 и клетки Jurkat, мышинные клетки NIH3T3 и C127, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки перепела QC1-3, мышинные L-клетки и клетки яичника китайского хомячка (CHO).

В альтернативном варианте осуществления ген можно экспрессировать в стабильных клеточных линиях, содержащих ген, интегрированный в хромосому. Котранфекция с селективным маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин или гигромицин, допускает идентификацию и выделение трансфицированных клеток.

Трансфицированный ген можно также амплифицировать для экспрессии больших количеств коди-

рованного антитела. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) используют для развития клеточных линий, несущих несколько сотен или даже несколько тысяч копий интересующего гена. Другим используемым селективным маркером является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy, et al., *Biochem. J.* 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., *Bio/Technology* 10: 169-175 (1992)). С использованием таких маркеров клетки млекопитающих выращивают в селективной среде и отбирают клетки с наивысшей устойчивостью. Такие клеточные линии содержат амплифицированный (ые) ген (ы), интегрированный (ые) в хромосому. Для продуцирования антител часто используют клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки NSO.

Экспрессионные векторы pC1 и pC4 содержат сильный промотор (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)) с фрагментом энхансера CMV (Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)). Сайты множественного клонирования, например сайты расщепления рестриктазами BamHI, XbaI и Asp718, облегчают клонирование интересующего гена. Кроме 3'-интрона векторы содержат сигнал полиаденилирования и сигнал терминации гена препроинсулина крысы.

Клонирование и экспрессия в клетках CHO. Для экспрессии антитела к ФНО используют вектор pC4. Плазмида pC4 является производным плазмиды pSV2-dhfr (каталожный номер ATCC 37146). Плазмида содержит мышиный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника или другие клетки китайского хомячка, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гайтерсбург, штат Мэриленд, США) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MTX), хорошо описана раньше (см., например, F.W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990); M.J. Page and M.A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому лекарственному средству путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного (ых) гена (ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

Плазмида pC4 содержит для экспрессии интересующего гена сильный промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент, выделенный из энхансера немедленно раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). После промотора расположены сайты расщепления рестрикционных ферментов BamHI, XbaI и Asp718, которые позволяют интегрировать гены. Позади этих сайтов клонирования плазмида содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии можно также использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор бета-актина человека, ранние или поздние промоторы SV40 или длинные концевые повторы других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы можно использовать для регулируемой экспрессии ФНО в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК можно также использовать другие сигналы, например, из гормона роста человека или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, можно также отбирать после котрансфекции с селективным маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является применение сначала более одного селективного маркера, например G418 плюс метотрексат.

Плазмиду pC4 расщепляют рестриктазами и впоследствии дефосфорилируют с использованием кишечной фосфатазы теленка в ходе процедур, известных специалистам в данной области. Затем выделяют вектор из 1% агарозного геля.

Впоследствии ДНК, кодирующую выделенные переменную и константную области, и дефосфорилированный вектор лигируют с помощью ДНК-лигазы T4. Затем трансформируют клетки E.coli HB101 или XL-1 Blue, и идентифицируют бактерии, содержащие фрагмент, встроенный в плазмиду pC4, посредством, например, анализа рестрикционным ферментом.

Для трансфекции используют клетки яичника китайского хомячка (CHO), лишенные активности гена DHFR. Экспрессионную плазмиду pC4 (5 мкг) котрансфицируют с 0,5 мкг плазмиды pSV2-neo с помощью липофектина. Плазмида pSV2-neo содержит доминантный селективный маркер, ген neo из Tn5, который кодирует фермент, придающий устойчивость к группе антибиотиков, включая G418. Клетки высевают в среду альфа минус MEM с добавлением 1 мкг/мл G418. Через 2 дня клетки обрабатывают трипсином и высевают в планшеты для клонирования гибридом (Greiner, Германия) в среде альфа минус MEM с добавлением 10, 25 или 50 нг/мл метотрексата и 1 мкг/мл G418. Через около 10-14 дней отдельные клоны обрабатывают трипсином и впоследствии высевают в 6-луночные чашки Петри или 10-мл флаконы с добавлением различных концентраций метотрексата (50, 100, 200, 400, 800 нМ). Затем клоны, растущие при самых высоких концентрациях метотрексата, переносят в новые 6-луночные планшеты, содержащие еще более высокие концентрации метотрексата (1, 2, 5, 10, 20 мМ). Такую же процедуру

повторяют до тех пор, пока не получают клоны, растущие при концентрации 100-200 мМ. Экспрессию требуемого генного продукта анализируют, например, методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, или методом анализа ВЭЖХ с обращенной фазой.

Пример 2. Создание высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО, с использованием трансгенных мышей.

Сводная информация. Использовали трансгенных мышей, имеющих гены человеческих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов для получения высокоаффинных полностью человеческих моноклональных антител, которые можно использовать в терапевтических целях для ингибирования действия ФНО и соответственно лечения одного или более ФНО-опосредованных заболеваний. Гибридных мышей (CBA/J x C57/BL6/J) F₂, имеющих трансгены человеческих переменного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизируют человеческим рекомбинантным ФНО (Taylor et al., *Intl. Immunol.* 6:579-591 (1993); Lonberg, et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Neuberger, M., *Nature Biotech.* 14:826 (1996); Fishwild, et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996)). Посредством нескольких слияний удалось получить одну или более панелей полностью человеческих реактивных в отношении ФНО моноклональных антител IgG. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Все они относятся к типу IgG1κ. Обнаружено, что такие антитела имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми кандидатами для терапевтического применения при заболеваниях, патологиях или расстройствах, связанных с ФНО.

Сокращения. BSA - бычий сывороточный альбумин; CO₂ - диоксид углерода; DMSO - диметилсульфоксид; EIA - иммуноферментный анализ; FBS - эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ - перекись водорода; HRP - пероксидаза хрена; в/д - внутридермально; Ig - иммуноглобулин; ФНО - фактор некроза опухоли альфа; в/б - внутрибрюшинно; в/в - внутривенно; Мат или мАт - моноклональное антитело; OD - оптическая плотность; OPD - дигидрохлорид о-фенилендиамина; PEG - полиэтиленгликоль; PSA - пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ - комнатная температура; п/к - подкожно; об./об. - объем на объем; мас./об. - масса на объем.

Материалы и способы.

Животные. Трансгенные мыши, способные экспрессировать человеческие антитела, известны специалистам в данной области (и предлагаются к продаже, например, компанией GenPharm International, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США; Abgenix, Фримонт, штат Калифорния, США и т.д.), и они экспрессируют человеческие иммуноглобулины, а не мышинный IgM или Igκ. Например, такие трансгенные мыши содержат трансгены человеческой последовательности, которые подвергают соединению V(D)J, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора иммуноглобулинов человеческой последовательности (Lonberg, et al., *Nature* 368:856-859 (1994)). Трансген легкой цепи может быть получен, например, частично из клона искусственной хромосомы дрожжей, включающего почти половину Vκ-участка человеческой зародышевой линии. Кроме того, трансген тяжелой цепи может кодировать человеческие константные области мκ и γ1 (Fishwild, et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996)) и/или γ3. Мышей, полученных из соответствующих генотипических линий, можно использовать в процессах иммунизации и слияния для создания полностью человеческих моноклональных антител к ФНО.

Иммунизация. Для создания человеческих гибридом к ФНО можно использовать одну или более схем иммунизации. Первые несколько слияний можно выполнять по приведенному ниже примеру протокола иммунизации, но можно использовать и другие аналогичные известные протоколы. Несколько самок и/или хирургически кастрированных трансгенных самцов мышей возрасте 14-20 недель иммунизируют в/б или в/д, используя 1-1000 мкг рекомбинантного человеческого ФНО, эмульгированного с равным объемом TITERMAX, или полным адьювантом Фрейнда в конечном объеме 100-400 мкл (например, 200). Каждой мыши могут также необязательно давать 1-10 мкг в 100 мкл физиологического раствора в каждый из 2 участков п/к введения. Впоследствии мышей можно иммунизировать через 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 и/или 21-34 дней в/б (1-400 мкг) и п/к (1-400 мкг × 2) ФНО, эмульгированным с равным объемом TITERMAX или неполным адьювантом Фрейнда. Через 12-25 и 25-40 дней у мышей вызывали кровотечение путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Впоследствии крови дают свернуться при КТ в течение одного часа, собирают сыворотку и титруют с помощью EIA-анализа на ФНО в соответствии с известными способами. Слияния выполняют, когда повторные инъекции не вызывают увеличения титра. В это время мышам путем в/в введения можно вводить бустерную инъекцию 1-400 мкг ФНО, разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через три дня мышей можно умерщвлять посредством смещения шейных позвонков, извлекать селезенки в асептических условиях и погружать их в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленоциты собирают путем стерильной перфузии селезенки при помощи PSA-PBS. Клетки однократно промывают в холодном PSA-PBS, подсчитывают с использованием вытеснения трипанового синего и ресуспендируют в среде RPMI 1640, со-

державшей 25 мМ Нерес.

Слияние клеток. Слияние можно проводить при соотношении от 1:1 до 1:10 клеток мышинной миеломы и жизнеспособных клеток селезенки в соответствии, например, с известными специалистам способами. В качестве не имеющего ограничительного характера примера клетки селезенки и клетки миеломы можно совместно гранулировать. Впоследствии осадок можно медленно ресуспендировать в течение более 30 с в 1 мл 50% (мас./об.) раствора PEG/PBS (молекулярная масса PEG 1,450, Sigma) при температуре 37°C. Затем слияние можно остановить путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI 1640, содержащей 25 мМ Нерес (37°C), в течение 1 мин. Слитые клетки центрифугируют в течение 5 мин при 500-1500 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде НАТ (среда RPMI 1640, содержащая 25 мМ Нерес, 10% сыворотки Fetal Clone I (Hyclone), 1 мМ пирувата натрия, 4 мМ L-глутамина, 10 мкг/мл гентамицина, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 10% 653-кондиционированной среды RPMI 1640/Нерес, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии наносили в объеме 200 мкл/лунка на пятнадцать 96-луночных плоскодонных планшетов для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор 37°C, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7-10 суток.

Обнаружение человеческих антител к ФНО IgG в сыворотке крови мышей. Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО, можно использовать твердофазный EIA. Если коротко, планшеты можно оставлять покрываться в растворе ФНО в PBS (2 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15М солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки можно блокировать 1% (мас./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 ч при КТ. Планшеты использовали немедленно или замораживали при -20°C для будущего применения. Разведенные растворы мышинной сыворотки инкубируют на планшетах, покрытых ФНО, по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 ч. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc, разведенными 1:30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 ч при КТ. Планшеты можно снова промыть и в течение 15 мин при комнатной температуре добавить по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1М лимонной кислоты и 0,2М фосфата натрия, 0,01% H₂O₂ и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляют стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрируют оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы. Положительные по росту гибридомы, секретирующие полностью человеческие иммуноглобулины, можно обнаруживать с помощью приемлемого EIA-анализа. Вкратце, на 96-луночные выдвижные планшеты (VWR, 610744) наносили в концентрации 10 мкг/мл козьи антитела к человеческому Fc IgG в карбонатно-натриевом буфере в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали и блокировали 1% BSA-PBS в течение одного часа при 37°C и немедленно использовали или замораживали при -20°C. Неразбавленные супернатанты гибридомы инкубируют на планшетах в течение одного часа при 37°C. Планшеты промывали и зондировали мечеными HRP козьими антителами к каппа-цепи иммуноглобулина человека, разведенными 1:10000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при 37°C. Впоследствии планшеты инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.

Определение реакционной способности полностью человеческого антитела к ФНО. Как указано выше, гибридомы можно одновременно анализировать на реактивность к ФНО с помощью приемлемого анализа RIA или другого анализа. Например, супернатанты инкубировали на планшетах с Fc козьими антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше, промывали, а впоследствии зондировали радиоактивно-меченным ФНО с подсчетом соответствующих количеств на лунку в течение 1 ч при КТ. Лунки дважды промывают PBS и количественно оценивают связанный радиоактивно-меченный ФНО с помощью приемлемого счетчика.

Гибридомы, секретирующие человеческое антитело IgG1 к ФНО, могут быть размножены в клеточной культуре и последовательно субклонированы путем предельного разведения. Полученные клональные популяции можно размножать и криоконсервировать в среде для замораживания (95% FBS, 5% DMSO) и хранить в жидком азоте.

Изотипирование. Определение изотипа антител может быть выполнено с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышинной иммунной сыворотки на специфические титры. ФНО можно наносить на 96-луночные планшеты, как описано выше, и очищенное антитело в концентрации 2 мкг/мл можно инкубировать на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывают и тестируют меченым HRP козьим антителом к человеческому IgG₁ или меченым HRP козьим антителом к человеческому IgG₃, разведенным 1:4000 в 1% BSA-PBS в течение одного часа при КТ. Планшет снова промывают и инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.

Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО с человеческим ФНО. Характеристики связывания антител можно соответствующим образом оценивать, например, с помощью EIA-технологии с захватом ФНО и BIAcore. Определенные концентрации очищенных человеческих антител к ФНО можно оценивать на связывание с планшетами EIA, покрытыми 2 мкг/мл ФНО, в описанных выше анализах. Впоследствии можно представлять значения оптической плотности в виде полулогарифмиче-

ских графиков, демонстрирующих относительную эффективность связывания.

Количественные константы связывания можно получать, например, следующим способом или любым другим известным приемлемым способом. Чип BIAcore CM-5 (карбоксиметил) помещают в устройство BIAcore 2000. Буфер HBS (0,01M HEPES, 0,15M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) пропускают через проточную кювету чипа со скоростью 5 мкл/мин до получения стабильной фоновой линии. Раствор (100 мкл) 15 мг EDC (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид) в 200 мкл воды добавляли к 100 мкл раствора 2,3 мг NHS (N-гидроксисукцинимид) в 200 мкл воды. На чип наносят 40 (сорок) мкл полученного раствора. На чип наносят шесть мкл раствора человеческого ФНО (15 мкг/мл в 10 mM ацетата натрия, pH 4,8), что приводит к увеличению приблизительно на 500 RU. Буфер меняют на рабочий буфер TBS/Ca/Mg/BSA (20 mM Tris, 0,15M хлорида натрия, 2 mM хлорида кальция, 2 mM ацетата магния, 0,5% Triton X-100, 25 мкг/мл BSA, pH 7,4) и пропускают через чип в течение ночи для уравнивания и гидролиза или эквипирования любых непрореагировавших сложных эфиров сукцинимидов.

Антитела растворяют в рабочем буфере при концентрациях 33,33, 16,67, 8,33 и 4,17 нМ. Скорость потока доводят до 30 мкл/мин, а температуру прибора до 25°C. Для кинетических прогонов используют две проточные кюветы, причем на одной из них иммобилизован ФНО (образец), а вторая является недеприватизированной (холостая). По 120 мкл каждой концентрации антитела пропускают через проточные кюветы со скоростью 30 мкл/мин (фаза ассоциации) с последующим непрерывным пропуском потока буферного раствора в течение 360 с (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерируют (комплекс фактора некроза опухоли альфа/диссоциированного антитела) путем двух последовательных инъекций 2M гуанидинтиоцианата по 30 мкл каждая.

Анализ данных проводят с использованием BIA 3.0 или CLAMP 2.0, как известно специалистам в данной области. Для каждой концентрации антитела пустую сенсограмму вычитают из сенсограммы образца. Общую аппроксимацию выполняли как для диссоциации (K_d , с^{-1}), так и для ассоциации (k_a , $\text{моль}^{-1} \text{с}^{-1}$) и вычисляли константу диссоциации (K_D , моль) (k_d/k_a). Если аффинность антитела настолько высока, что значения RU захваченного антитела составляют > 100 , проводят дополнительные разведения антитела.

Результаты и обсуждение.

Получение моноклональных антител к человеческому ФНО. Проводят несколько слияний, и для каждого слияния выполняют посев в 15 планшет (1440 лунок/слияние), что дает несколько десятков антител, специфичных к человеческому ФНО. Обнаружено, что некоторые из них состоят из комбинации человеческих и мышиных цепей Ig. Оставшиеся гибридомы секретируют антитела к ФНО, состоящие только из человеческих тяжелых и легких цепей. Ожидается, что все человеческие гибридомы будут относиться к типу IgG1k.

Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО. Анализ методом твердофазного ИФА подтверждает, что очищенные антитела из большинства или всех этих гибридом связываются с ФНО концентрационно-зависимым образом. На фиг. 1 и 2 показаны результаты относительной эффективности связывания этих антител. В этом случае измеряют avidность антитела к его распознаваемому антигену (эпиту). Следует отметить, что при связывании ФНО непосредственно с планшетом для EIA возможна денатурация белка, и кажущиеся аффинности связывания не могут отражать связывание с денатурированным белком. В диапазоне концентраций обнаруживается пятидесятипроцентное связывание.

Количественные константы связывания получали с помощью анализа BIAcore человеческих антител, и результаты показали, что некоторые из человеческих моноклональных антител имеют очень высокую аффинность с K_D в диапазоне от 1×10^{-9} до 7×10^{-12} .

Выводы.

Несколько слияний выполняли с использованием спленоцитов от гибридных мышей, содержащих трансгены человеческих антител переменного и константного участков, иммунизированных человеческим ФНО. Был создан набор из нескольких полностью человеческих реактивных к ФНО моноклональных антител IgG изотипа IgG1k. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Несколько полученных антител имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми для терапевтического применения при ФНО-зависимых заболеваниях, патологиях или сходных состояниях.

Пример 3. Создание человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО-альфа.

Сводная информация. Гибридных мышей (CBA/J x C57BL/6J) F_2 (1-4), имеющих трансгены человеческих переменного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизировали рекомбинантным человеческим ФНО α . В результате одного слияния, GenTNV, получали восемь полностью человеческих моноклональных антител IgG1k, которые связываются с иммобилизованным рекомбинантным человеческим ФНО α . Вскоре после идентификации восемь клеточных линий передавали молекулярным биологам для дополнительного определения характеристик. Поскольку эти МАТ являются

полностью человеческими по последовательности, ожидается, что они будут у людей менее иммуногенными, чем антитела cA2 (Remicade).

Сокращения. BSA - бычий сывороточный альбумин; CO₂ - диоксид углерода; DMSO - диметилсульфоксид; EIA - иммуноферментный анализ; FBS - эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ - перекись водорода; HC - тяжелая цепь; HRP - пероксидаза хрена; в/д - внутридермально; Ig - иммуноглобулин; ФНО - фактор некроза опухоли альфа; в/б - внутрибрюшинно; в/в - внутривенно; мАт - моноклональное антитело; OD - оптическая плотность; OPD - дигидрохлорид о-фенилендиамина; PEG - полиэтиленгликоль; PSA - пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ - комнатная температура; п/к - подкожно; ФНОα - фактор некроза опухоли альфа; об./об. - объем на объем; мас./об. - масса на объем.

Введение. Для создания полностью человеческих моноклональных антител, специфичных к рекомбинантному ФНОα человека, использовали трансгенных мышей, имеющих человеческие гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Есть надежда, что эти уникальные антитела можно использовать, поскольку cA2 (Remicade) используют для терапевтического ингибирования воспалительных процессов, связанных с опосредованным ФНОα заболеванием, и при этом присутствует полезный эффект увеличения периода полужизни в сыворотке и уменьшения побочных эффектов, связанных с иммуногенностью.

В настоящем документе термин "период полужизни" означает, что концентрация лекарства в плазме (например, терапевтического антитела к ФНОα) уменьшается наполовину после одного периода полувыведения. Следовательно, в каждом последующем периоде полужизни выводится меньшее количество лекарственного средства. После одного периода полужизни количество лекарственного средства, оставшееся в организме, составляет 50%, после двух периодов полужизни 25% и т.д. Период полужизни лекарственного средства зависит от его клиренса и объема распределения. Считается, что период полужизни не зависит от количества лекарственного средства в организме.

Материалы и способы.

Животные. В GenPharm International были разработаны трансгенные мыши, экспрессирующие человеческие иммуноглобулины, но не мышинные IgM или Igk. Эти мыши имеют функциональные трансгены человеческих антител, которые подвергают соединению V(D)J, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора антиген-специфических человеческих иммуноглобулинов (1). Трансгены легкой цепи частично получены из клона искусственной хромосомы дрожжей, который включает в себя почти половину человеческого локуса V_k зародышевой линии. Кроме нескольких генов V_H трансген тяжелой цепи (HC) кодирует как человеческие константные области μ, так и человеческие константные области γ1 (2) и/или γ3. В процессе иммунизации и слияния для создания моноклональных антител, описанных в настоящем документе, использовали мышь, полученную из генотипической линии HCo12/KCo5.

Очистка человеческого ФНОα. ФНОα человека очищали из супернатанта тканевой культуры клеток C237A с помощью аффинной хроматографии на колонке, заполненной гибридным белком рецептор ФНОα-Fc (p55-sf2) (5), связанным с сефарозой 4B (Pharmacia). Супернатант клеток смешивали с одной девятой его объема 10-кратного PBS Дульбекко (D-PBS) и пропускали через колонку при 4°C со скоростью 4 мл/мин. Впоследствии колонку промывали PBS, и элюировали ФНОα 0,1M цитратом натрия, pH 3,5, и нейтрализовали 2M трис-HCl, pH 8,5. Очищенный ФНОα заменяли на буфер в 10 mM Tris, 0,12M хлорида натрия pH 7,5 и фильтровали через шприцевой фильтр на 0,2 мкм.

Иммунизация. Самку мыши GenPharm в возрасте приблизительно 16 недель иммунизировали в/б (200 мкл) и в/д (100 мкл в основании хвоста), используя суммарно 100 мкг ФНОα (партия JG102298 или JG102098), эмульгированного равным объемом адьюванта Titermax, в дни 0, 12 и 28. У мыши вызывали кровотечение в дни 21 и 35 путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Кровь оставляли для свертывания при КТ на один час и сыворотку собирали и титровали с помощью твердофазного EIA на ФНОα. Слияние, именуемое GenTNV, проводили после того, как мыши отдыхали в течение семи недель после инъекции в день 28. Мышам с титром IgG человека, равным 1:160, против ФНОα, проводили конечную бустерную в/в инъекцию 50 мкг ФНОα, разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через три дня мышь умерщвляли посредством смещения шейных позвонков, селезенку извлекали в асептических условиях и погружали в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленциты собирали путем стерильной перфузии селезенки PSA-PBS. Клетки однократно промывали в холодном PSA-PBS, подсчитывали с использованием счетчика Култера и ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 25 mM Hepes.

Клеточные линии. Несекретирующий партнер по слиянию мышинной миеломы (линия 653) получала группа Cell Biology Services (CBS) 14 мая 1997 г. от группы по разработке продуктов компании Centocor. Клеточную линию размножали в среде RPMI (JRH Biosciences) с добавлением 10% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 1 mM пирувата натрия, 0,1 mM NEAA, 2 mM L-глутамина (все производства JRH Biosciences) и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), а затем хранили в морозильнике с жидким азотом, в паровой фазе в CBS. Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories). Клетки до слияния поддерживали в

логарифмической фазе культуры. Перед слиянием их промывали в PBS, подсчитывали и определяли жизнеспособность (> 95%) посредством исключения красителя трипанового синего.

ФНО α человека получали при помощи рекомбинантной клеточной линии, именуемой C237A, и полученной в подразделении Molecular Biology компании Centocor. Клеточную линию размножали в среде IMDM (JRH Biosciences) с добавлением 5% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 2 mM L-глутамин (все производства JRH Biosciences) и 0,5 мкг/мл микофеноловой кислоты и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), впоследствии хранили в морозильнике с жидким азотом в паровой фазе в CBS (13). Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories).

Слияние клеток. Слияние клеток проводили при соотношении 1 : 1 клеток мышинной миеломы 653 и жизнеспособных клеток мышинной селезенки. Если коротко, клетки селезенки и клетки миеломы совместно осаждали. Осадок медленно ресуспендировали в течение 30 секунд в 1 мл раствора 50% (мас./об.) PEG/PBS (молекулярная масса PEG 1450 г/моль, Sigma) при 37°C. Слияние останавливали путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI (без добавок) (JRH) (37°C) в течение 1 мин. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при 750 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде NAT (среда RPMI/HEPES, содержащая 10% фетальную бычью сыворотку (JRH), 1 mM пирувата натрия, 2 mM L-глутамин, 10 мкг/мл гентамицин, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 50 мкМ 2-меркаптоэтанол, 1% 653-кондиционированную среду RPMI, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоксантина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии высевали по 200 мкл/лунка в пяти 96-луночных плоскодонных планшетах для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор при 37°C, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7-10 дней.

Обнаружение человеческих антител IgG к ФНО α в сыворотке крови мышей. Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО α , использовали твердофазный EIA. Если коротко, планшеты оставляли покрываться в растворе ФНО α в PBS (1 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15M солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки блокировали 1% (мас./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 ч при КТ. Планшеты либо немедленно использовали, либо замораживали при -20°C для будущего использования. Сыворотку крови мыши инкубировали в двукратных серийных разведениях на планшетах, покрытых человеческим ФНО α , по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 ч. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc (Accurate), разведенными 1:30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 ч при КТ. Планшеты снова промывали и в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1M лимонной кислоты и 0,2M фосфата натрия, 0,01% H₂O₂ и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляли стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрировали оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы. Поскольку мышь GenPharm способна образовывать мышинные и человеческие иммуноглобулиновые цепи, для тестирования жизнеспособных клонов гибридомы использовали два отдельных теста EIA на присутствие как человеческих легких, так и человеческих тяжелых цепей. Планшеты покрывали, как описано выше, и неразбавленные супернатанты гибридомы инкубировали на планшетах в течение одного часа при 37°C. Планшеты промывали и зондировали либо конъюгированными с HRP козьими антителами к каппа-цепи человеческого антитела (Southern Biotech), разведенными 1:10000 в 1% BSA-HBSS, либо конъюгированными с HRP козьими антителами к человеческому IgG, разведенными до 1:30000 в 1% BSA-HBSS, в течение одного часа при 37°C. Впоследствии планшеты инкубировали с раствором субстрата, как описано выше. Клоны гибридомы, которые не давали положительного сигнала как в формате с каппа-цепью человека, так и в формате антитела к человеческому IgG с Fc EIA, отбрасывали.

Изотипирование. Определение изотипа антител выполняли с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышинной иммунной сыворотки на специфические титры. Планшеты для EIA покрывали козьими антителами к человеческому IgG (H+L) в концентрации 10 г/мл в натрий-карбонатном буфере в течение ночи при 4 EC и блокировали, как описано выше. Чистые супернатанты культур из 24 лунок инкубировали на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывали и зондировали мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ (сайт связывания), разведенными в соотношении 1:4000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при комнатной температуре. Планшет снова промывали и инкубировали с раствором субстрата, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Создание полностью человеческих моноклональных антител к ФНО α человека. Одно слияние, называемое GenTNV, выполнял для мыши GenPharm, иммунизированной рекомбинантным белком ФНО α человека. После данного слияния провели отсевали 196 жизнеспособных гибридов. Было выявлено восемь гибридных клеточных линий, секретирующих полностью человеческие антитела IgG, реагирующие с ФНО α человека. Каждая из этих восьми клеточных линий секретирует иммуноглобулины человеческого изотипа IgG1 κ , и все субклонировали дважды путем предельного разведения для получения стабильных клеточных линий (однородность > 90%). Названия клеточных ли-

ний и соответствующие С-кодовые обозначения приведены в табл. 1. Каждую клеточную линию замораживали в исследовательских клеточных банках на 12 флаконов, хранимых в жидком азоте.

Родительские клетки, собранные из лунок 24-луночной культуральной чашки каждой из восьми клеточных линий, были переданы в группу Molecular Biology в 18.02.99 для трансфекции и дополнительного определения характеристик.

Таблица 1

Обозначения клеточных линий GenTNV

Название	С-кодовое обозначение
GenTNV14.17.12	C414A
GenTNV15.28.11	C415A
GenTNV32.2.16	C416A
GenTNV86.14.34	C417A
GenTNV118.3.36	C418A
GenTNV122.23.2	C419A
GenTNV148.26.12	C420A
GenTNV196.9.1	C421A

Заключение.

Слияние GenTNV проводили с использованием спленоцитов гибридной мыши, имеющей трансгены варибельной и константной областей антител человека, которая была иммунизирована рекомбинантным ФНО α человека, полученным в компании Centocor. Получали восемь полностью человеческих, реагирующих на ФНО-альфа моноклональных антител IgG изотипа IgG1к. Родительские клеточные линии были переданы в группу Molecular Biology для дальнейшего определения характеристик и разработки. Одно из этих новых человеческих антител можно использовать в противовоспалительном препарате, благодаря потенциальному преимуществу уменьшения иммуногенности и аллергических осложнений по сравнению с Remicade.

Ссылочный материал.

Taylor, et al., International Immunology 6:579-591 (1993).

Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994).

Neuberger, M. Nature Biotechnology 14:826 (1996).

Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996).

Scallon, et al., Cytokine 7:759-770 (1995).

Пример 4. Клонирование и подготовка клеточных линий, экспрессирующих человеческое антитело к ФНО α .

Сводная информация. Было обнаружено, что панель из восьми человеческих моноклональных антител (мАт) с обозначением TNV связывается с иммобилизованным ФНО α человека с очевидно высокой avidностью. Было показано, что семь из восьми мАт эффективно блокируют связывание человеческого ФНО α с рекомбинантным рецептором к ФНО. Анализ последовательности ДНК, кодирующей семь мАт, подтвердил, что все мАт имели человеческие V-области. Последовательности ДНК также продемонстрировали, что три пары мАт были идентичны друг другу так, что исходная панель из восьми мАт содержала только четыре различных мАт, обозначенных как TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. На основании анализа выявленных аминокислотных последовательностей мАт и результатов по данным по нейтрализации ФНО α in vitro для дальнейшего исследования отбирали мАт TNV148 и TNV14.

Поскольку при поиске по базе данных остаток пролина в положении 75 (каркас 3) в тяжелой цепи TNV148 не был обнаружен в этом положении в других человеческих антителах той же подгруппы, был проведен сайт-направленный мутагенез ДНК для кодирования остатка серина в этом положении, чтобы он соответствовал известным каркасным последовательностям e зародышевой линии. Модифицированное серином мАт обозначали как TNV148B. ПЦР-амплифицированную ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой и легкой цепей TNV148B и TNV14, клонировали во вновь полученные экспрессионные векторы, основанные на недавно клонированных генах тяжелой и легкой цепей другого человеческого мАт (12B75), описанного в заявке на патент США № 60/236827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной "IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses", опубликованной как WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Клетки P3X63Ag8.653 (653) или клетки миеломы мышей Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) трансфицировали соответствующими экспрессионными плазмидами тяжелой и легкой цепей и отсеивали посредством двух циклов субклонирования клеточных линий, получая высокие уровни рекомбинантных мАт TNV148B и TNV14 (rTNV148B и rTNV14). Оценки кривых роста и стабильности продукции мАт с течением времени показали, что трансфицированные 653-клоны C466D и C466C стабильно продуцировали приблизительно 125 г/мл мАт rTNV148B в отработанных культурах, а трансфицированные Sp2/0-клоны 1.73-12-122

(С467А) стабильно продуцировали приблизительно 25 г/мл мАт rTNV148В в отработанных культурах. Аналогичные анализы показали, что трансфицированный Sp2/0-клон С476А продуцировал 18 г/мл rTNV14 в отработанных культурах.

Введение. Ранее было показано, что панель из восьми мАт, полученных от иммунизированных человеческим ФНО α мышей GenPharm/Medarex (генотип HCo12/KCo5), связывается с ФНО α человека и имеет полностью человеческий изотип IgG1 каппа. Для определения в примерах мАт настоящего изобретения возможности наличия ФНО α -нейтрализующей активности использовали простой анализ связывания и оценивали их способность блокировать связывание ФНО α с рекомбинантным рецептором ФНО. На основании этих результатов данных о последовательности ДНК и определения характеристик *in vitro* нескольких мАт для дальнейшего определения характеристик отбирали мАт TNV148.

Последовательности ДНК, кодирующие мАт TNV148, клонировали, модифицировали для встраивания в экспрессионные векторы генов, которые кодируют приемлемые константные участки, внедряли в хорошо охарактеризованные клетки мышинных миелом 653 и Sp2/0 и отсеивали трансфицированные клеточные линии, пока не выявляли субклоны, которые продуцировали в 40 раз больше мАт, чем исходная гибридная клеточная линия.

Материалы и способы.

Реагенты и клетки. Реагент TRIZOL был приобретен у компании Gibco BRL. Протеиназа К была получена от компании Sigma Chemical Company. Обратную транскриптазу приобретали в компании Life Sciences, Inc. ДНК-полимеразу Taq получали от компании Perkin Elmer Cetus или Gibco BRL. Рестрикционные ферменты приобретали у New England Biolabs. Набор для очистки QIAquick PCR приобретали у компании Qiagen. Набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange был приобретен у компании Stratagene. Наборы для получения минипрепаратов плазмид Wizard и ингибитор РНКаз RNasin приобретали в компании Promega. Планшеты Optiplates были приобретены у компании Packard. ¹²⁵Йод был приобретен у компании Amersham. Создаваемые на заказ олигонуклеотиды приобретали у компании Keystone/Biosource International. Названия, идентификационные номера и последовательности олигонуклеотидов, используемых в данной работе, показаны в табл. 2.

Таблица 2

Олигонуклеотиды, используемые для клонирования, конструирования или определения последовательности генов мАт TNV

Название	ИД	Последовательность
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10)
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO:11)
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12)
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14)
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15)
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
BsiWIMDWTSI		(SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID NO:18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21)
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3'

(SEQ ID NO:22)
T V T V S S BstBI
(SEQ ID NO:23)
HuH-J6 388 3'-GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5'
(SEQ ID NO:24)
SalI M D M R V (SEQ ID NO:25)
LK7s 362 5'-TTTGTCTGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3'
(SEQ ID NO:26)
LVgs 363 5'-TTTGTCTGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3'
(SEQ ID NO:27)
T K V D I K (SEQ ID NO: 28) Ap2
HuL-J3 380
3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAAGAAATTCGGCGCCTTT
(SEQ ID NO:29)
V148-QC1 399 5'-CATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATC-3'
(SEQ ID NO:30)
V148-QC2 400 3'-GTAGAGGTCTCTGTAAAGGTTCTTGTGCGACATAG-5'
(SEQ ID NO:31)

Аминокислоты, кодируемые олигонуклеотидом 5'14s и HuH-J6, показаны над последовательностью. Аминокислотный остаток "М" представляет собой кодон начала трансляции. Подчеркнутые последовательности в олигонуклеотидах 5'14s и HuH-J6 обозначают сайты рестрикции BsiWI и BstBI соответственно. Слэш в HuH-J6 соответствует границе экзон/интрон. Следует отметить, что олигонуклеотиды, последовательность которых соответствует минус-нити, записаны в ориентации 3'-5'.

Получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы 653. Флакон размораживали на этот же день и размножали в Т-флаконах в среде IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина (среда). Эти клетки поддерживали в непрерывной культуре до трансфицирования через 2-3 недели при помощи ДНК антигела к ФНО α , описанной в настоящем документе. Некоторые культуры собирали через 5 суток после оттаивания, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 95% FBS, 5% DMSO, аликвотировали в 30 флаконов, замораживали и хранили для дальнейшего применения. Аналогичным образом получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы Sp2/0. Флакон размораживали, подготавливали к новой заморозке, как описано выше, и хранили замороженные флаконы в морозильных боксах СВС АА и АВ. Эти клетки размораживали и использовали для всех трансфекций Sp2/0, описанных в настоящем документе.

Анализ на ингибирование связывания ФНО с рецептором. Супернатанты гибридомных клеток, содержащие мАт TNV, использовали для анализа способности мАт блокировать связывание 125 I-меченого ФНО α с рекомбинантным гибридным белком рецептора к ФНО p55-sf2 (Scallon et al. (1995) Cytokine 7:759-770). На планшеты Optiplates добавляли 50 л p55-sf2 в концентрации 0,5 г/мл в PBS, чтобы покрыть лунки, и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Готовили серийные разведения восьми супернатантов клеток TNV в круглодонных 96-луночных планшетах с использованием PBS/ 0,1% BSA в качестве разбавителя. Супернатант клеток, содержащий мАт к IL-18, использовали в качестве отрицательного контроля, а такой же супернатант антигел к IL-18 с добавлением сА2 (химерное антигело к ФНО, Remicade, патент США № 5770198, полностью включенный в настоящий документ путем ссылки) использовали в качестве положительного контроля. 125 I-меченный ФНО α (58 Кю/г, D. Shealy) добавляли к 100 л супернатанта клеток с конечной концентрацией ФНО α 5 нг/мл. Смесь предварительно инкубировали в течение одного часа при КТ. Планшеты Optiplates с нанесенным покрытием промывали для удаления несвязанного p55-sf2 и в планшеты Optiplates переносили 50 л смеси 125 I-ФНО α /супернатант клеток. Через 2 ч при КТ планшеты Optiplates трижды промывали PBS-Tween. Добавляли 100 л реактива Microscint-20 и определяли число импульсов в минуту с использованием гамма-счетчика TopCount.

Амплификация V-генов и анализ последовательности ДНК. Клетки гибридомы промывали один раз в PBS, а затем добавляли реагент TRIZOL для подготовки РНК. Количество клеток от 7×10^6 до $1,7 \times 10^7$ ресуспендировали в 1 мл TRIZOL. Пробирки энергично встряхивали после добавления 200 мкл хлороформа. Пробы центрифугировали при 4°C в течение 10 мин. Водную фазу переносили в новую микроцентрифужную пробирку и добавляли равный объем изопропанола. Пробирки энергично встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Впоследствии пробы центрифугировали при 4°C в течение 10 мин. Осадок однократно промывали 1 мл 70% этанола и кратковременно высушивали в вакуумной сушилке. Осадки РНК ресуспендировали в 40 мкл обработанной DEPC воды. Качество препаратов РНК определяли путем фракционирования 0,5 мкл в 1% агарозном геле. До использования РНК хранили в морозильной камере при температуре -80°C.

Для получения кДНК тяжелой и легкой цепей получали смеси, которые содержали 3 мкл РНК и 1 мкг олигонуклеотида 119 (тяжелая цепь) или олигонуклеотида 117 (легкая цепь) (см. табл. 1) в объеме 11,5 мкл. Смесь инкубировали при 70°C в течение 10 мин на водяной бане, а впоследствии охлаждали на льду в течение 10 мин. Получали отдельную смесь, состоящую из 2,5 мкл 10-кратного буфера обратной транскриптазы, 10 мкл 2,5 mM dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы (20 единиц) и 0,4 мкл ингибитора рибонуклеазы RNasin (1 единица). 13,5 мкл этой смеси добавляли к 11,5 мкл охлажденной смеси РНК/олигонуклеотид и инкубировали реакционную смесь в течение 40 мин при 42°C. Впоследствии реакционную смесь синтеза кДНК хранили до использования в морозильной камере при -20°C.

Неочищенные кДНК тяжелой и легкой цепей использовали в качестве матриц для ПЦР-амплификации последовательностей, кодирующих вариабельную область. Одновременно тестировали пять пар олигонуклеотидов (366/354, 367/354, 368/354, 369/354 и 370/354, табл. 1) на способность праймировать амплификацию ДНК тяжелой цепи. Две пары олигонуклеотидов (362/208 и 363/208) одновременно тестировали на способность праймировать амплификацию ДНК легкой цепи. ПЦР проводили с использованием 2 единиц Taq ДНК-полимеразы PLATINUM™ высокой точности (HIFI) в общем объеме 50 мкл. Каждая реакционная смесь включала в себя 2 мкл реакционной смеси кДНК, по 10 пмоль каждого олигонуклеотида, 0,2 mM dNTP, 5 мкл 10X буфера HIFI и 2 mM сульфата магния. Программа термоцикла была следующей: температура 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов (94°C в течение 30 с, 62°C в течение 30 с, 68°C в течение 1,5 мин). Впоследствии выполняли конечную инкубацию при 68°C в течение 10 мин.

Для подготовки ПЦР-продуктов для прямого секвенирования ДНК их очищали с использованием набора QIAquick™ PCR Purification Kit в соответствии с протоколом производителя. ДНК элюировали из центрифужной колонки, используя 50 мкл стерильной воды, а впоследствии высушивали до объема 10 мкл с помощью вакуумной сушилки. Затем готовили реакционные смеси для секвенирования ДНК, содержащие 1 мкл очищенного продукта ПЦР, 10 мкМ олигонуклеотидного праймера, 4 мкл готовой реакционной смеси BigDye Terminator™ и 14 мкл стерильной воды до общего объема 20 мкл. Продукты ПЦР тяжелых цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 367/354, секвенировали с использованием олигонуклеотидных праймеров 159 и 360. Продукты ПЦР легких цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 363/208, секвенировали с использованием олигонуклеотидов 34 и 163. Программа термоцикла для секвенирования представляла собой 25 циклов (96°C в течение 30 с, 50°C в течение 15 с, 60°C в течение 4 мин) с последующим выдерживанием в течение ночи при 4°C. Продукты реакции фракционировали через полиакриламидный гель и детектировали с использованием ДНК-секвенатора ABI 377.

Сайт-направленный мутагенез для замены аминокислоты. Один нуклеотид в последовательности ДНК вариабельной области тяжелой цепи TNV148 изменяли, чтобы заменить Pro⁷⁵ остатком серина в мАт TNV148. Были разработаны и заказаны комплементарные олигонуклеотиды 399 и 400 (табл. 1) для такого изменения с использованием способа сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ в соответствии с описанием производителя. Два олигонуклеотида сначала фракционировали через 15% полиакриламидный гель и очищали основные полосы. Реакции мутагенеза проводили с использованием либо 10 нг, либо 50 нг плазмидной матрицы тяжелой цепи TNV148 (p1753), 5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 1 мкл смеси dNTP, 125 нг праймера 399, 125 нг праймера 400 и 1 мкл ДНК-полимеразы Pfu. Добавляли стерильную воду для доведения общего объема до 50 мкл. Впоследствии реакционную смесь инкубировали в термоциклере, запрограммированном на инкубацию при 95°C в течение 30 с, впоследствии проводили цикл 14 раз с последовательными инкубациями: 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин, 64°C в течение 1 мин и 68°C в течение 7 мин, затем 30°C в течение 2 мин (1 цикл). Данные реакции были разработаны для включения мутагенных олигонуклеотидов в идентичные по остальным параметрам вновь синтезированные плазмиды. Для избавления от исходных плазмид TNV148 пробы инкубировали при 37°C в течение 1 ч после добавления 1 мкл эндонуклеазы DpnI, которая расщепляет только исходную метилированную плазмиду. Один мкл реакционной смеси впоследствии использовали для трансформации E.coli Epicurian Coli XL1-Blue стандартными способами теплового шока и трансформированные бактерии, идентифицированные после посева на планшеты с агаром с LB-ампициллином. Плазмидные минипрепараты готовили с использованием наборов Wizard™ в соответствии с инструкциями производителя. После элюирования пробы из колонки Wizard™ плазмидную ДНК осаждали этанолом для дополнительной очистки плазмидной ДНК, а впоследствии ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды. Впоследствии выполняли анализ последовательностей ДНК для идентификации плазмидных клонов, имеющих требуемое изменение основания, и для подтверждения того, что в кодирующую последовательность TNV148 не были случайно введены другие изменения в основаниях. Один мкл плазмиды подвергали реакции циклического секвенирования, проводимой с использованием 3 мкл смеси BigDye, 1 мкл прямого праймера pUC19 и 10 мкл стерильной воды, используя те же параметры, что описаны в разделе 4.3.

Конструирование экспрессионных векторов из генов 12B75. Выполняли несколько этапов с рекомбинантной ДНК для получения нового человеческого экспрессионного вектора IgG1 и нового человеческого экспрессионного вектора каппа из ранее клонированных геномных копий генов тяжелой и легкой

цепей, кодирующих 12B75 соответственно, которые описаны в заявке на патент США № 60/236827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной "IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses", опубликованной под номером WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Конечные векторы были разработаны с возможностью простого одноэтапного замещения существующих последовательностей вариательной области на любую соответствующим образом сконструированную ПЦР-амплифицированную вариательную область.

Для модификации гена тяжелой цепи 12B75 в плазмиде p1560 фрагмент BamHI/HindIII размером 6,85 т.п.н., содержащий промотор и вариательную область, переносили из p1560 в pUC19 с получением p1743. Благодаря меньшему размеру этой плазмиды по сравнению с p1560 можно было использовать мутагенез QuikChange™ (с использованием олигонуклеотидов BsiWI-1 и BsiWI-2) для введения уникального сайта клонирования BsiWI непосредственно ближе к 5' концу от сайта инициации трансляции в соответствии с протоколом производителя. Полученная плазида была названа p1747. Для введения сайта BstBI на 3'-конец вариательной области был создан 5'-олигонуклеотидный праймер с сайтами SalI и BstBI. Данный праймер использовали с обратным праймером pUC для амплификации фрагмента 2,75 т.п.н. из p1747. Впоследствии фрагмент обратно клонировали в сайт SalI природного происхождения в вариательной области 12B75 и сайт HindIII, в результате чего был внедрен уникальный сайт BstBI. Полученный промежуточный вектор, обозначенный p1750, может принимать фрагменты вариательной области с концами BsiWI и BstBI. Для получения версии вектора тяжелой цепи, в котором константная область также является производной от гена 12B75, вставку BamHI-HindIII в p1750 переносили в pBR322, чтобы получить сайт EcoRI после сайта HindIII. Впоследствии полученную плазмиду p1768 расщепляли при помощи HindIII и EcoRI и лигировали с фрагментом HindIII-EcoRI размером 5,7 т.п.н. из p1744, получали субклон путем клонирования большого фрагмента BamHI-BamHI из p1560 в pBC. Затем полученную плазмиду (p1784) использовали в качестве вектора для фрагментов кДНК антитела TNV с концами BsiWI и BstBI. Была проведена дополнительная работа по получению экспрессионных векторов p1788 и p1798, которые включают константную область IgG1 из гена 12B75 и отличаются друг от друга тем, насколько большую часть J-С интрона тяжелой цепи 12B75 они содержат.

Для модификации гена легкой цепи 12B75 в плазмиде p1558 фрагмент SalI/AflII размером 5,7 т.п.н., содержащий промотор 12B75 и вариательную область, переносили из p1558 в сайты XhoI/AflII плазмиды L28. Эта новая плазида, p1745, обеспечила матрицу меньшего размера для стадии мутагенеза. Олигонуклеотиды (C340sal1 и C340sal2) использовали для введения уникального сайта рестрикции SalI на 5'-конце вариательной области посредством мутагенеза QuikChange™. Полученный промежуточный вектор (p1746) имел уникальные сайты рестрикции SalI и AflII, в которые могут быть клонированы фрагменты вариательного участка. Любой фрагмент вариательной области, клонированный в p1746, предпочтительно соединяется с 3'-половиной гена легкой цепи. Для получения рестрикционного фрагмента из 3'-половины гена легкой цепи 12B75, который можно использовать для этой цели, олигонуклеотиды BAHN-1 и BAHN-2 отжигали друг с другом с образованием двухцепочечного линкера, содержащего сайты рестрикции BsiWI, AflII, HindII и NotI, и имеющие концы, которые можно лигировать в сайты KpnI и SacI. Данный линкер клонировали между сайтами KpnI и SacI в pBC с получением плазмиды p1757. Фрагмент из 7,1 т.п.н., содержащий константную область легкой цепи 12B75, созданный путем расщепления p1558 при помощи AflII, с последующим частичным расщеплением HindIII, клонировали между сайтами AflII и HindII p1757 с получением p1762. Данная новая плазида содержала уникальные сайты для BsiWI и AflII, в которые может быть перенесен фрагмент BsiWI/AflII, содержащий промотор и вариательные участки, с объединением двух половин гена.

Клонирование кДНК и сборка экспрессионных плазмид. Все реакционные смеси для ОТ-ПЦР (см. выше) обрабатывали ферментом Klenow для дополнительного заполнения концов ДНК. ПЦР-фрагменты тяжелой цепи расщепляли рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и впоследствии клонировали между сайтами BsiWI и BstBI плазмиды L28 (L28 использовали, поскольку промежуточный вектор на основе 12B75 p1750 еще не был получен). Анализ ДНК-последовательностей клонированных вставок показал, что полученные конструкторы были правильными и что в ходе ПЦР-амплификации ошибки не были внесены. Назначенные идентификационные номера для данных L28-плазмидных конструкторов (для TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и TNV196) показаны в табл. 3.

Вставки BsiWI/BstBI для тяжелых цепей TNV14, TNV148 и TNV148B переносили из вектора L28 во вновь полученный промежуточный вектор, p1750. Назначенные идентификационные номера данных промежуточных плазмид приведены в табл. 2. Этот этап клонирования и последующие этапы не выполняли для TNV15 и TNV196. Вариательные области впоследствии переносили в два разных человеческих вектора экспрессии IgG1. Для переноса вариательных областей в ранее использованный вектор IgG1, p104, от Centocor использовали рестрикционные ферменты EcoRI и HindIII. Полученные экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа Gm(f+), обозначали p1781 (TNV14), p1782 (TNV148) и p1783 (TNV148B) (см. табл. 2). Вариательные области также клонировали ближе к 5'-концу от константной области IgG1, полученной из гена 12B75 (GenPharm). Эти экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа G1m(z), также перечислены в табл. 3.

Таблица 3

Идентификационные номера плазмид для различных плазмид тяжелых и легких цепей

<u>мАт</u>	<u>Gm(f+)</u>		<u>G1m(z)</u>	
	<u>ID плазмиды</u> <u>вектора</u> <u>128</u>	<u>ID промежуточных</u> <u>плазмид</u>	<u>ID экспрессионны</u> <u>х</u> <u>плазмид</u>	<u>ID экспрессионных</u> <u>плазмид</u>
<i>Тяжелые цепи</i>				
TNV14	pl751	pl 777	pl781	p 1786
TNV15	pl 752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148	pl 753	pl778	pl 782	pl 787
TNV148 В	pl 760	pl 779	pl783	pl 788
TNV196	pl 754	(ND)	(ND)	(ND)
	<u>ID плазмиды</u> <u>вектора рBC</u>	<u>ID промежуточных</u> <u>плазмид</u>	<u>ID экспрессионных</u> <u>плазмид</u>	
<i>Легкие цепи</i>				
TNV14	pl 748	pl 755	p 1775	
TNV15	pl 748	pl 755	pl 775	
TNV148	pl 749	pl 756	pl 776	
TNV196	pl 749	pl 756	pl 776	

(ND)=не выполняли.

Вектор L28 или вектор рBC представляют собой клон исходной кДНК антитела. Вставки в данных плаزمиде переносят в неполный вектор на основе 12B75 для получения промежуточных плазмид. В результате одной дополнительной стадии переноса получают конечные экспрессионные плазмиды, которые либо внедряли в клетки после линейаризации, либо использовали для очистки вставок генов мАт перед трансфекцией клеток.

Продукты ПЦР легких цепей расщепляли рестрикционными ферментами SalI и SacII и впоследствии клонировали между сайтами SalI и SacII плазмиды рBC. Две различные версии легких цепей, отличающиеся одной аминокислотой, были обозначены p1748 и p1749 (табл. 2). Анализ последовательностей ДНК подтвердил, что данные конструкторы имели правильные последовательности. Впоследствии фрагменты SalI/AflIII в p1748 и p1749 клонировали между сайтами SalI и AflIII промежуточного вектора p1746 для получения p1755 и p1756 соответственно. Эти 5'-половины генов легкой цепи затем соединяли с 3'-половинами гена путем переноса фрагментов BsiWI/AflIII из p1755 и p1756 во вновь полученный конструктор p1762 с получением конечных экспрессионных плазмид p1775 и p1776 соответственно (табл. 2).

Трансфекции клеток, скрининг и субклонирование. Всего провели 15 трансфекций клеток мышиной миеломы различными плазмидами экспрессии TNV (см. табл. 3 в разделе "Результаты и обсуждение"). Эти трансфекции различались следующим: (1) были ли клетки-хозяева Sp2/0 или 653; (2) была ли константная область тяжелой цепи кодирована предыдущим вектором IgG1 Centocor или константной областью тяжелой цепи 12B75; (3) являлось ли мАт TNV148B, TNV148, TNV14 или новой комбинацией HC/LC; (4) была ли ДНК линейаризованной плазмидой или очищенной вставкой гена антитела; и (5) наличием или отсутствием полной последовательности интрона J-C в гене тяжелой цепи. Кроме того, повторяли несколько трансфекций, чтобы повысить вероятность скрининга большого числа клонов.

Клетки Sp2/0 и 653 трансфицировали смесью ДНК тяжелой и легкой цепей (по 8-12 г каждая) путем электропорации в стандартных условиях, как описано ранее (Knight D.M. et al. (1993) Molecular Immunology 30:1443-1453). Для трансфекций с номерами 1, 2, 3 и 16 соответствующие экспрессионные плазмиды перед трансфекцией линейаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом. Например, рестрикционные ферменты SalI и NotI использовали для линейаризации TNV148B плазмиды тяжелой цепи p1783 и плазмиды легкой цепи p1776 соответственно. Для остальных трансфекций ДНК-вставки, содержащие только ген мАт, отделяли от плазмидного вектора путем расщепления плазмид тяжелой цепи с помощью BamHI и плазмид легкой цепи с помощью BsiWI и NotI. Впоследствии генные вставки мАт очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и очищающих смол Qіex. Клетки, трансфицированные очищенными вставками генов, одновременно трансфицировали 3-5 г линейаризованной плазмиды pSV2gpt (p13) в качестве источника селективного маркера. После электропорации клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты в IMDM, 15% FBS, 2 мМ глутамин и инкубировали при 37°C

в инкубаторе с 5% CO₂. Через двое суток добавляли равный объем IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамин, реагент для селекции 2X MNX (1 X MNX=0,5 г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 г/мл гипоксантина, 50 г/мл ксантина), и планшеты инкубировали в течение дополнительных 2-3 недель до образования колоний.

Клеточные супернатанты, собранные из лунок с колониями, анализировали на человеческий IgG методом твердофазного ИФА, согласно описанию. Если коротко, различные разведения супернатантов клеток инкубировали в 96-луночных планшетах для EIA, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc-фрагменту IgG и впоследствии связанный человеческий IgG обнаруживали с использованием конъюгированного с щелочной фосфатазой козьего антитела к человеческому IgG(H+L) и соответствующих цветных субстратов. Стандартные кривые, для которых в качестве стандарта использовали такое же очищенное мАт, что и измеряемое в супернатантах клеток, строили для каждого планшета EIA для проведения количественного анализа человеческого IgG в супернатантах. Клетки колоний, которые, по-видимому, продуцировали в основном человеческие IgG, пересевали в 24-луночные планшеты для дополнительного определения продукции в отработанных культурах, а затем идентифицировали наиболее продуктивные родительские клоны.

Родительские клоны с наибольшей продукцией субклонировали для идентификации субклонов с большей продукцией и для получения более гомогенной клеточной линии. На 96-луночные планшеты для культивирования тканей сеяли по одной клетке на лунку или по четыре клетки на лунку в среде IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамин, 1 X MNX и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 12-20 дней до проявления колоний. Супернатанты клеток собирали из лунок, содержащих по одной колонии на лунку, и анализировали с помощью твердофазного ИФА, как описано выше. Отобранные колонии пересевали на 24-луночные планшеты и позволяли культурам отработать, после чего идентифицировали наиболее продуктивные субклоны путем количественного определения уровней IgG человека в супернатантах. Этот процесс повторяли после второго цикла субклонирования отобранных субклонов первого цикла. В качестве клеточных линий для разработки отбирали наилучшие субклоны второго цикла.

Определение характеристик клеточных субклонов. Отбирали наилучшие субклоны второго цикла и строили кривые роста для оценки уровней продукции мАт и характеристик роста клеток. Во флаконы T75 засеивали по 1×10^5 клеток/мл в 30 мл IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамин и 1X MNX (или бессывороточной среды). Отбирали аликвоты по 300 мкл с интервалами 24 ч и определяли плотность живых клеток. Анализы продолжали до тех пор, пока число живых клеток не оказывалось менее 1×10^5 клеток/мл. Собранные аликвоты клеточных супернатантов анализировали на концентрацию присутствующих антител. Анализы методом твердофазного ИФА проводили с использованием в качестве стандартов rTNV148B или rTNV14 JG92399. Образцы инкубировали в течение 1 ч на планшетах для ИФА, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc IgG и связанное мАт, обнаруживали конъюгированным с щелочной фосфатазой козьим антителом к человеческому IgG(H+L), в разведении 1:1000.

Для двух клеточных линий также проводили анализ разных кривых роста для сравнения темпов роста в присутствии различных количеств реагента для селекции MNX. Клеточные линии C466A и C466B размораживали в среде без MNX (IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамин) и культивировали в течение двух дополнительных дней. Впоследствии обе клеточные культуры делили на три культуры, которые не содержали MNX, содержали 0,2X MNX или 1X MNX (1X MNX=0,5 г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 г/мл гипоксантина, 50 г/мл ксантина). Через день в свежие флаконы T75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 ч в течение одной недели. Аликвоты для продукции мАт не собирали. Для этих образцов вычисляли время удвоения с использованием формулы, представленной в SOP PD32.025.

Выполняли дополнительные исследования для оценки стабильности продукции мАт с течением времени. Культуры выращивали в 24-луночных планшетах в среде IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамин с реагентом для селекции MNX или без него. Культуры разделяли на свежие культуры каждый раз, когда они становились конфлюэнтными, и старым культурам давали возможность отработать. В это время отбирали аликвоту супернатанта и хранили при 4°C. Аликвоты отбирали в течение периода 55-78 дней. В конце данного периода супернатанты тестировали на количество присутствующего антитела, антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше.

Результаты и обсуждение.

Ингибирование связывания ФНО с рекомбинантным рецептором.

Проводили простой анализ связывания, чтобы определить, способны ли восемь мАт TNV, содержащихся в супернатанте клеток гибридомы, блокировать связывание ФНОα с рецептором. Концентрации мАт TNV в соответствующих супернатантах клеток сначала определяли стандартным анализом методом твердофазного ИФА на человеческий IgG. Впоследствии рекомбинантный гибридный белок рецептор ФНО p55/IgG, p55-sf2, наносили на планшеты для EIA и давали возможность ¹²⁵I-меченому ФНОα связаться с рецептором p55 в присутствии различных количеств мАт TNV. Как показано на фиг. 1, все, кроме одного (TNV122) из восьми мАт TNV, эффективно блокировали связывание ФНОα с рецептором с p55. Фактически, мАт TNV оказались более эффективными с точки зрения ингибирования связывания ФНОα, чем мАт положительного контроля, сА2, которые были добавлены в супернатант ги-

бридомы отрицательного контроля. Эти результаты были интерпретированы как показывающие, что мАт TNV блокируют биологическую активность ФНО α в клеточных анализах и *in vivo*, и, следовательно, были необходимы дополнительные анализы.

Анализ последовательности ДНК.

Подтверждение того, что РНК кодируют человеческие мАт.

В качестве первой стадии характеристики семи мАт TNV (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV148 и TNV196), которые продемонстрировали активность в плане блокирования ФНО α в анализе связывания с рецептором, из семи гибридных клеточных линий выделяли общую РНК. Впоследствии каждый образец РНК использовали для получения кДНК тяжелой или легкой цепей человеческого антитела, которая включала полную сигнальную последовательность, полную последовательность вариабельной области и часть последовательности константной области каждого мАт. Эти продукты-кДНК впоследствии амплифицировали в ПЦР-реакциях, а ПЦР-амплифицированную ДНК напрямую секвенировали без предварительного клонирования фрагментов. Секвенированная кДНК тяжелой цепи была на >90% идентична одному из пяти человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей, DP-46 (фиг. 2). Аналогичным образом секвенированные кДНК легкой цепи были на 100% или 98% идентичными одному из человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей (фиг. 3). Эти результаты подтверждали, что молекулы РНК, транскрибированные в кДНК и секвенированные, кодировали тяжелые цепи человеческого антитела и легкие цепи человеческого антитела. Следует отметить, что, поскольку вариабельные области были ПЦР-амплифицированы с использованием олигонуклеотидов, которые картируются на 5'-конце последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, первые несколько аминокислот сигнальной последовательности могут не быть фактической последовательностью исходных продуктов трансляции TNV, а представлять собой фактические последовательности рекомбинантных мАт TNV.

Уникальные нейтрализующие мАт.

Анализ последовательностей кДНК целых вариабельных областей как тяжелой, так и легкой цепей каждого мАт показали, что TNV32 идентичен TNV15, TNV118 идентичен TNV14 и TNV86 идентичен TNV148. Результаты анализа связывания с рецепторами соответствовали анализам последовательностей ДНК, т.е. и TNV86, и TNV148 были приблизительно в 4 раза более эффективными, чем и TNV118, и TNV14, в плане блокирования связывания ФНО. Следовательно, последующая работа была сфокусирована только на четырех уникальных мАт TNV, TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196.

Родство четырех мАт.

Результаты определения последовательности ДНК показали, что гены, кодирующие тяжелые цепи четырех мАт TNV, были высоко гомологичны друг другу, и, по-видимому, каждый из них происходил из одного и того же гена зародышевой линии DP-46 (фиг. 2). Кроме того, поскольку все последовательности CDR3 тяжелой цепи имеют настолько высокое сходство и одинаковую длину, а также поскольку все они используют экзон J6, очевидно, что они возникают в результате одной перестройки гена VDJ с последующими соматическими изменениями, благодаря которым каждое мАт становится уникальным. Анализы последовательностей ДНК показали, что среди четырех мАт были только два разных гена легких цепей (фиг. 3). Кодированные последовательности вариабельной области легкой цепи TNV14 и TNV15 идентичны друг другу и репрезентативной последовательности зародышевой линии из семейства Vg/38K человеческих каппа-цепей. Кодированные последовательности легкой цепи TNV148 и TNV196 идентичны друг другу, но отличаются от последовательности зародышевой линии в двух нуклеотидных положениях (фиг. 3).

Определенные аминокислотные последовательности четырех мАт выявили родство этих реальных мАт. Четыре мАт содержат четыре разные тяжелые цепи (фиг. 4), но только две разные легкие цепи (фиг. 5). Различия между последовательностями мАт TNV и последовательностями зародышевой линии в основном ограничены доменами CDR, но три тяжелые цепи мАт также отличались от последовательности зародышевой линии каркасных участков (фиг. 4). В сравнении с каркасными областями антитела, кодируемыми зародышевой линией DP-46, TNV14 было таким же, TNV15 отличалось одной аминокислотой, TNV148 отличалось двумя аминокислотами, а TNV196 отличалось тремя аминокислотами.

Клонирование кДНК, сайт-специфический мутагенез и сборка конечных экспрессионных плазмид. Клонирование кДНК. На основании последовательности ДНК ПЦР-амплифицированных вариабельных областей были заказаны новые олигонуклеотиды для выполнения еще одного цикла ПЦР-амплификации для адаптации кодирующей последовательности, клонируемой в экспрессионные векторы. В случае тяжелых цепей продукты этого второго цикла ПЦР расщепляли рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и клонировали в плазмидный вектор L28 (идентификационные номера плазмид показаны в табл. 2). В случае легких цепей продукты второго цикла ПЦР расщепляли с помощью SalI и AflII и клонировали в плазмидный вектор pBC. Впоследствии индивидуальные клоны секвенировали для подтверждения того, что их последовательности были идентичны предыдущей последовательности, полученной путем прямого секвенирования продуктов ПЦР, что позволяет выявить наиболее распространенный нуклеотид в каждом положении в потенциально гетерогенной популяции молекул.

Сайт-специфический мутагенез для изменения TNV148. Неизменно наблюдали, что мАт TNV148 и TNV196 были в четыре раза более эффективными, чем следующее по эффективности мАт (TNV14), в плане нейтрализации биологической активности ФНО α . Однако, как описано выше, каркасные последовательности тяжелой цепи TNV148 и TNV196 отличались от каркасных последовательностей зародышевой линии. Сравнение последовательности тяжелой цепи TNV148 с другими человеческими антителами показало, что множество других человеческих мАт содержит остаток Ile в положении 28 в каркасе 1 (учитывается только зрелая последовательность), в то время как в качестве остатка Pro в положении 75 в каркасе 3 использовали необычную аминокислоту в этом положении.

Аналогичное сравнение для тяжелой цепи TNV196 показывает, что три аминокислоты, которыми она отличается от последовательности зародышевой линии каркасной области 3, могут быть редкими в человеческих мАт. Существует возможность того, что из-за этих различий TNV148 и TNV196 могут стать иммуногенными при введении человеку. Поскольку антитело TNV148 имело только один рассматриваемый аминокислотный остаток, и этот остаток, как полагают, является неважным для связывания ФНО α , использовали методику сайт-специфического мутагенеза для изменения одного нуклеотида в кодирующей последовательности тяжелой цепи TNV148 (в плазмиде p1753) так, чтобы кодировать остаток Ser зародышевой линии вместо остатка Pro в положении 75. Полученная плазида названа p1760 (см. табл. 2). Полученный ген и мАт назвали TNV148B, чтобы отличать его от исходного гена TNV148 (см. фиг. 5).

Сборка конечных экспрессионных плазмид. Были подготовлены новые экспрессионные векторы антител, основанные на генах тяжелой и легкой цепей 12B75, предварительно клонированных как геномные фрагменты. Хотя были получены различные плазмиды экспрессии TNV (см. табл. 2), в каждом случае фланкирующие последовательности со стороны 5'-конца, промотор и интронный энхансер получали из соответствующих генов 12B75. В случае плазмид для экспрессии легких цепей из гена легкой цепи 12B75 также получали полный интрон J-C, кодирующую последовательность константной области, и фланкирующую последовательность со стороны 3'-конца. В случае плазмид для экспрессии тяжелых цепей, позволяющих получать конечные продуктивные клеточные линии (p1781 и p1783, см. ниже), последовательности, кодирующие константную область человеческого IgG1, получали из ранее использованного экспрессионного вектора (p104) Centocor. Важно отметить, что описанные в настоящем документе конечные продуктивные клеточные линии экспрессируют другой аллотип (Gm(f+)) мАт TNV, отличный от аллотипа исходных полученных из гибридомы мАт TNV (G1m(z)). Это связано с тем, что ген 12B75 тяжелой цепи, полученный от мышей GenPharm, кодирует остаток Arg на С-конце домена CH1, тогда как экспрессионный вектор IgG1-Centocor, p104, кодирует остаток Lys в этом положении. Были получены другие плазмиды для экспрессии тяжелых цепей (например, p1786 и p1788), в которых интрон J-C, полная последовательность, кодирующая константный участок, и фланкирующая последовательность со стороны 3'-конца были получены из гена 12B75 тяжелой цепи, но клеточные линии, трансфицированные данными генами, не были отобраны в качестве продуктивных клеточных линий. Векторы были тщательно разработаны для обеспечения одноэтапного клонирования будущих ПЦР-амплифицированных V-областей, что позволяет получить конечные экспрессионные плазмиды.

ПЦР-амплифицированную кДНК варибельной области переносили из векторов L28 или pBC в векторы промежуточной стадии на основе 12B75, которые представляли промоторную область и часть интрона J-C (идентификационные номера плазмид см. в таблице 2). Рестрикционные фрагменты, содержащие 5'-половину генов антитела, впоследствии переносили из этих векторов промежуточной стадии в конечные экспрессионные векторы, предоставляющие 3'-половину соответствующих генов с образованием конечных экспрессионных плазмид (идентификационные номера плазмид см. в табл. 2).

Трансфекции и субклонирование клеток. Экспрессионные плазмиды либо линейаризовали путем расщепления рестриктазами, либо генные вставки антител в каждой плазмиде очищали от каркасов плазмиды. Клетки мышинной миеломы Sp2/0 и 653 трансфицировали при помощи ДНК тяжелой и легкой цепей путем электропорации. Проводили пятнадцать различных трансфекций, большая часть которых была уникальной по следующим показателям: антитело, конкретные характеристики генов антитела, находились ли гены на линейаризованных цельных плаزمидях или очищенных генных вставках и по линии клеток-хозяев (сводные данные в табл. 4). Супернатанты клеток от клонов, устойчивых к микофеноловой кислоте, анализировали методом твердофазного ИФА на присутствие человеческого IgG и количественно оценивали с использованием очищенного rTNV148B для построения эталонной калибровочной кривой.

Клеточные линии с наибольшей продукцией rTNV148B.

Десять наиболее эффективно продуцирующих родительских линий 653 после rTNV148B-трансфекции 2 (продуцирующих 5-10 г/мл в отработанных 24-луночных культурах) субклонировали для скрининга на более высокопродуцирующие клеточные линии и получения более гомогенной популяции клеток. Два субклона родительской линии 2.320, 2.320-17 и 2.320-20 продуцировали приблизительно 50 г/мл в отработанных 24-луночных культурах, что представляло собой увеличение в 5 раз по сравнению с родительской линией. Второй цикл субклонирования субклонированных линий 2.320-17 и 2.320-20.

Показаны идентификационные номера плазмид тяжелой и легкой цепей, которые кодируют каждое мАт. В случае трансфекций, выполненных с использованием очищенных вставок гена мАт, в качестве источника селективного маркера gpt использовали плазмиду p13 (pSV2gpt). Константные области тяжелой цепи кодировали либо тем же экспрессионным вектором человеческого IgG1, который применяли для кодирования антитела Remicade ("старый"), либо константными областями, содержащимися в гене тяжелой цепи (GenPharm/Medarex) 12B75 ("новый"). H1/L2 означает "новое" мАт, состоящее из тяжелой цепи TNV14 и легкой цепи TNV148. Плазмиды p1783 и p1801 отличаются только тем, насколько большую часть интрона J-C содержат их гены тяжелой цепи. Справа показаны номера трансфекций, которые образуют первое число общих названий клеточных клонов. Описанные здесь линии гTNV148B-продуцирующих клеток C466 (A, B, C, D) и C467A получены из трансфекционных номеров 2 и 1 соответственно. гTNV14-продуцирующая клеточная линия C476A получена из номера 3 трансфекции.

Таблица 4

Сводные данные по трансфекциям клеток

Трансфекция Кол-во плазмид		НС		ДНК	
мАт	НС/LC/gpt	вектор	формат	Sp2/0	653
гTNV148B	1783/1776	старый	линейный	1	2
гTNV 14	1781/1775	старый	линейный	3	-
гTNV148B	1788/1776/13	новый	вставка	4,6	5,7
гTNV 14	1786/1775/13	новый	вставка	8,10	9,11
гTNV 148	1787/1776/13	новый	вставка	12	17
гH1/L2	1786/1776/13	новый	вставка	13	14
гTNV 148 B	1801/1776	старый	линейный	16	

Анализы методом твердофазного ИФА супернатантов отработанных культур в 24-луночных планшетах показали, что все эти субклоны второго цикла производили от 98 до 124 г/мл, что по меньшей мере в 2 раз превышало субклоны первого цикла. Этим 653 клеточным линиям были присвоены С-кодовые обозначения, показанные в табл. 5.

Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 из гTNV148B трансфекции 1 были субклонированы. Два цикла субклонирования родительской линии 1.73 привели к выявлению клона, продуцирующего 25 г/мл в отработанных культурах в 24-луночных культурах. Данная клеточная линия Sp2/0 была обозначена как C467A (табл. 5).

Клеточные линии с наибольшей продукцией гTNV14.

Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 после гTNV14-трансфекции 3 были субклонированы один раз. Было обнаружено, что субклон 3.27-1 является наиболее эффективным продуцентом в отработанных 24-луночных культурах с продукцией 19 г/мл. Данная клеточная линия была обозначена как C476A (табл. 5).

Таблица 5

Сводные данные по отобранным продуцирующим клеточным линиям и их С-коды

мАт	Название исходного гена	Код С	Отработанные 24-луночные	
			Клетка-хозяин	Р Экспрессия
гTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103 г/мл
	2.320-20-111	C466B	653	102 г/мл
	2.320-17-4	C466C	653	98 г/мл
	2.320-20-99	C466D	653	124 г/мл
	1.73-12-122	C467A	Sp2/0	25 г/мл
гTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19 г/мл

Первая цифра названий исходных клонов указывает на то, на какой клеточной линии проводили трансфекцию. Все описанные в настоящем документе клеточные линии с С-кодами получали путем трансфекции полными плазмидами тяжелой и легкой цепей, линейаризованными рестрикционными ферментами.

Определение характеристик субклонированных клеточных линий.

Для более точного определения характеристик роста клеточной линии и определения уровней продукции мАт в более широком масштабе проводили анализ кривых роста с использованием культур во флаконах T75. Результаты показали, что каждая из четырех клеточных линий C466 достигала пиковой плотности клеток в диапазоне от $1,0 \times 10^6$ до $1,25 \times 10^6$ клеток/мл и максимального уровня накопления мАт в диапазоне от 110 до 140 г/мл (фиг. 7). Напротив, наиболее эффективно продуцирующий субклон Sp2/0,

C467A, достигал пиковой плотности клеток $2,0 \times 10^6$ клеток/мл и максимальных уровней накопления мАт 25 г/мл (фиг. 7). Анализ кривой роста не проводили на гTNV14-продуцирующей клеточной линии C476A.

Был проведен дополнительный анализ кривой роста для сравнения темпов роста при различных концентрациях реагента для селекции МНХ. Это сравнение было сделано по последним наблюдениям, что клетки C466, культивированные в отсутствие МНХ, очевидно, быстрее растут, чем те же клетки, культивированные при нормальном количестве МНХ (1X). Поскольку цитотоксические концентрации соединений, таких как микофеноловая кислота, как правило, измеряют порядками величины, было сочтено, что использование более низкой концентрации МНХ может приводить к значимому сокращению времени удвоения клеток без ущерба для стабильности продукции мАт. Клеточные линии C466A и C466B культивировали в следующих условиях: без МНХ, с 0,2X МНХ или 1X МНХ. Подсчет живых клеток производили с интервалами 24 ч в течение 7 дней. Результаты показали зависимость от концентрации МНХ скорость роста клеток (фиг. 8). Клеточная линия C466A демонстрировала время удвоения 25,0 ч при 1X МНХ, но всего лишь 20,7 ч без МНХ. Аналогичным образом, для клеточной линии C466B время удвоения составило 32,4 ч при 1X МНХ, но составило всего 22,9 ч без МНХ. Важно отметить, что время удвоения обеих клеточных линий при 0,2X МНХ было более сходным с наблюдаемым при концентрации 1X МНХ (фиг. 8). Эти данные повышают вероятность того, что увеличения продуктивности клеток в биореакторах, для которых важным параметром является время удвоения, можно достичь при использовании меньшего количества МНХ. Однако, хотя результаты исследования стабильности (см. ниже) свидетельствуют, что клеточная линия C466D способна стабильно продуцировать гTNV148B в течение по меньшей мере 60 дней даже в отсутствие МНХ, исследование стабильности также показало более высокие уровни продукции мАт при культивировании клеток в присутствии МНХ по сравнению с отсутствием МНХ.

Для оценки продукции мАт различными клеточными линиями в течение приблизительно 60 дней проводили исследования стабильности в культурах, которые содержали или не содержали селекционный реагент МНХ. Не все клеточные линии поддерживали высокий уровень продукции мАт. Спустя всего две недели культивирования продукция у клона C466A была приблизительно на 45% меньше, чем в начале исследования. Продукция у клона C466B также существенно падала. Однако клоны C466C и C466D сохраняли довольно стабильную продукцию, причем C466D демонстрировал самые высокие абсолютные уровни продукции (фиг. 9).

Заключение.

Из начальной панели из восьми человеческих мАт против человеческого ФНО α было выбрано антитело TNV148B в соответствии с несколькими критериями, которые включали белковую последовательность и эффективность нейтрализации ФНО, а также TNV14. Получали клеточные линии, продуцирующие более 100 г/мл гTNV148B и 19 г/мл гTNV14.

Пример 5. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей с использованием однократной болюсной инъекции.

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутривенную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг.

Результаты. При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сA2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым в период 3-7 недель. Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования (см. фиг. 10).

На фиг. 11A-C представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сA2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг сA2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг сA2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг сA2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

Пример 6. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей в качестве многократных болюсных доз.

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на основании массы тела и получали внутривентральную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытуемого препарата оценивали в группах 1-6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

Результаты. При анализе массы тела как изменения относительно уровня до введения препарата значимых отличий не было выявлено. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. (см. фиг. 12.)

На фиг. 13А-С представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные, получавшие 3 мг/кг TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сА2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3-5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сА2.

Пример 7. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутривентральной болюсной дозы.

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутривентральную болюсную дозу антитела (сА2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сА2.

При анализе массы тела как изменения относительно уровня перед введением дозы препарата, все виды лечения обеспечили сходный прирост массы. Животные, получавшие либо 3, либо 5 мг/кг TNV148, либо 5 мг/кг сА2, значимо набирали массу тела в начале исследования (на 2 и 3 неделях). Только животные, получавшие TNV148, сохраняли значимый прирост массы в более поздние моменты времени. Животные, получавшие 3, так и 5 мг/кг TNV148, демонстрировали значимый прирост через 7 недель, а у животных, получавших 3 мг/кг TNV148, значимое повышение наблюдалось и через 8 недель после инъекции. (см. фиг. 14.)

На фиг. 15 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, причем 5 мг/кг сА2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1-3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сА2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сА2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами лечения (за исключением контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

Пример 8. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутривентральной болюсной дозы, со сравнением между антителом к ФНО и модифицированным антителом к ФНО.

Сравнение эффективности однократного внутривентрального введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутривентральную болюсную дозу Дульбекко=S PBS (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот набор массы был значимым на неделях 1 и 3-8 неделях. Животные, получавшие 1 мг/кг TNV148, также достигали значимого прироста массы тела на 5, 6 и 8 неделях исследования (см. фиг. 16).

На фиг. 17 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, полу-

чавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг сА2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутривенного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг сА2, не давала существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг сА2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в AI между группой, получавшей 1 мг/кг сА2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148B, в любой момент исследования.

Пример 9. Антитело к ФНО для лечения активного псориатического артрита.

Резюме.

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование голимумаба, моноклонального антитела к ФНО- α , введенного внутривенно, у субъектов с активным псориатическим артритом (PsA).

SIMPONI® (голимумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и изотипом легкой цепи каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (HC), имеющую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), имеющую SEQ ID NO: 37. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149802 до 151064 дальтон. Голимумаб связывается с человеческим фактором некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) с высокими аффинностью и специфичностью и нейтрализует биологическую активность ФНО- α .

Цели и гипотеза.

Главная цель.

Основная цель данного исследования заключается в оценке эффективности в/в введения голимумаба 2 мг/кг субъектам с активным псориатическим артритом (PsA) путем оценки уменьшения признаков и симптомов PsA.

Вторичные цели.

Вторичной целью является оценка в отношении в/в голимумаба следующего:

эффективности, связанной с улучшением псориатических кожных поражений, физической функции, связанного со здоровьем качества жизни, а также других относящихся к здоровью результатов; ингибирования прогрессирования структурного повреждения; безопасности; фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и иммуногенности.

Гипотеза.

Для достижения основной цели исследования статистическая гипотеза (альтернативная гипотеза) заключается в том, что голимумаб 2 мг/кг статистически превосходит плацебо в отношении уменьшения признаков и симптомов у субъектов с активным PsA на основании основного конечного показателя эффективности.

Основным конечным показателем этого исследования является доля субъектов, достигших 20%-ного улучшения относительно исходного уровня по критериям Американской колледжа ревматологов (ACR 20) на неделе 14. Этот критерий оценки был выбран, поскольку он хорошо принимается регулирующими органами и клиническим сообществом PsA.

Обзор схемы исследования.

Это многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 эффективности и безопасности в/в введения голимумаба по сравнению с плацебо у пациентов с активным PsA. Приблизительно 440 субъектов будут рандомизированы в приблизительно 90 исследовательских центрах. Субъекты будут случайным образом назначаться для получения в/в инфузий голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20. На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы метотрексата (MTX) (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), MTX (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24. На неделе 24 все субъекты, получавшие инфузии плацебо, будут переведены в другие группы и начнут получать в/в инфузии голимумаба.

Субъекты из группы в/в введения голимумаба будут продолжать получать в/в инфузии голимумаба. Блокировки базы данных (DBL) запланированы на неделях 24 и 60. У субъектов будут отслеживать нежелательные явления (НЯ) и серьезные нежелательные явления (СНЯ) по меньшей мере в течение 8 не-

дель после последнего введения исследуемого лечения. Окончание исследования определяют как время совершения последним субъектом посещения на неделе 60.

Популяция субъектов.

Субъектами, пригодными для исследования, будут мужчины или женщины в возрасте 18 лет или старше с PsA в течение по меньшей мере 6 месяцев перед первым введением исследуемого агента и соответствующие критериям CASPAR при скрининге. Субъекты должны иметь симптомы активного заболевания (припухлость 5 или более суставов и болезненность в 5 или более суставах) при скрининге и на исходном уровне и должны иметь уровень С-реактивного белка (СРБ) $\geq 0,6$ мг/дл. Субъекты не должны получать лечение биологическими препаратами. Субъекты могут продолжать лечение МТХ во время исследования.

Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будет проводиться в течение 6 недель до введения исследуемого агента.

Субъекты также должны удовлетворять критериям включения и исключения.

Доза и способ введения.

При начальном скрининговом посещении будет получено информированное согласие у всех субъектов, которые окажутся потенциально пригодными в соответствии с установленными протоколом критериями включения и исключения для регистрации в исследовании. При посещении для рандомизации будут выполнять повторную оценку субъектов, и при соблюдении всех установленных критериев включения и исключения субъекты будут рандомизированы для получения либо в/в инфузий голимумаба, либо в/в инфузий плацебо. Рандомизацию будут стратифицировать по географическому региону и использованию метотрексата (МТХ) на исходном уровне (да или нет).

Перед первой инфузией исследуемого агента субъекты будут случайным образом распределены в соотношении 1:1 в одну из следующих двух групп лечения:

Группа 1 (n=220): субъекты будут получать в/в инфузии плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20. Субъекты перейдут на в/в введение голимумаба в дозе 2 мг/кг на неделе 24, а затем получают препарат на неделях 24, 28, а затем каждые 8 недель.

Группа 2 (n=220): субъекты получают голимумаб в/в 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель. Субъекты получают в/в инфузию плацебо на неделе 24 для поддержания слепого режима.

На неделе 16 все субъекты в группах I и II с улучшением $< 5\%$ относительно исходного уровня как в отношении количества болезненных суставов, так и в отношении количества опухших суставов перейдут в группу раннего исключения (ЕЕ). На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы МТХ (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), МТХ (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24.

Все инфузии будут выполнены в течение 30 ± 10 мин.

Оценки эффективности/конечные показатели.

Оценки эффективности, выбранные для данного исследования, были установлены в предыдущих исследованиях биологических терапевтических агентов для лечения PsA. Сообщаемые пациентом результаты (PRO), выбранные для данного исследования, согласуются с клинически значимыми измерениями, приведенными в медицинской литературе для других исследований PsA и применимых нормативных документах США/ЕС.

Оценки ответа на лечение псориатического артрита и псориаза на лечение включают

- оценку боли субъектом;
- общую оценку заболевания субъектом;
- общую оценку заболевания врачом;
- оценивание суставов;
- показатель инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья (HAQ-DI);
- индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести (PASI);
- рентгенологическую оценку рук и ступней;
- краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36);
- оценку дактилита;
- оценку энтезита;
- Батский показатель активности анкилозирующего спондилита (BASDAI);
- модифицированный NAPSI;
- дерматологический индекс качества жизни (DLQI);
- функциональную оценку терапии хронического заболевания (FACIT), утомляемость;

опросник для оценки ограничения работоспособности (WLQ);
визуально-аналоговую шкалу (VAS) для оценки продуктивности;
опросник EuroQol-5D (EQ-5D).

Основной конечный показатель.

Основным конечным показателем данного исследования является доля субъектов, достигших ACR 20 на неделе 14.

Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ACR 20 на неделе 14 будет значимо выше в группе голимумаба по сравнению с группой плацебо.

Главные вторичные конечные показатели.

Следующие главные вторичные конечные показатели анализа перечислены в порядке их значимости, как указано ниже:

изменение относительно исходного уровня показателя HAQ-DI на неделе 14;

доля субъектов с эффектом ACR 50 на неделе 14;

доля субъектов (с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне), которые достигли ответа на лечение PASI 75 на неделе 14;

изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной ван дер Хейде шкале Шарпа (vdH-S) на неделе 24.

Оценка фармакокинетики.

Пробы крови будут собирать при определенных посещениях для оценки ФК голимумаба после в/в введения у взрослых субъектов с PsA. Если во время этого посещения вводят исследуемый агент, пробы для оценки фармакокинетики будут брать из другой руки, не той, в которой установлена инфузионная система. Во время посещений на неделях 0, 4, 12, 20, 36 и 52 будут брать 2 пробы для оценки сывороточных концентраций голимумаба: пробу 1 - непосредственно перед инфузией, а другую - через один час после завершения инфузии. Во время каждого из оставшихся посещений будут брать только 1 пробу для оценки сывороточных концентраций голимумаба, и их необходимо собирать непосредственно перед инфузией, если инфузию исследуемого агента выполняют во время этого посещения. Кроме того, будут брать случайную пробу для оценки ФК для популяционного анализа ФК между посещениями на неделе 14 и неделе 20 (но не во время посещений на неделе 14 или неделе 20); эту случайную пробу необходимо брать по меньшей мере за 24 ч перед или после инфузии исследуемого агента.

В применимые моменты времени сыворотки для измерения как концентрации голимумаба, так и антител к голимумабу будут получены из крови, взятой во время одного и того же забора.

Оценивание иммуногенности.

Для оценки иммуногенности голимумаба у взрослых субъектов с PsA будут брать пробы сыворотки для обнаружения антител к голимумабу в соответствии с графиком проведения мероприятий.

Оценка биомаркеров.

Будут брать пробы для оценки биомаркеров с получением молекулярного понимания межсубъектной вариабельности клинических результатов, чтобы выявить подгруппы населения, по-разному отвечающие на лекарственное средство. Пробы для оценки биомаркеров также можно использовать для того, чтобы решить возникающие проблемы и обеспечить более безопасное, более эффективное и, в конечном счете, индивидуализированное лечение в будущем.

Оценка фармакогеномики (ДНК).

Будет проведено исследование генома для поиска связей конкретных генов с заболеванием или ответом на лекарственное средство. Будет проведено только исследование ДНК, относящееся к голимумабу или заболеваниям, для лечения которых разработано данное лекарственное средство. В данном исследовании у предоставивших согласие субъектов будет проведен обширный фармакогеномический и/или эпигенетический анализ. Субъекты, участвующие в этой части исследования, должны подписать отдельное информированное согласие. Кроме того, субъект может отозвать такое согласие в любое время, и это не повлияет на участие в других аспектах настоящего исследования или на участие в исследовании в будущем.

При необходимости пробы крови для фармакогеномического анализа будут собраны для проведения исследований в области фармакогеномики (если это позволяют местные правила). Участие субъектов в фармакогеномическом исследовании является необязательным.

Оценки безопасности.

На основании профиля безопасности других средств против ФНО- α , а также данных о безопасности голимумаба на сегодняшний день было выявлено несколько интересующих НЯ, которые будут отслеживаться и оцениваться в данном исследовании. Они включают реакции на инфузии, патологические изменения лабораторных показателей, предназначенных для оценки гепатобилиарной системы, инфекции, включая ТБ, и злокачественные новообразования.

Статистические способы.

Для оценки сравнимости субъектов демографические данные на исходном уровне и характеристики заболевания на исходном уровне будут обобщены по группам лечения.

При использовании стратификации бинарные категориальные данные (например, доля субъектов с ответом ACR 20) будут проанализированы с использованием критерия хи-квадрат или критерия Кокрана-Мантеля-Гензеля (CMH). Непрерывные данные будут проанализированы с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Если конечные показатели будут признаны негауссовскими, будут использоваться нормальные метки Ван-дер-Вардена. Все анализы эффективности будут основаны на принципе "субъекты с назначенным лечением"; таким образом, субъектов будут анализировать в соответствии с лечением в соответствии с их рандомизированным определением, независимо от фактически полученного ими лечения.

Все статистические исследования будут выполнены на альфа-уровне 0,05 (2-сторонний). Будут использоваться как табличные, так и графические сводные данные.

Группа пациентов.

При анализе эффективности и исходных показателей пациентов будут использоваться всех субъектов с назначенным лечением (т.е. всех рандомизированных субъектов), если не указано иное. Данные по субъектам, включенным в анализы эффективности, будут обобщенно представлены согласно группам с распределенным лечением, вне зависимости от того, получали ли они назначенное лечение.

Анализ безопасности и ФК будут включать всех субъектов, которым по меньшей мере один раз ввели исследуемое лечение.

Анализ конечных показателей.

Анализ основных конечных показателей.

Основным конечным показателем является доля пациентов, достигших ответа ACR 20 на неделе 14.

Уменьшение признаков и симптомов артрита будет оцениваться сравнением доли субъектов с ответом ACR 20 на неделе 14 между группами лечения. Для этого анализа будет выполнен тест CMH со стратификацией по применению MTX (да или нет) на исходном уровне с уровнем значимости 0,05.

Процедуру переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) будут использовать для ввода пропущенных компонентов ACR при наличии у субъектов данных по меньшей мере для 1 компонента ACR на неделе 14. Если у субъектов на неделе 14 нет данных для всех компонентов ACR, они будут считаться не ответившими на лечение пациентами. Кроме того, будут применяться правила для определения неэффективности лечения.

Анализ главных вторичных конечных показателей.

Следующие анализы главных вторичных конечных показателей будут выполнены в порядке важности, описанном ниже.

1. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня показателя HAQ-DI на неделе 14 между группами лечения.

2. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов с эффектом ACR 50 на неделе 14 между группами лечения.

3. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов (с поражением псориазом $\geq 3\%$ площади поверхности тела на исходном уровне), которые достигли ответа PASI 75 на неделе 14, между группами лечения.

4. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 между группами лечения.

Чтобы поддерживать ошибку I рода между основными и главными вторичными конечными показателями, конечные показатели будут оценивать последовательно. Будет проанализирован основной конечный показатель. Если будет обнаружена статистическая значимость, то главные вторичные конечные показатели будут сравнивать в указанном выше порядке, если предыдущий главный вторичный конечный показатель является статистически значимым. Если различия в предыдущем главном вторичном конечном показателе не являются статистически значимыми, дальнейшие сравнения проводить не будут. Будут приведены номинальные значения p .

Обзор анализа безопасности.

Будут выполнены регулярные оценки безопасности. Данные о частотах возникновения и типах НЯ, СНЯ и имеющих обоснованную связь с лечением НЯ, включая реакции на инфузии и инфекции, включая туберкулез, будут обобщены по группам лечения. Будут обобщены данные о числе субъектов с патологическим изменением лабораторных параметров (гематологических и биохимических) на основании оценки токсичности NCI CTCAE. Кроме того, будут обобщены данные о числе субъектов с ANA и антителами к дцДНК и о взаимосвязи реакций на инфузии и с антителами к голимумабу.

Все анализы безопасности будут выполнены с использованием популяции всех субъектов, получавших по меньшей мере 1 дозу исследуемого агента. Анализы будут выполнены с учетом лечения, которое субъекты получали фактически.

Кроме того, графическое отображение данных (например, линейные графики) и списки субъектов также можно использовать для обобщения/представления данных.

Сокращения.

ACR - Американская коллегия ревматологов;

НЯ - нежелательное явление;

АЛТ - аланинаминотрансфераза;
 ANOVA - дисперсионный анализ;
 AS - анкилозирующий спондилит;
 АСТ - аспартатаминотрансфераза;
 BASDAI - Батский показатель активности анкилозирующего спондилита;
 БЦЖ - Бацилла Кальмета-Герена;
 BSA - площадь поверхности тела;
 CASPAR - Критерии классификации псориатического артрита;
 ЗСН - застойная сердечная недостаточность;
 СРБ - С-реактивный белок;
 DAS - индекс активности заболевания;
 DBL - блокировка базы данных;
 DIP - дистальный межфаланговый;
 DLQI - Дерматологический индекс качества жизни;
 DMARD - модифицирующие течение заболевания противоревматические препараты;
 DMC - Комитет по мониторингу данных;
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
 ЕС - Комитет по этике;
 ЭКГ - электрокардиограмма;
 eCRF - электронная индивидуальная регистрационная карта;
 EDC - электронная система регистрации данных;
 EQ-5D - EuroQol-5D;
 EQ-VAS - визуальная аналоговая шкала EQ;
 ЕС Европейский союз;
 FACIT-F Функциональная оценка терапии хронического заболевания, утомляемость;
 GCP - надлежащая клиническая практика;
 GLM - Голimumаб;
 НАQ - Опросник оценки состояния здоровья;
 ВГВ - вирус гепатита В;
 НСQ - гидроксихлорохин;
 ВГС - вирус гепатита С;
 ВИЧ - вирус иммунодефицита человека;
 IB - Брошюра исследователя;
 ICH - Международная конференция по гармонизации;
 IgG -I иммуноглобулин G1;
 IJA - независимый эксперт по оценке суставов;
 IL - интерлейкин;
 IMPACT - Многонациональное контролируемое исследование инфликсимаба при псориатическом артрите;
 IRB - Экспертный совет учреждения;
 IRC - Исследовательский центр визуализации;
 в/в - внутривенный;
 IWRS - интерактивная система веб-ответа;
 JSN - сужение суставной щели;
 мАт - моноклональное антитело;
 MCP - пястно-фаланговый;
 MCS - общий показатель психического компонента;
 MDA - минимальная активность заболевания;
 MMP-1 - матриксная металлопротеиназа-1;
 MMP-3 - матриксная металлопротеиназа-3;
 MTX - Метотрексат;
 NAPSI - индекс тяжести псориаза ногтей;
 NCI-CTCAE - Общие терминологические критерии для оценки нежелательных явлений Национального онкологического института;
 НПВС - нестероидное противовоспалительное средство;
 PASI - индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести;
 PBO - плацебо;
 PCS - общий показатель физического компонента;
 ФД - фармакодинамика;
 PIP - проксимальный межфаланговый;
 ФК - фармакокинетика;
 PRO - сообщаемый пациентом результат;

psA - псориатический артрит;
 Pts - пациенты;
 q8w - один раз в 8 недель;
 q12w - один раз в 12 недель;
 RA - ревматоидный артрит;
 RBC - эритроцит;
 RF - ревматоидный фактор;
 СНЯ - серьезное нежелательное явление;
 SAP - план статистического анализа;
 п/к - подкожное введение;
 SDC - наименьшее обнаруживаемое изменение;
 SF-36 - краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов;
 SI - Международная система единиц;
 SSZ - сульфасалазин;
 ТБ - туберкулез;
 ФНО - фактор некроза опухоли;
 TST - туберкулиновая кожная проба;
 VAS - визуальная аналоговая шкала;
 vdH-S - ван дер Хейде Шарпа;
 WBC - лейкоцит;
 WLQ - Опросник для оценки ограничения работоспособности.
 Введение.
 Химическое название и структура.

SIMPONI® (голимумаб) представляет собой человеческое моноклональное антитело (мАт) с тяжелой цепью иммуноглобулина изотипа G1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и легкой цепью изотипа каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (HC), имеющую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), имеющую SEQ ID NO: 37. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149802 до 151064 Да. Голимумаб классифицируют в соответствии с анатомо-терапевтическо-химической (АТХ) системой классификации как ингибитор ФНО- α (код АТХ: L04AB06). Голимумаб связывается с высокой аффинностью как с растворимой, так и с трансмембранной формами фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), а также ингибирует биологическую активность ФНО- α . Связывания с другими лигандами суперсемейства ФНО не наблюдали; в частности, голимумаб не связывает или не нейтрализует человеческий лимфотоксин. ФНО- α синтезируется главным образом активированными моноцитами, макрофагами и Т-клетками в виде трансмембранного белка, который самоассоциируется с образованием биоактивного гомотримера и быстро высвобождается с поверхности клетки путем протеолиза. Связывание ФНО- α с рецепторами ФНО p55 или p75 приводит к кластеризации цитоплазматических доменов рецептора и инициирует сигнализацию. Фактор некроза опухоли был идентифицирован как ключевой сигнальный цитокин, который продуцируется в ответ на различные стимулы и затем стимулирует воспалительный ответ посредством активации пути каспаза-зависимого апоптоза и транскрипционных факторов ядерного фактора (NF)- κ B и активирующего белка-1 (AP-1). Фактор некроза опухоли также модулирует иммунный ответ за счет его роли в организации иммунных клеток в зародышевых центрах. Повышенная экспрессия ФНО была связана с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит (РА), а также с спондилоартропатиями, такими как псориатический артрит (PsA) и анкилозирующий спондилит (AS), и является важным медиатором воспаления и структурного повреждения суставов, характерного для этих заболеваний.

Псориатический артрит.

Псориатический артрит представляет собой хронический воспалительный, обычно отрицательный в отношении ревматоидного фактора (RF) артрит, который связан с псориазом. Распространенность псориаза в общей популяции европейской расы составляет приблизительно 2%. PsA развивается у приблизительно 6-39% пациентов с псориазом.

Пик псориатического артрита приходится на возраст от 30 до 55 лет, и он одинаково поражает как мужчин, так и женщин. Псориатический артрит поражает периферические суставы, осевой скелет, крестцово-подвздошные суставы, ногти и места соединения сухожилий с костью и связан с псориатическими поражениями кожи. У более половины пациентов с PsA могут быть признаки эрозии на рентгеновских снимках, и тяжелая эрозивная артропатия развивается у до 40% пациентов. Псориатический артрит приводит к функциональному нарушению, снижению качества жизни и повышению смертности.

Взаимодействия между Т-клетками и моноцитами/макрофагами, которые являются первичным источником провоспалительных цитокинов, играют роль в патогенезе PsA. Повышенные уровни ФНО- α были обнаружены в суставной жидкости и тканях, а также в псориатических кожных поражениях у пациентов с PsA.

Роль ФНО- α при псориатическом артрите.

ФНО- α считается ключевым медиатором воспаления, который демонстрирует широкое разнообра-

ние функциональных активностей. Чрезмерная продукция $\text{TNF}\alpha$ приводит к процессам заболевания, связанным с воспалением, как показано у пациентов с РА и болезнью Крона. Взаимодействия между Т-клетками и моноцитами/макрофагами, которые являются первичным источником провоспалительных цитокинов, играют роль в патогенезе PsA. Повышенные уровни ФНО- α были обнаружены в суставной жидкости и тканях, а также в псориазных кожных поражениях у пациентов с PsA. Сообщалось, что лечение инфликсимабом, моноклональным антителом к $\text{TNF}\alpha$, приводит к значительному снижению числа Т-клеток в эпидермисе при псориазе и числа Т-клеток и макрофагов в синовиальной ткани у пациентов с активным PsA в течение 48 часов. Лечение инфликсимабом также значительно снижало ангиогенные факторы роста в синовиальной ткани у пациентов с PsA параллельно с резкими клиническими ответами со стороны кожи и суставов.

Показано, что биологические способы лечения, нацеленные на ФНО, включая инфликсимаб, голимумаб п/к, адалимумаб и цертолизумаб пегол, индуцируют быстрое и значимое улучшение артрита и псориаза у субъектов с активным PsA, при этом сохраняется приемлемый профиль безопасности. Эта-нерцепт, адалимумаб и цертолизумаб пегол вводят два раза в неделю, еженедельно или один раз в 2-4 недели путем п/к инъекции. Голимумаб вводят ежемесячно путем п/к инъекции. Инфликсимаб вводят в виде в/в инфузии в условиях стационара на неделях 0, 2, 6 и затем каждые 8 недель.

На фазе 3 исследования голимумаба при п/к введении в группе PsA (C0524T08) 405 субъектов с PsA, несмотря на текущую или предыдущую терапию DMARD или НПВС, рандомизировали для получения плацебо п/к, голимумаба 50 мг один раз в 4 недели или 100 мг один раз в 4 недели. Лечение голимумабом приводило к улучшению признаков и симптомов, о чем свидетельствует процент пациентов, достигших ответа ACR 20 на неделе 14: 51% (голимумаб 50 мг) по сравнению с 9% (плацебо). На неделе 24 в группе, получавшей 50 мг голимумаба, было значимо меньше рентгенографических признаков повреждений, чем в группе, получавшей плацебо, на основании измерения среднего изменения относительно исходного уровня общего количества баллов по шкале vdH-S, модифицированной для PsA. В группе, получавшей 100 мг голимумаба, на неделе 24 было продемонстрировано меньше рентгенографических признаков повреждений по сравнению с группой, получавшей плацебо, однако различие не достигало статистической значимости. Клинические улучшения у субъектов с PsA, ранее наблюдавшихся на неделе 24, сохранялись до недели 256. До недели 24 у 65 и 59% у всех пациентов, получавших лечение голимумабом и получавших плацебо соответственно, наблюдались неблагоприятные явления. Наиболее часто регистрируемыми нежелательными явлениями в группах голимумаба были назофарингит и инфекция верхних дыхательных путей. Серьезные нежелательные явления (СНЯ) фиксировали у 2% всех пациентов, получавших лечение голимумабом, и у 6% пациентов, получавших плацебо.

Хотя точная роль ФНО α в патофизиологии PsA до сих пор неясна, уже существует множество весомых доказательств того, что ингибирование ФНО α имеет большое терапевтическое преимущество при этом заболевании.

Общее обоснование исследования.

В данном исследовании оценивают безопасность и эффективность 2 мг/кг голимумаба, вводимого посредством в/в инфузии в течение 30 мин на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w; с MTX или без MTX), при лечении активного PsA.

С учетом безопасности и эффективности голимумаба при п/к введении предположили, что голимумаб при в/в введении может также иметь приемлемый профиль безопасности, соответствующий другим ингибиторам ФНО- α . Голимумаб для внутривенного (в/в) введения окончательно изучали в исследовании фазы 3 (C0524T08), результаты легли в основу одобрения голимумаба в/в для лечения РА. Исследование C0524T08 представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое 2-стороннее исследование эффективности и безопасности в/в введения голимумаба в дозе 2 мг/кг в виде инфузий, вводимых в течение 30 ± 10 мин в недели 0, 4 и после этого каждые 8 недель, у субъектов с активным РА, вне зависимости от сопутствующей терапии метотрексатом (MTX). Субъектов с активным РА, вне зависимости от приема MTX, рандомизировали для получения либо инфузий плацебо (с MTX), либо голимумаба в/в, вводимого в дозе 2 мг/кг в недели 0, 4 и каждые 8 недель (с MTX) до недели 24. С недели 24 всем субъектам начинали вводить в/в голимумаб до недели 100. Продemonстрировано, что голимумаб при в/в введении обеспечивал значительные преимущества в улучшении признаков и симптомов РА, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья, а также замедление прогрессирования структурного повреждения.

Голимумаб, вводимый внутривенно при лечении РА (C0524T08), показал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности при низкой частоте реакций на инфузии. Данное предложенное исследование фазы 3 предназначено для демонстрации эффективности и безопасности голимумаба при в/в введении для лечения субъектов с активным PsA.

Проводят оценку в/в способа введения у субъектов с PsA, поскольку доступные настоящее время ингибиторы ФНО- α для в/в введения имеют ограничения, связанные с иммуногенностью и реакциями на инфузии и для них требуется более длительное время инфузии (от 60 до 120 мин) по сравнению с предложенной длительностью инфузий голимумаба для в/в введения, составляющей 30 ± 10 мин.

Пациенты также могут предпочесть схему введения поддерживающей дозы один раз в 8 недель голимумаба в/в более частым п/к введениям. Таким образом, в/в введение голимумаба может быть важным дополнением к доступным в настоящее время способам лечения пациентов с PsA.

Режим дозирования для этого исследования составляет 2 мг/кг голимумаба, вводимого посредством в/в инфузии в течение 30±10 мин на неделях 0 и 4, а затем один раз в 8 недель (с МТХ или без него).

Цели и гипотеза.

Цели.

Главная цель.

Основная цель данного исследования заключается в оценке эффективности в/в введения голимумаба 2 мг/кг субъектам с активным PsA путем оценки уменьшения признаков и симптомов PsA.

Вторичные цели.

Вторичной целью является оценка в отношении в/в голимумаба следующего: эффективности, связанной с улучшением псориатических кожных поражений, физической функции, связанного со здоровьем качества жизни, а также других относящихся к здоровью результатов; ингибирования прогрессирования структурного повреждения; безопасности; фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и иммуногенности.

Гипотеза.

Для достижения основной цели исследования статистическая гипотеза (альтернативная гипотеза) заключается в том, что голимумаб 2 мг/кг статистически превосходит плацебо в отношении уменьшения признаков и симптомов у субъектов с активным PsA на основании основного конечного показателя эффективности. Основным конечным показателем этого исследования является доля субъектов, достигших 20%-го улучшения относительно исходного уровня по критериям Американской колледжа ревматологов (ACR 20) на неделе 14. Этот критерий оценки был выбран, поскольку он хорошо принимается регулирующими органами и клиническим сообществом PsA.

Дизайн и обоснование исследования.

Обзор схемы исследования.

Это многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 эффективности и безопасности в/в введения голимумаба по сравнению с плацебо у пациентов с активным PsA. Приблизительно 440 субъектов будут рандомизированы в приблизительно 90 исследовательских центрах. Субъекты будут случайным образом назначаться для получения в/в инфузий голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20. На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы МТХ (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), МТХ (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24.

На неделе 24 все субъекты, получавшие инфузии плацебо, будут переведены в другие группы и начнут получать в/в инфузии голимумаба на неделях 24, 28 и затем каждые 8 недель до недели 52. Субъекты из группы в/в лечения голимумабом будут получать инфузию плацебо на неделе 24 для поддержания слепого режима и продолжать получать в/в инфузии голимумаба на неделях 28 и 1 раз в 8 недель после этого до недели 52. Блокировки базы данных (DBL) запланированы на неделях 24 и 60.

У субъектов будут отслеживать НЯ и СНЯ по меньшей мере в течение 8 недель после последнего введения исследуемого лечения. Окончание исследования определяют как время совершения последним субъектом посещения на неделе 60.

Схема исследования представлена на фиг. 18.

Обоснование дизайна исследования.

Исследуемая популяция.

Целевая исследуемая популяция представляет собой ранее не получавших биологические препараты субъектов с активным PsA в течение по меньшей мере 6 месяцев, которые отвечают критериям классификации псориатического артрита (CASPAR) при скрининге.

Группы лечения, доза и интервал между введениями дозы.

Субъекты будут рандомизированы на неделе 0-1 в 2 группы лечения следующим образом:

группа 1 (n=220): в/в инфузия плацебо;

группа 2 (n=220): в/в инфузия голимумаба в дозе 2 мг/кг.

Субъекты будут случайным образом назначаться для получения в/в инфузий голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20. На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максималь-

ная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы MTX (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), MTX (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24. На неделе 24 все субъекты, получавшие инфузии плацебо, будут переведены в другие группы и начнут получать в/в инфузии голимумаба на неделях 24, 28 и затем каждые 8 недель до недели 52. Субъекты из группы в/в лечения голимумабом будут получать инфузию плацебо на неделе 24 для поддержания слепого режима и продолжать получать в/в инфузии голимумаба на неделях 28 и 1 раз в 8 недель после этого до недели 52.

Фазы исследования и продолжительность лечения.

В данном исследовании будет 4 фазы: скрининг, двойное слепое плацебо-контролируемое активное лечение и последующее наблюдение для оценки безопасности. Фаза скрининга продолжительностью до 6 недель обеспечит достаточно времени для проведения скрининговых оценок и определения пригодности для участия в исследовании. Вторая фаза исследования будет представлять собой двойную слепую плацебо-контролируемую фазу с недели 0 до недели 24. Третья фаза исследования будет представлять собой фазу активного лечения с недели 24 до недели 52. Четвертая стадия исследования будет представлять собой фазу последующего наблюдения для оценки безопасности и будет длиться 8 недель после последнего введения исследуемого агента. Последующее наблюдение для оценки безопасности позволяет осуществлять мониторинг субъекта в течение периода, эквивалентного приблизительно 5-кратному периоду полужизни голимумаба. Информация о первоначально назначенном каждому субъекту лечению не доступна ни исследовательским центрам, ни субъектам в течение 60 недель исследования. Эта продолжительность обеспечит достаточное количество времени для демонстрации эффективности и безопасности в/в введения голимумаба в качестве поддерживающей терапии при PsA.

Исследование завершится после последнего запланированного посещения последнего субъекта (посещение на неделе 60).

Контроль исследования, рандомизация и маскировка.

Рандомизацию будут применять для того, чтобы свести к минимуму ошибки при отнесении субъектов к группам лечения, повысить вероятность того, что известные и неизвестные свойства субъекта (например, демографические и исходные характеристики) будут равномерно распределены по группам лечения, и чтобы повысить надежность статистических сравнений между группами лечения. Кроме того, 2 группы исследования будут стратифицированы на основании географической области и исходного использования MTX (да или нет).

Отдельные субъекты и исследователи будут сохранять маскировку на протяжении всего исследования. Лечение в слепом режиме будет применяться для уменьшения потенциальной погрешности во время сбора данных и оценки клинических конечных показателей. В настоящем исследовании планируют две DBL на неделях 24 и 60. Первая DBL будет происходить после посещения всех субъектов на неделе 24 или прерывании участия в исследовании. Вторая DBL будет происходить либо после посещения всех субъектов на неделе 60, либо после прерывания участия в исследовании. База данных будет закрыта на неделе 24, а затем обобщенные данные будут раскрыты выбранным сотрудникам спонсора. При данной DBL данные будут раскрыты ограниченному числу сотрудников спонсора для анализа и обзора данных. Идентификационные данные персонала спонсора, который будет иметь доступ к раскрытым данным о субъектах после DBL на неделе 24, будут задокументированы перед раскрытием данных. Никому из сотрудников исследовательского центра и субъектов не будет известно о назначенном лечении, за исключением фармацевта, до DBL на неделе 60.

Оценка эффективности.

Оценки эффективности, выбранные для данного исследования, были установлены в предыдущих исследованиях биологических терапевтических агентов для лечения PsA. Сообщаемые пациентом результаты (PRO), выбранные для данного исследования, также согласуются с клинически значимыми измерениями, приведенными в медицинской литературе для других исследований PsA и применимых нормативных документах США/ЕС.

Оценки ответа на лечение псориатического артрита и псориаза на лечение включают:

- оценку боли субъектом;
- общую оценку заболевания субъектом;
- общую оценку заболевания врачом;
- оценку суставов (число опухших и болезненных суставов);
- показатель инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья (HAQ-DI);
- индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести (PASI);
- рентгеновские снимки рук и ступней;
- краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36);
- оценку дактилита;

оценку энтезита;
 Батский показатель активности анкилозирующего спондилита (BASDAI);
 модифицированный NAPS1;
 дерматологический индекс качества жизни (DLQI);
 функциональную оценку терапии хронического заболевания (FACIT), утомляемость;
 опросник для оценки ограничения работоспособности (WLQ);
 визуально-аналоговую шкалу (VAS) для оценки продуктивности;
 опросник EuroQol-5D (EQ-5D).

Популяция субъектов.

Субъектами, пригодными для исследования, будут мужчины или женщины в возрасте 18 лет или старше с диагнозом PsA в течение по меньшей мере 6 месяцев перед первым введением исследуемого агента и соответствующие критериям CASPAR при скрининге. Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будут проводить в течение 6 недель до введения исследуемого лекарственного средства. Критерии включения и исключения для регистрации в исследовании субъектов описаны в следующих 2 подразделах. При наличии вопроса о приведенных ниже критериях включения или исключения исследователю следует обращаться к соответствующему представителю спонсора до регистрации субъекта в исследовании.

Критерии включения.

Каждый потенциальный субъект должен удовлетворять всем приведенным ниже критериям для включения в исследование.

Субъект должен быть мужчиной или женщиной в возрасте 18 лет или старше.

Субъект должен быть стабильным с медицинской точки зрения на основании физического осмотра, анамнеза, основных показателей жизнедеятельности и электрокардиограммы в 12 отведениях (ЭКГ), проведенных при скрининге. Это определение должно быть зафиксировано в первичных документах субъекта и заверяется исследователем.

Субъект должен быть стабильным с медицинской точки зрения на основании клинических лабораторных анализов, проведенных при скрининге. Если результаты биохимических анализов сыворотки, включая ферменты печени или гематологию, находятся за пределами нормальных референсных диапазонов, субъекта включают только в том случае, если исследователь оценит патологические изменения или отклонения от нормы как не имеющие клинической значимости или соответствующие и обоснованные для исследуемой популяции. Это определение должно быть зафиксировано в первичных документах субъекта и заверяется исследователем. В отношении анализов, описанных в критериях включения № 5b и № 18, результаты ДОЛЖНЫ находиться в пределах разрешенных диапазонов, установленных в критериях включения № 5b и № 18.

PsA должен быть в течение по меньшей мере 6 месяцев перед первым введением исследуемого агента, и субъект должен соответствовать критериям CASPAR при скрининге.

Необходимо установить диагноз активного PsA согласно следующим критериям:

a. 5 или более опухших суставов и 5 или более болезненных суставов при скрининге и на исходном уровне;

и

b. С-реактивный белок (СРБ) $\geq 0,6$ мг/дл при скрининге.

Наличие по меньшей мере 1 из подгрупп PsA: поражение дистального межфалангового сустава, полиартрит при отсутствии ревматоидных узелков, мутилирующий артрит, асимметричный периферический артрит или спондилит с периферическим артритом.

Наличие активного бляшковидного псориаза или документально подтвержденного бляшковидного псориаза в анамнезе.

Наличие активного PsA, несмотря на текущую или ранее проводившуюся терапию DMARD и/или НПВС. Терапия DMARD определяется как прием DMARD в течение по меньшей мере 3 месяцев, либо наличие признаков непереносимости DMARD. Терапия НПВС определяется как прием НПВС в течение по меньшей мере 4 недель, либо наличие признаков непереносимости НПВС.

Перед рандомизацией женщина должна

не обладать детородным потенциалом: пременоархия; постклимактерический период (возраст > 45 лет с аменореей в течение по меньшей мере 12 месяцев); быть необратимо стерилизованными (например, перевязка маточных труб, гистерэктомия, двусторонняя сальпингэктомия); или не иметь возможности забеременеть по другим причинам;

иметь детородный потенциал и использовать высокоэффективный способ контрацепции, соответствующий местным правовым нормам в отношении применения способов контрацепции для субъектов, участвующих в клинических исследованиях, например использовать одобренные для применения пероральные, инъекционные или имплантируемые гормональные методы контрацепции; размещение внутриматочных спиралей (IUD) или внутриматочных систем (IUS); барьерные способы: презерватив со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или окклюзионный колпачок (мембрана или шеечный/вагинальный колпачок) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием;

стерилизацию мужчины-партнера (вазэктомизированный партнер должен быть единственным партнером для данного субъекта); полное воздержание (если это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни субъекта).

Женщина с детородным потенциалом должна иметь отрицательный результат исследования сыворотки на беременность (β -хорионический гонадотропин человека [β -ХГЧ]) при скрининге и отрицательный результат исследования мочи на беременность на неделе 0 перед рандомизацией.

Женщина должна дать согласие не беременеть или не становиться донором яйцеклеток (ооцитов) для искусственного оплодотворения во время исследования и в течение 4 месяцев после получения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Мужчина, находящийся в сексуальных отношениях с женщиной с детородным потенциалом и не подвергавшийся вазэктомии, должен согласиться на применение барьерного способа контрацепции, например презерватива со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или окклюзионного колпачка (мембраны или шеечного/влагалищного колпачка) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием у партнерши во время исследования и в течение 4 месяцев после последней дозы исследуемого агента. Все мужчины также не допускаются к донорству спермы во время исследования и в течение 4 месяцев после получения последней дозы исследуемого агента.

Считаются пригодными для участия в соответствии со следующими критериями скрининга туберкулеза (TB).

a. Перед скринингом в анамнезе отсутствуют латентный или активный TB. Исключение сделано для субъектов, которые имеют латентный TB в анамнезе и в настоящее время получают лечение латентного TB, начнут получать лечение латентного TB перед первым введением исследуемого агента или имеют документальное подтверждение завершения соответствующего лечения латентного TB в течение 5 лет перед первым введением исследуемого агента.

b. Отсутствуют признаки или симптомы, указывающие на активный TB, при сборе анамнеза и/или физическом осмотре.

c. В последнее время не было близкого контакта с человеком с активным TB или, при наличии такого контакта, будет выполнено направление к врачу, специализирующемуся на TB, для дополнительного обследования, и, если это необходимо, проведено надлежащее лечение латентного TB перед первым введением исследуемого агента.

d. В течение 6 недель перед первым введением исследуемого агента получен отрицательный результат теста QuantiFERON® (тест TB Gold), либо впервые получен положительный результат теста QuantiFERON® (тест TB Gold), при этом исключен активный TB, и начато соответствующее лечение латентного TB перед первым введением исследуемого агента. В течение 6 недель перед первым введением исследуемого агента дополнительно требуется отрицательный результат кожной туберкулиновой пробы (TST) или впервые полученный положительный результат TST, при этом исключен активный TB, а также начато соответствующее лечение латентного TB перед первым введением исследуемого агента, если тест QuantiFERON® (тест TB Gold) не одобрен/не зарегистрирован в этой стране или TST является обязательным согласно предписанию местных органов здравоохранения.

i. Субъекты с устойчиво неопределенными результатами теста QuantiFERON® (TB Gold) могут быть введены в исследование без лечения латентного TB, если активный TB исключен, на рентгенограмме грудной клетки не видно никаких отклонений, указывающих на TB (активный или застарелый неактивный TB), и субъект не имеет дополнительных факторов риска по TB, определенных исследователем.

ii. Тест QuantiFERON® (тест TB Gold) и TST не требуются при скрининге для субъектов с латентным TB в анамнезе, которые в настоящее время получают лечение латентного TB или у которых имеется документальное подтверждение проведенного надлежащего лечения, как описано выше; субъекты с документально подтвержденным проведением адекватного лечения, как описано выше, не нуждаются в проведении дополнительного лечения латентного TB.

e. Есть рентгенограмма грудной клетки (заднепередняя проекция), полученная в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента и с оценкой квалифицированного радиолога, без признаков текущего активного TB или старого, неактивного TB.

14. При использовании MTX субъекты должны были начинать лечение в дозе, не превышающей 25 мг/неделя, по меньшей мере за 3 месяца до первого введения исследуемого агента, и они не должны иметь серьезных токсических побочных эффектов, связанных с MTX. Способ введения и дозы метотрексата должны быть стабильными в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время MTX не используется, MTX не должен приниматься в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента.

15. При использовании НПВС или других анальгетиков для лечения PsA субъект должен получать стабильную дозу по меньшей мере в течение 2 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время НПВС или другие анальгетики не используются для лечения PsA, субъект не должен получать НПВС или другие анальгетики для лечения PsA в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента.

16. При использовании кортикостероидов для перорального применения субъект должен получать стабильную дозу, эквивалентную ≤ 10 мг преднизона/день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время кортикостероиды для перорального применения не используются, субъект не должен получать кортикостероиды для перорального применения в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента.

17. Следует избегать длительного воздействия солнечных лучей и не использовать вертикальный солярий или другие источники ультрафиолетового излучения во время исследования.

18. Результаты скрининговых лабораторных исследований находятся в пределах следующих диапазонов:

- a. гемоглобин $\geq 8,5$ г/дл;
- b. лейкоциты $\geq 3,5 \times 10^3$ /мкл;
- c. нейтрофилы $\geq 1,5 \times 10^3$ /мкл;
- d. тромбоциты $\geq 100 \times 10^3$ /мкл;
- e. сывороточный креатинин $\leq 1,5$ мг/дл;

f. уровни АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы должны превышать ВГН для лаборатории, в которой выполняется исследование, не более чем в 1,5 раза.

19. Субъект должен иметь готовность и возможность соблюдать указанные в настоящем протоколе запреты и ограничения.

20. Каждый субъект должен подписать форму информированного согласия (ICF), указывая, что понимает цели и процедуры, которые требуются для исследования, и добровольно участвует в исследовании.

21. Каждый субъект должен подписать отдельную форму информированного согласия, если согласится предоставить необязательную пробу ДНК для исследования (если это разрешено местным законодательством). Отказ от предоставления согласия на взятие необязательной пробы ДНК не исключает возможности участия субъекта в клиническом исследовании.

22. Субъект готов воздержаться от применения дополнительных видов терапии, включая аюрведическую медицину, традиционное (ые) китайское (ие) лекарственное (ые) средство (а) и иглоукалывание, в течение 2 недель перед введением первого исследуемого агента и на протяжении всего исследования.

Критерии исключения.

Любой потенциальный субъект, удовлетворяющий любому из следующих критериев, будет исключен из исследования.

1. Имеются другие воспалительные заболевания, которые могут повлиять на оценку пользы от терапии голимумабом, включая, без ограничений, РА, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку или болезнь Лайма.

2. Беременность, кормление грудью, планирование беременности или зачатия ребенка во время участия в исследовании или в течение 4 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

3. Были использованы любые биологические агенты, которые снижают уровень ФНО α , включая, без ограничений, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол.

4. Когда-либо получал тоцилизумаб.

5. Когда-либо применял цитотоксические лекарственные средства, включая хлорамбуцил, циклофосфамид, азотистый иприт или другие алкилирующие агенты.

6. Когда-либо получал натализумаб, эфализумаб или агенты, которые снижают количество В- или Т-клеток (например, ритуксимаб, алеmtузумаб или висилизумаб).

7. Когда-либо получал алефацепт.

8. Когда-либо получал абатецепт.

9. Когда-либо получал тофацитиниб или любые другие ингибиторы Янус-киназы (JAK).

10. Когда-либо получал устекинумаб.

11. Когда-либо получал терапию против IL17 (например, бродалумаб, иксекизумаб и секукинумаб).

12. Известные аллергические реакции, гиперчувствительность или непереносимость человеческих иммуноглобулинов или голимумаба или его эксципиентов.

13. Получали любые системные иммуносупрессоры или DMARD, кроме MTX, в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Лекарственные средства из этих категорий включают в себя, без ограничений, сульфасалазин (SSZ), гидроксихлорохин (HCQ), азатиоприн, циклоспорин, микофенолата мофетил, золото и пенициллинамин.

14. Получал лефлуномид в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента (независимо от того, проводили ли процедуру выведения лекарственного средства) или получал лефлуномид в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента и не прошел процедуру выведения лекарственного средства.

15. Получал любые системные лекарственные средства/терапию, которые могли повлиять на псориаз или оценку кожи (включая, без ограничений, инъекционные кортикостероиды, ретиноиды, 1,25-дигидроксивитамин Д3 и аналоги, псоралены, сульфасалазин, гидроксимочевину, производные фумаро-

вой кислоты или фототерапию) в течение 4 недель после первого введения исследуемого агента.

16. Использовал местные лекарственные средства/способы лечения, которые могли повлиять на псориаз или оценку кожи (включая, без ограничений, кортикостероиды, антралин, кальципотриен, производные витамина D для местного применения, ретиноиды, тазаротен, метоксален, триметилпсорален, пимекролимус и такролимус), в течение 2 недель после первого введения любого исследуемого агента.

17. Получал эпидуральные, внутрисуставные, в/м или в/в кортикостероиды, включая адренокортикотропный гормон, в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента.

18. В настоящее время получает литий или получал литий в течение 4 недель после первого введения исследуемого агента.

19. Получал, или ожидается, что получит любую живую вирусную или бактериальную вакцину в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, в течение исследования или в течение 3 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

20. Наличие в анамнезе или в настоящее время хронического или рецидивирующего инфекционного заболевания, включая, без ограничений, хроническую почечную инфекцию, хроническую легочную инфекцию (например, бронхоэктаз), синусит, рецидивирующую инфекцию мочевыводящих путей (например, рецидивирующий пиелонефрит), открытую, дренированную или инфицированную кожную рану или язву.

21. Наличие в анамнезе инфицирования протеза сустава или получение когда-либо антибиотиков в связи с подозрением на инфекцию протеза сустава, если этот протез не был удален или заменен.

22. Наличие в прошлом серьезной инфекции (включая, без ограничений, гепатит, пневмонию, сепсис или пиелонефрит), или госпитализация по поводу инфекции, или лечение в/в антибиотиками по поводу инфекции в течение 2 месяцев перед первым введением исследуемого агента.

23. Наличие в анамнезе активной гранулематозной инфекции, включая гистоплазмоз или кокцидиоидомикоз, перед скринингом. Информацию о пригодности к участию с наличием в анамнезе скрытого ТВ см. в критериях включения.

24. Выполненная вакцинация против бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) в течение 12 месяцев после скрининга.

25. Наличие рентгенограммы грудной клетки, полученной в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, на которой продемонстрирована аномалия, свидетельствующая о злокачественной опухоли или активной в настоящее время инфекции, включая ТВ.

26. Наличие нетуберкулезной микобактериальной инфекции или оппортунистической инфекции (например, цитомегаловирус, пневмоцистоз, аспергиллез) в течение 6 месяцев перед скринингом.

27. Наличие в настоящее время или перенесенная инфекция опоясывающего герпеса в течение 2 месяцев после первого введения исследуемого агента.

28. Субъект имеет положительный результат анализа на антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) в анамнезе, или получен положительный результат на ВИЧ при скрининге.

29. Наличие инфекции гепатита В. Субъекты должны проходить скрининг на вирус гепатита В (ВГВ). Как минимум, подразумевается исследование на HBsAg (поверхностный антиген ВГВ), антитела к HB (антитело к поверхности ВГВ) и общее количество антител к HBc (общее количество антител к ядерному антигену ВГВ).

30. Субъекты, серопозитивные по антителам к вирусу гепатита С (ВГС), если только у них нет 2 отрицательных результатов теста на РНК ВГС с интервалом 6 месяцев перед скринингом, а затем третий отрицательный результат теста на РНК ВГС при скрининге.

31. В настоящее время есть признаки или симптомы тяжелых, прогрессирующих или неконтролируемых почечных, печеночных, гематологических, желудочно-кишечных, эндокринных, легочных, сердечных, неврологических, церебральных или психических заболеваний.

32. Имеет в анамнезе или сопутствующую застойную сердечную недостаточность (ЗСН), включая контролируемую лекарственными средствами асимптоматическую ЗСН.

33. Трансплантация органа (за исключением трансплантата роговицы в течение > 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента).

34. Наличие в анамнезе лимфопролиферативного заболевания, включая лимфому, или признаков и симптомов, указывающих на возможное лимфопролиферативное заболевание, такое как лимфаденопатия необычного размера или местоположения, клинически значимая спленомегалия или моноклональная гаммопатия с неопределенной значимостью.

35. Наличие в анамнезе известных демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз или неврит зрительного нерва.

36. У субъекта имеется злокачественное новообразование в анамнезе в течение 5 лет до скрининга (исключениями являются плоскоклеточные и базальноклеточные карциномы кожи, которые были излечены без признаков рецидива в течение по меньшей мере 3 месяцев до введения первого исследуемого агента, и карцинома шейки матки in situ, которая была излечена хирургическим путем).

37. Субъект получал любые запрещенные виды терапии, сопутствующую терапию до запланированной первой дозы исследуемого лекарственного средства.

38. Субъект получал экспериментальное лекарственное средство (включая экспериментальные вакцины) в течение 5 периодов полужизни или 3 месяцев, в зависимости от того, что длиннее, или применял инвазивное экспериментальное медицинское устройство в течение 3 месяцев до запланированной первой дозы исследуемого лекарственного средства, либо в настоящее время включен в экспериментальное исследование.

39. Субъект имеет какое-либо состояние, в связи с которым, по мнению исследователя, участие не будет лучшим решением для данного субъекта (например, ухудшит благополучие) или которое может препятствовать, ограничивать или искажать указанные в протоколе оценки.

40. Субъект подвергался крупному хирургическому вмешательству (например, требующему общей анестезии) в течение 1 месяца перед скринингом, или полностью не восстановился после вмешательства, или у субъекта запланировано хирургическое вмешательство в то время, когда субъект предположительно должен будет участвовать в исследовании или в течение 1 недели после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

41. Субъект не может или не желает подвергаться множеству венепункций в связи с плохой переносимостью или отсутствием легкого доступа к венам.

42. В течение последних 3 лет у субъекта наблюдалась проблема зависимости от веществ (лекарств или алкоголя).

43. Субъект является сотрудником исследователя или исследовательского центра, непосредственно участвующим в намеченном исследовании или в других исследованиях под руководством данного исследователя или исследовательского центра, а также членом семей сотрудников или исследователя.

Запреты и ограничения.

Потенциальные субъекты должны демонстрировать готовность и способность придерживаться следующих запретов и ограничений в ходе исследования для того, чтобы иметь право на участие в нем.

1. Как гетеросексуальные ведущие половую жизнь женщины с детородным потенциалом, так и мужчины, способные зачать ребенка, должны согласиться на применение высокоэффективного способа контрацепции и продолжать применение контрацепции в течение всего исследования и в течение 4 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

2. Применение следующих лекарственных средств запрещено одновременно с в/в введением исследуемого агента:

биологические агенты, нацеленные на снижение ФНО α (включая, без ограничений, инфликсимаб, голимумаб п/к, цертолизумаб пегол, этанерцепт, йсайпу, СТ-P13 [Remsima®] и адалимумаб);

IL-1ra (анакинра);

тоцилизумаб или любой другой биологический агент, нацеленный на IL-6 или рецептор IL-6;

тофацитиниб или любой другой ингибитор JAK;

средства уменьшения числа В-клеток (например, ритуксимаб);

цитотоксические лекарственные средства, такие как циклофосфамид, хлорамбуцил, азотистый иприт, или

другие алкилирующие агенты;

абатацепт;

устекинумаб;

агенты к IL-17 (например, бродалумаб, секукинумаб и иксекизумаб);

исследуемые лекарственные средства.

3. Применение следующих лекарственных средств запрещено: системные иммуносупрессоры или DMARD (кроме MTX), включая SSZ, HCQ, азатиоприн, пероральный циклоспорин А, такролимус, микрофенолята мофетил, лефлуномид, пероральное или парентеральное золото. Единственным исключением является применение SSZ, HCQ или лефлуномида для субъектов, которые на неделе 16 соответствуют критериям раннего исключения.

4. Субъект должен согласиться не получать живую вирусную или живую бактериальную вакцину во время исследования. Субъект должен также согласиться не получать живую вакцину в течение 3 месяцев после последнего введения исследуемого агента. Субъект не должен получать вакцину против бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) в течение 12 месяцев после скрининга.

5. Субъект должен согласиться не получать какое-либо исследуемое медицинское устройство или исследуемое лекарственное средство помимо исследуемого агента для данного исследования.

6. Субъекты, получавшие НПВС, включая аспирин и селективные ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)-2, а также другие анальгетики, должны получать обычные присутствующие на рынке дозы, одобренные в стране, в которой проводится исследование. Рецепты на НПВС и другие анальгетики не следует корректировать в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого лекарственного средства и до недели 24, и их можно изменять только в том случае, если у субъекта разовьются неприемлемые побочные эффекты. После недели 24 и до недели 52 допускается однократное снижение дозы; в противном случае рецепты на НПВС и другие анальгетики могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты. На неделе 16 субъектам, кото-

рые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение НПВС или увеличить дозу НПВС.

Допускается применение местных анальгетиков, включая капсаицин и диклофенак.

7. Субъекты, получавшие перорально кортикостероиды, должны получать стабильную дозу, эквивалентную ≤ 10 мг преднизона в день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента и продолжать получать эту дозу до недели 24. После недели 24 и до недели 52 допускается однократное снижение дозы кортикостероидов для перорального применения; в противном случае доза и тип кортикостероида для перорального применения могут быть изменены по усмотрению исследователя только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты. На неделе 16 субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение кортикостероидом для перорального применения или увеличить его дозу (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная).

Эпидуральное, в/м или в/в введение кортикостероидов не допускается в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента и не допускается для лечения PsA на протяжении всего исследования. Следует прилагать все возможные усилия, чтобы избежать применения эпидуральных, в/м и в/в кортикостероидов во время исследования по любым показаниям, кроме PsA. На протяжении всего исследования не допускается длительное (> 2 недель) применение пероральных или в/в кортикостероидов по любым показаниям, кроме PsA. Краткосрочное (≤ 2 недель) применение пероральных, в/в, в/м или эпидуральных кортикостероидов по любым показаниям, кроме PsA, должно быть ограничено ситуациями, в которых, по мнению лечащего врача, не существует адекватных альтернатив.

Внутрисуставные стероиды не следует вводить в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Следует прилагать усилия, чтобы избежать внутрисуставных инъекций кортикостероидов, особенно в течение первых 24 недель исследования. Однако при необходимости субъекты могут получать до 2 инъекций кортикостероида внутрь сустава, в сухожильное влагалище или синовиальную сумку, не более чем в 2 пораженных участка в течение 60 недель исследования.

8. Использование дополнительных терапевтических средств, которые могут влиять на активность или оценку заболевания PsA, включая, без ограничений, традиционную медицину (например, китайскую медицину, иглоукалывание, аюрведическую медицину), запрещено до недели 60.

Распределение и маскировка лечения.

Пригодные для участия в исследовании субъекты будут неупорядочно распределены с применением интерактивной системы веб-ответа (IWRS) для приема фиксированной дозы голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделе 0 слепым образом. Распределение субъекта в группу лечения будет осуществляться с использованием стратифицированного способа блочной рандомизации в соотношении 1 : 1 в одну из двух групп лечения. Факторами стратификации являются географический регион и применение МТХ на исходном уровне (да или нет). Это обеспечит относительный баланс лечения для числа субъектов внутри каждого географического региона и с применением МТХ на исходном уровне.

Субъекты, распределенные в группу голимумаба, будут получать 2 мг/кг до недели 52. На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы МТХ (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), МТХ (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24.

Субъекты, распределенные для получения плацебо, начнут получать голимумаб 2 мг/кг на неделе 24 и будут получать голимумаб 2 мг/кг на неделях 24, 28 и один раз в 8 недель до недели 52. Субъекты из группы в/в введения голимумаба будут продолжать получать в/в инфузии голимумаба в той же дозе. Кроме того, субъекты в группе в/в введения голимумаба будут получать в/в плацебо на неделе 24 для сохранения слепого режима. Субъектам и исследовательским центрам не будет доступна информация об исходном распределении в группы лечения на протяжении всего исследования.

В нормальных обстоятельствах субъектам не следует раскрывать информацию о назначенном лечении до DBL на неделе 60. В противном случае сведения могут быть раскрыты только тогда, когда конкретные неотложное лечение/порядок действий зависит от информации о состоянии лечения субъекта. В чрезвычайной ситуации исследователь может узнать информацию о получаемом лечении посредством IWRS. Рекомендуется, чтобы исследователь по возможности связывался со спонсором или его представителем для обсуждения конкретной ситуации. Телефонный разговор со спонсором или его представителем будет доступен 24 ч в сутки, 7 дней в неделю. В случае раскрытия замаскированных сведений спонсор должен быть проинформирован как можно скорее. Дата и причина раскрытия маскированной информации должны быть задокументированы персоналом исследовательского центра в eCRF и в исход-

ной документации. Исследователю также рекомендуется не раскрывать сведения о назначенном исследуемом лечении сотрудникам исследовательского центра или спонсора.

Посещения субъектов, сведения которых о назначенном исследуемом лекарственном средстве были раскрыты, должны продолжаться для выполнения плановых оценок. Дальнейшее введение исследуемого агента следует обсуждать с врачом, ответственным за исследование. При DBL на неделе 24 данные будут раскрыты для анализа ограниченному числу сотрудников спонсора, при этом участие субъектов в исследовании будет продолжаться. Идентификационные данные сотрудников спонсора, которые будут иметь доступ к раскрытым данным о субъектах, будут задокументированы перед раскрытием. Информация о первоначально назначенном лечении по-прежнему будет неизвестна исследовательским центрам и субъектам до закрытия базы данных на неделе 60.

Обращение с данными, которые могут потенциально раскрыть информацию о назначенном лечении (например, концентрация исследуемого агента в сыворотке, антитела к исследуемому агенту, распределение в группу лечения и данные о получении/учете исследуемого агента), будет осуществляться с особой осторожностью, и перед раскрытием такие данные будут доступны только сотрудникам, ответственным за управление данными, для очистки данных и, если применимо, специалистам по клинической фармакологии для проведения фармакокинетических исследований и анализов на антитела к голимумабу, а также специалистам по обеспечению качества для проведения независимых аудитов лекарственного средства.

Назначенное конкретному субъекту лечение может быть раскрыто спонсору, IRB/ЕС и сотрудникам исследовательского центра для удовлетворения требованиям к отчетности.

Доза и способ введения.

Схема дозирования и маскировка.

Перед первой инфузией исследуемого агента субъекты будут случайным образом распределены в соотношении 1:1 в одну из следующих двух групп лечения:

Группа I (n=220): субъекты будут получать в/в инфузии плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20. Субъекты перейдут на в/в введение голимумаба в дозе 2 мг/кг на неделе 24, а затем получают препарат на неделях 24, 28, а затем каждые 8 недель.

Группа II (n=220): субъекты получают голимумаб в/в 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель. Субъекты получают в/в инфузию плацебо на неделе 24 для поддержания слепого режима.

Примечание. Все инфузии будут выполнены в течение 30±10 мин.

Раннее исключение.

На неделе 16 все субъекты в группах I и II с улучшением < 5% относительно исходного уровня как в отношении количества болезненных суставов, так и в отношении количества опухших суставов перейдут в группу раннего исключения в двойном слепом режиме. На неделе 16 всем субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, будет разрешено одно из следующих сопутствующих терапевтических вмешательств, выбранных исследователем: увеличение дозы принимаемого ими кортикостероида (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), дозы МТХ (максимальная общая доза 25 мг/неделя), или дозы НПВС, либо начало приема НПВС, кортикостероидов (максимальная доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная), МТХ (максимальная доза 25 мг/неделя), SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномида (максимальная доза 20 мг/день). Увеличение дозы этих лекарственных средств до стабильной дозы должно быть выполнено по отношению к субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, к посещению на неделе 24.

Введение и время введения исследуемого агента.

Все посещения после исходного уровня могут проходить на указанной неделе ±7 дней в течение всего исследования, за исключением посещений на неделе 4, неделе 12, неделе 14, неделе 16 и неделе 24, которые могут проходить на указанной неделе ±4 дня. При невозможности обследования в рекомендованное приемлемое окно, прежде чем планировать визит, необходимо связаться со спонсором.

Предшествующая и сопутствующая терапия.

Следует приложить все возможные усилия, чтобы не вносить изменений в прием сопутствующих лекарственных средств до недели 24 или в соответствии с указанным в следующих разделах. Возможно уменьшение дозы сопутствующего лекарственного средства или временное прекращение приема лекарственного средства из-за ненормальных лабораторных показателей, побочных эффектов, сопутствующих заболеваний или выполнения хирургического вмешательства, но изменения и причины изменений следует четко зафиксировать в медицинской документации субъекта.

Субъекты не должны начинать какое-либо новое лечение PsA во время исследования, за исключением субъектов на неделе 16, которые соответствуют критериям раннего исключения.

Оценка сопутствующих лекарственных средств будет проводиться при посещениях исследования, указанных в графике проведения мероприятий.

Метотрексат.

Субъектам разрешено регистрироваться в исследовании при приеме стабильных доз МТХ.

Если субъекты получают МТХ, лечение должно начинаться по меньшей мере за 3 месяца перед первым введением исследуемого агента. Способы введения и дозы ≤ 25 мг/неделя МТХ должны быть стабильными в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Рекомендуется, чтобы все субъекты, принимающие МТХ в данном исследовании, получали перорально по меньшей мере 5 мг фолата или 5 мг фолиевой кислоты еженедельно.

Субъекты, не получающие лечение МТХ, должны были прекратить лечение в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента и не должны получать МТХ до недели 60. Исключением являются субъекты, которые соответствуют критериям раннего исключения на неделе 16. На неделе 16 субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение МТХ или увеличить дозу (максимальная общая доза составляет 25 мг/неделя).

Для субъектов, начинающих лечение МТХ, постепенное увеличение дозы до стабильной должно быть завершено к посещению на неделе 24. В случае субъектов, получающих МТХ, следует прикладывать все возможные усилия, чтобы не изменять дозу и путь введения этого лекарственного средства до недели 60 исследования. Однако в случае токсичности дозу МТХ можно уменьшить. Инструкции по корректировке дозы в случае токсичности МТХ включены в файл исследовательского центра.

Кортикостероиды.

Субъекты, получавшие перорально кортикостероиды для лечения PsA, должны получать стабильную дозу, эквивалентную ≤ 10 мг преднизона в день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента, и продолжать получать эту дозу до недели 60. Субъекты, которые не получали кортикостероиды для перорального применения на исходном уровне, должны были прекратить прием кортикостероидов для перорального применения по меньшей мере за 2 недели до первого введения исследуемого агента, и они не должны получать пероральные кортикостероиды для лечения PsA до недели 60.

Исключением являются субъекты, которые соответствуют критериям раннего исключения на неделе 16. На неделе 16 субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение кортикостероидом для перорального применения или увеличить дозу (максимальная общая доза преднизона 10 мг/день или эквивалентная).

После недели 24 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы кортикостероидов для перорального применения; в противном случае доза и тип кортикостероида для перорального применения могут быть изменены по усмотрению исследователя только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

В течение всего исследования не допускается внутривенное, внутримышечное или эпидуральное введение кортикостероидов для лечения PsA.

На протяжении всего исследования не допускается длительное (> 2 недель) применение пероральных или в/в кортикостероидов по любым показаниям, кроме PsA. Краткосрочное (≤ 2 недель) применение пероральных, в/в, в/м или эпидуральных кортикостероидов по любым показаниям, кроме PsA, должно быть ограничено ситуациями, в которых, по мнению лечащего врача, не существует адекватных альтернатив. На протяжении всего исследования допускается ингаляционный, ушной, глазной, интраназальный и другие способы доставки кортикостероидов в слизистую оболочку.

Следует прилагать усилия, чтобы избежать внутрисуставных инъекций кортикостероидов, особенно в течение первых 24 недель исследования. Однако при необходимости субъекты могут получать до 2 инъекций кортикостероида внутрь сустава, в сухожильное влагалище или синовиальную сумку, не более чем в 2 пораженных участка в течение 60 недель исследования. В случае выраженной болезненности или припухлости в одном суставе предполагается, что перед выполнением внутрисуставной инъекции кортикостероида необходима оценка субъекта на наличие инфекции.

Нестероидные противовоспалительные средства и другие анальгетики.

Допускается применение стабильных доз НПВС и других анальгетиков.

Субъекты, получавшие НПВС, включая аспирин и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2, а также другие анальгетики, должны получать обычные коммерческие дозы, одобренные в стране, в которой проводится исследование, и должны получать стабильную дозу по меньшей мере за 2 недели перед первым введением исследуемого агента. До недели 24 доза и тип НПВС и других анальгетиков могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

Исключением являются субъекты, которые соответствуют критериям раннего исключения на неделе 16. На неделе 16 субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение НПВС или увеличить дозу. Для субъектов, начинающих лечение НПВС, постепенное увеличение дозы до стабильной должно быть завершено к посещению на неделе 24.

После недели 24 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы; в противном случае рецепты на НПВС и другие анальгетики могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

Допускается применение местных анальгетиков, включая капсаицин и диклофенак.

В этом исследовании аспирин считается НПВС, за исключением малых доз аспирина, назначаемых

для лечения сердечно-сосудистых или цереброваскулярных заболеваний.

Модифицирующие течение заболевания противоревматические препараты/системные иммуносупрессорные агенты.

Прием модифицирующих течение заболевания противоревматических препаратов/системных иммуносупрессорных агентов, за исключением МТХ, должен быть прекращен по меньшей мере за 4 недели перед первым введением исследуемого агента и запрещен до недели 60. Такие DMARD включают в себя, без ограничений, SSZ, HCQ, препараты золота, пеницилламин и лефлуномид. Если субъект получал лефлуномид в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, субъект должен пройти процедуру выведения лекарственного средства.

Исключением являются субъекты, которые соответствуют критериям раннего исключения. На неделе 16 субъектам, которые соответствуют критериям раннего исключения, можно один раз начать лечение SSZ (максимальная доза 3 г/день), HCQ (максимальная доза 400 мг/день) или лефлуномидом (максимальная доза 20 мг/день). Для субъектов, начинающих лечение SSZ, HCQ или лефлуномидом, постепенное увеличение дозы до стабильной должно быть завершено к посещению на неделе 24.

Запрещенные системные иммуносупрессорные лекарственные средства до недели 60 включают в себя, без ограничений, циклоспорин, такролимус, микофенолата мофетил и азатиоприн. Системные иммуносупрессоры не относятся к кортикостероидам.

Биологические агенты, цитотоксические лекарственные средства или экспериментальных агенты.

Применение биологических агентов (например, голимумаба п/к, анакинры, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, алефакета, эфализумаба, ритуксимаба, натализумаба), цитотоксических агентов (например, хлорамбуцила, циклофосфида, азотистого иприта, других алкилирующих средств) или экспериментальных лекарственных средств не допускается в течение 60 недель исследования. При использовании любого из этих лекарственных средств субъекту прекратят дальнейшие инфузии исследуемого агента.

Дополнительные виды терапии.

Применение дополнительных видов терапии, включая аюрведическую медицину, традиционные китайские лекарственные средства или немедикаментозную терапию, такую как иглоукалывание, не допускается в течение 60 недель исследования.

Местная терапия и ультрафиолетовое излучение В.

До недели 24 не допускается одновременное применение местных лекарственных средств/способов лечения псориаза (например, кортикостероидов, кератолитиков [за исключением шампуней с салициловой кислотой, применение которых допускается на протяжении всего исследования], дегтя [за исключением шампуней с дегтем, применение которых допускается на протяжении всего исследования], антралина, аналогов витамина D3 или местного такролимуса и ретиноидов).

Субъекты не должны применять шампуни, содержащие салициловую кислоту и деготь, утром перед посещением в рамках исследования. В день посещения можно использовать шампуни без содержания лекарственных средств.

После инфузии на неделе 24 можно использовать местную терапию, включая кортикостероиды, вводимые в область поражения, за исключением высокоэффективных и сверхвысокоэффективных кортикостероидов (классы I и II). Облучение УФВ или применение горизонтального солярия не разрешены до недели 60. Субъектам необходимо рекомендовать избегать длительного воздействия солнечных лучей во время исследования.

Системная терапия псориаза.

Одновременное применение системной терапии псориаза (например, псоралена с ультрафиолетовым излучением А [ПУВА], системных ретиноидов, циклоспорина или такролимуса) не допускается до недели 60. Применение системных противопсориазных терапевтических средств должно быть прекращено по меньшей мере за 4 недели перед первым введением исследуемого агента.

Оценки в рамках исследования.

Процедуры исследования.

Обзор.

Только у женщин с детородным потенциалом можно проводить дополнительные исследования слюны или мочи на беременность, если они необходимы по мнению исследователя или требуются в соответствии с местным законодательством, для определения отсутствия беременности в любое время в ходе участия субъекта в исследовании. Кроме того, дополнительные тесты на ТВ могут быть выполнены в соответствии с требованиями исследователя или местных регулирующих органов.

Все требуемые для конкретного посещения оценки PRO должны быть выполнены перед любыми анализами, процедурами или другими консультациями в рамках этого посещения, чтобы избежать влияния на восприятие субъектов. Дополнительную информацию см. в руководстве пользователя PRO.

Необходимо прилагать все возможные усилия для выполнения всех других оценок в порядке, установленном в графике проведения мероприятий, если это возможно с логистической точки зрения, и по возможности эти оценки должны выполняться одним (ими) и тем (теми) же субъектом (ами) во время каждого посещения.

У всех субъектов будут забирать сыворотку для анализа фармакодинамических маркеров и цельную кровь (для анализа экспрессии генов). На неделях 0 и 24 пробу цельной крови для анализа ДНК будут собирать только у субъектов, которые предоставили согласие на участие в необязательном фармакогеномическом (ДНК) компоненте исследования. Пробы крови для анализов ДНК будут собраны только в том случае, если это разрешено местным законодательством. Подробные сведения о сборе и обращении с пробам крови для фармакогеномического исследования см. в лабораторном справочном руководстве по процедурам сбора и транспортировки проб. В случае неудачного извлечения ДНК у субъекта можно запросить еще одну пробу крови для фармакогеномического исследования. Для получения дополнительной пробы потребуется подписанное информированное согласие.

Общий объем крови, отобранной в данном исследовании у каждого субъекта, будет составлять приблизительно 253 мл для основного исследования и 20 мл для необязательного анализа ДНК.

Возможен забор повторных или внеплановых образцов по соображениям безопасности или из-за технических проблем с образцами.

Фаза скрининга.

После получения письменного информированного согласия и в течение периода 6 недель перед рандомизацией будут выполнены все скрининговые оценки. Скрининговое посещение можно разделить на несколько посещений (более 1). Например, после получения информированного согласия исследователь выполнит все лабораторные анализы при первом посещении. После этого субъект продолжит выполнять остальные процедуры скрининга, только в том случае, если он подходит для участия в исследовании по результатам исследований в центральной лаборатории. Субъекты, удовлетворяющие всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, будут включены в исследование. Следует прилагать все возможные усилия для соблюдения графика проведения мероприятий для каждого субъекта. Субъекты должны предоставить отдельное письменное информированное согласие для участия в необязательном фармакогеномическом компоненте исследования.

У женщин с детородным потенциалом должен быть отрицательный результат исследования сыворотки на беременность при скрининге и отрицательный результат исследования мочи на беременность перед рандомизацией. Женщины с детородным потенциалом и мужчины, способные зачать ребенка, должны согласиться на применение высокоэффективного способа контрацепции и продолжать применение контрацепции в течение всего исследования и в течение 4 месяцев после его завершения. Способ (ы) контрацепции, используемый (ые) каждым субъектом, должен быть задокументирован.

ЭКГ в 12 отведениях будет выполняться локально при скрининге для того, чтобы в случае, если субъекту нужно будет выполнить ЭКГ во время исследования по любой причине, ЭКГ перед введением первого исследуемого агента будет доступна для сравнения с выявлением изменений.

Рентгенография грудной клетки (в заднепередней проекции [ЗП]) будет выполнена при скрининге, чтобы убедиться в отсутствии у субъекта каких-либо отклонений, указывающих на злокачественные новообразования или текущую активную инфекцию, включая ТВ. Можно использовать рентгеновский снимок грудной клетки, полученный за 3 месяца перед первым введением исследуемого агента.

Субъекты должны пройти проверку на ТВ, и оценка их анамнеза должна включать специальные вопросы относительно истории ТВ или известного профессионального или другого личного контакта с людьми с активным ТВ. Субъекту необходимо задать вопросы о предшествующих исследованиях на ТВ, включая результаты рентгенографии грудной клетки и реакции на кожные пробы с туберкулином или другие анализы на ТВ.

Субъекты с отрицательным результатом теста QuantiFERON® (TB Gold) (и отрицательным результатом TST в странах, в которых тест QuantiFERON® (TB Gold) не одобрен/не зарегистрирован, либо TST требуется местными органами здравоохранения) подходят для продолжения выполнения процедур подготовки к рандомизации. Субъекты с впервые выявленным положительным результатом теста QuantiFERON® (TB Gold) (или TST) должны пройти оценку для исключения активного ТВ и начать соответствующее лечение латентного ТВ перед введением первой дозы исследуемого агента. Исключение сделано для субъектов, которые в настоящее время получают лечение по поводу латентного ТВ без признаков активного ТВ, или у которых в анамнезе имеется латентный ТВ и задокументированное завершение надлежащего лечения по поводу латентного ТВ в течение 5 лет перед первым введением исследуемого агента. Эти субъекты не нуждаются в повторном исследовании с использованием теста QuantiFERON® (TB Gold) (или TST) во время скрининга. Надлежащее лечение латентного ТВ определяется в соответствии с национальными рекомендациями для пациентов с ослабленным иммунитетом. При отсутствии локальных национальных рекомендаций по поводу пациентов с ослабленным иммунитетом необходимо соблюдать рекомендации США или исключить субъекта из исследования. Исследователь несет ответственность за проверку правильности предыдущего лечения ТВ и обеспечение соответствующей документации.

Субъект, у которого первый результат теста QuantiFERON® (TB Gold) является неопределенным, должен пройти повторный тест. Если второй результат QuantiFERON® (TB Gold) также является неопределенным, субъект может быть введен в исследование без лечения латентного ТВ, если активный ТВ

исключен, на рентгенограмме грудной клетки не видно никаких отклонений, указывающих на ТВ (активный или застарелый неактивный ТВ), и субъект не имеет дополнительных факторов риска по ТВ, определенных исследователем. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь.

Повторное тестирование.

Повторное тестирование ненормальных скрининговых лабораторных параметров крови и концентраций СРБ, которые приводят к исключению из исследования, разрешено только один раз в рамках незапланированного посещения во время периода скрининга (для повторной оценки пригодности к участию).

Фаза лечения.

Фаза лечения включает плацебо-контролируемую и активную фазы лечения. На неделе 0 пригодные к участию субъекты будут распределены случайным образом для получения 1 из 2 вариантов лечения: голимумаб в/в 2 мг/кг или плацебо в/в.

Эффективность.

Оценки ответа на лечение псориатического артрита.

Оценивание суставов.

Каждый из 68 суставов будет оценен на наличие болезненности, и каждый из 66 суставов будет оценен на наличие припухлости (тазобедренные суставы исключены из оценки припухлости). Все суставы будут проверены во время посещений, как указано в графике проведения мероприятий.

Независимые эксперты по оценке суставов (ИЯ) с надлежащим образованием и опытом при выполнении оценок суставов будут назначены в каждом исследовательском центре для выполнения всех оценок суставов, а также оценок дактилита и энтезита. Настоятельно рекомендуется, чтобы тот же ИЯ, который выполнял оценки суставов у субъекта на исходном уровне, также выполнял оценки суставов у этого субъекта при каждом последующем посещении до недели 52.

Спонсор будет проводить обучение для каждого исследовательского центра, обозначенного ИЯ, перед скринингом первого субъекта в каждом исследовательском центре. Запасной ИЯ должен пройти обучение перед проведением оценки суставов во время посещения субъекта в рамках исследования.

Если спонсор проводил обучение ИЯ в предыдущем клиническом исследовании в течение последних 3 лет и имеется надлежащее документальное подтверждение этого обучения (сертификат), это обучение будет считаться достаточным для данного исследования; однако перед началом исследования рекомендуется провести повторное обучение. Документацию о проведенном обучении каждого ИЯ следует хранить в исследовательском центре.

Все ИЯ, выполняющие оценку суставов в исследовательском центре, должны быть записаны в журнале со списком сотрудников в исследовательском центре и должны быть внесены в исходную документацию во время каждого посещения.

После недели 24 эксперт по оценке суставов необязательно должен быть независимым. Однако рекомендуется не менять эксперта по оценке суставов в ходе исследования.

Не подлежащие оценке суставы.

Если физически невозможно оценить сустав (т.е. нельзя получить доступ к суставу из-за гипсовой повязки, сустав ампутирован, деформирован так, что невозможно выполнить его оценку), ИЯ должен только указать, что сустав "не поддается оценке". Во всех других случаях ИЯ должен оценить каждый сустав на болезненность и припухлость (тазобедренные суставы исключают из оценки припухлости). Оценку необходимо выполнять независимо от любых визуальных признаков предыдущих хирургических вмешательств (например, рубцов) или знаний о предшествующих процедурах/инъекциях в сустав субъекта (например, если субъект был пациентом ИЯ перед участием в исследовании).

Ответ на лечение по шкале Американской коллегии ревматологов.

Ответы на лечение по шкале Американской коллегии ревматологов представлены в виде числового измерения улучшения по множеству критериев оценки заболевания. Например, ответ ACR 20 определен следующим образом:

1. улучшение $\geq 20\%$ относительно исходного уровня как в отношении количества опухших суставов (66 суставов), так и количества болезненных суставов (68 суставов), и

2. улучшение $\geq 20\%$ относительно исходного уровня 3 следующих 5 оценок:

оценка боли пациентом (VAS);

общая оценка активности заболевания пациентом (VAS);

общая оценка активности заболевания врачом (VAS);

оценка физической функции пациентом по шкале HAQ-DI;

СРБ.

ACR 50, ACR 70 и ACR 90 определены схожим образом, за исключением того, что порог улучшения относительно исходного уровня составляет 50, 70 и 90% соответственно.

Оценка дактилита.

Наличие и тяжесть дактилита будут оценены на обеих руках и ногах с помощью системы оценки от 0 до 3 (0 - без дактилита, 1 - легкий дактилит, 2 - умеренный дактилит, а 3 - тяжелый дактилит).

Все оценки дактилита выполняются IJA. Спонсор проведет обучение по оценке дактилита. Документальное подтверждение этого обучения будет сохранено в файлах обучения исследовательского центра.

Оценка энтезита.

Энтезит оценивают с использованием Лидского индекса энтезита (LEI). Он разработан для оценки энтезита у субъектов, страдающих PsA, и оценки наличия или отсутствия боли при приложении локального давления к следующим местам соединения сухожилий с костью:

боковой локтевой надмыщелок, левый и правый;

медиальный бедренный мыщелок, левый и правый;

места прикрепления левого и правого ахилловых сухожилий.

Все оценки энтезита будут выполняться IJA. Спонсор проведет обучение по оценке энтезита. Документальное подтверждение этого обучения будет сохранено в файлах обучения исследовательского центра.

Оценка изображений.

Общее количество баллов по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде (vdH-S) представляет собой количество баллов по исходной vdH-S, модифицированной для оценки рентгенологических признаков повреждений при PsA путем добавления дистальных межфаланговых суставов рук и оценки деформаций по типу "карандаша в стакане" и макроскопических деформаций, связанных с остеолитом. Оценка эрозии суставов представляет собой сводную информацию о степени эрозии в 40 суставах рук и 12 суставах ног. Для каждого сустава руки подсчитывают количество баллов в зависимости от площади поверхности поражения от 0 до 5, причем 0 указывает на отсутствие эрозии, а 5 указывает на значительное уменьшение костной ткани из более чем половины образующей сустава кости. Поскольку каждая сторона сустава ноги оценивается по этой шкале, максимальный балл эрозии для сустава ноги составляет 10. Таким образом, максимальное количество баллов эрозии составляет 320. Количество баллов сужения суставной щели (JSN) суммирует тяжесть JSN в 40 суставах рук и 12 суставах ног. Оценку JSN выполняли по шкале от 0 до 4, где 0 указывает на отсутствие JSN, а 4 указывает на полное отсутствие суставной щели, костный анкилоз или полный вывих. Таким образом, максимальный балл JSN составляет 208, а 528 представляет собой наихудший возможный общий балл по модифицированной шкале vdH-S для PsA.

Во время посещений будут выполнять отдельные рентгеновские снимки рук (заднепередняя проекция) и ступней (переднезадняя проекция), поэтому для сведения к минимуму ненужного рентгеновского облучения рекомендуется выполнять рентгенографию рук и ступней после проверки на соответствие критериям включения и исключения и признания субъекта пригодным для участия в исследовании. Перед рандомизацией необходимо получить исходные рентгенограммы. Предполагается, что эти рентгенограммы можно получить приблизительно за 2 недели перед рандомизацией, чтобы было время для решения любых потенциальных проблем, связанных с качеством рентгенографии. Субъектам, соответствующим критериям раннего исключения, сделают рентгеновские снимки на неделе 16 и на неделе 24. Субъектам, не соответствующим критериям раннего исключения, сделают рентгеновские снимки на неделе 24. Всем субъектам сделают рентгеновские снимки на неделе 52. Все рентгенограммы будут сделаны ± 2 недели по отношению к запланированной дате посещения.

Субъектам, которые прекращают применение исследуемого агента до недели 52 на постоянной основе, сделают рентгенографию рук и ступней в момент прекращения применения исследуемого агента. Такую рентгенографию рук и ступней не нужно выполнять, если в течение последних 6 недель был получен другой набор рентгеновских снимков.

Рентгенограммы будут оценены центральными независимыми специалистами. Будут проводить 2 оценочных мероприятия: оценочное мероприятие 1 будет включать неделю 0, неделю 16 (для субъектов, соответствующих критериям раннего исключения) и неделю 24 (и/или посещение в связи с прекращением приема исследуемого агента до недели 24); оценочное мероприятие 2 будет включать неделю 0, неделю 24 и неделю 52, посещение в связи с прекращением сбора данных или введения исследуемого агента после недели 24, но перед неделей 52.

Подробную информацию о получении рентгеновских снимков можно найти в Руководстве по визуализации.

Индекс инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья.

Функциональное состояние субъекта будет оцениваться с помощью HAQ-DI. Данный инструмент с 20 вопросами, который оценивает степень сложности выполнения человеком задач в 8 функциональных областях (одевание, вставание, прием пищи, ходьба, гигиенические процедуры, дотягивание, хватание и повседневная деятельность). Ответы на лечение в каждой функциональной области оценивают от 0 до 3, причем 0 указывает на отсутствие трудностей, а 3 указывает на невозможность выполнения задачи в этой области (т.е. более низкие оценки указывают на лучшее функционирование). Оценивали критерии оценки и определяли ее действительность при PsA. Также было доказано, что она отвечает на изменения в заболевании субъекта. Было определено, что при PsA снижение оценки на 0,30 указывает на значимое

улучшение.

Минимальная активность заболевания.

Критерии минимальной активности заболевания (MDA) PsA включают 7 показателей оценки результата, используемых при PsA. Субъектов классифицируют как достигших MDA, если они соответствуют 5 из 7 показателей эффективности: число болезненных суставов ≤ 1 ; число опухших суставов ≤ 1 ; активность и показатель тяжести псориаза ≤ 1 или площадь поверхности тела ≤ 3 ; количество баллов по визуальной аналоговой шкале (VAS) оценки болевого синдрома пациентом составляет ≤ 15 ; общее количество баллов по шкале VAS оценки активности заболевания составляет ≤ 20 ; количество баллов по опроснику оценки состояния здоровья (HAQ) $\leq 0,5$; и болезненные точки соединения сухожилий с костью ≤ 1 .

Краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов.

Опросник для оценки состояния здоровья SF-36 для определения результата лечения в исследовании был разработан в рамках эксперимента по страхованию здоровья RAND и состоит из 8 многокомпонентных шкал:

ограничения в физическом функционировании из-за проблем со здоровьем;
ограничения в повседневной деятельности из-за проблем с физическим здоровьем;
боль в теле;
общее психологическое состояние (психологический стресс и благополучие);
ограничения в повседневной деятельности в связи с личными или эмоциональными проблемами;
ограничения в социальном функционировании из-за проблем с физическим или психическим здоровьем;

жизненный тонус (энергия и усталость);

общее восприятие состояния здоровья.

Эти шкалы оценивают от 0 до 100, причем более высокие оценки указывают на лучшее состояние здоровья. Другой алгоритм предоставляет 2 сводных балла, общий показатель физического компонента (PCS) и общий показатель психического компонента (MCS). Эти сводные баллы также масштабируются при помощи более высоких баллов, указывающих на лучшее здоровье, но оцениваются с помощью системы, основанной на нормальном уровне, в которой линейные трансформации выполняют для преобразования баллов в среднее значение 50 и стандартные отклонения 10 на основании общих норм для США. Концепции, измеряемые SF-36, не привязаны к какому-либо возрасту, заболеванию или группе лечения, что позволяет сравнивать относительную нагрузку различных заболеваний и относительную пользу различных видов лечения.

Оценки ответа на лечение псориаза.

Индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести.

PASI представляет собой систему, используемую для определения и оценки тяжести псориаза и их ответ на терапию. PASI вычисляется как числовой балл, который может находиться в диапазоне от 0 до 72. Ответ PASI 50 определяется как улучшение оценки по шкале PASI $\geq 50\%$ относительно исходного уровня; PASI 75 и PASI 90 определяются аналогичным образом.

Необходимо приложить все усилия, чтобы врач или уполномоченное им лицо, выполнившее оценки PASI для субъекта на исходном уровне, также выполнял оценку PASI для этого субъекта на всех последующих посещениях. Спонсор проведет обучение по выполнению оценки PASI. Документальное подтверждение этого обучения будет сохранено в файлах обучения исследовательского центра.

Конечные показатели.

Основной конечный показатель.

Основным конечным показателем данного исследования является доля субъектов, достигших ACR 20 на неделе 14.

Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ACR 20 на неделе 14 будет статистически значимо выше в группе голимумаба по сравнению с группой плацебо.

Главные вторичные конечные показатели.

Следующие главные вторичные конечные показатели перечислены в порядке их значимости, как указано ниже:

1. изменение относительно исходного уровня показателя HAQ-DI на неделе 14;
2. Доля субъектов, которые достигли эффекта ACR 50 на неделе 14.
3. доля субъектов (с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне), которые достигли ответа на лечение PASI 75 на неделе 14;
4. изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24.

Другие вторичные конечные показатели.

Контролируемые вторичные конечные показатели (с контролем частоты ошибок I рода для множественности).

В дополнение к основным и главным вторичным конечным показателям будут проанализированы

следующие контролируемые вторичные конечные показатели, перечислены в порядке важности, как указано ниже:

1. изменение относительно исходного уровня оценки энтезита на неделе 14 у субъектов с энтезитом на исходном уровне;
 2. изменение относительно исходного уровня оценки дактилита на неделе 14 у субъектов с дактилитом на исходном уровне;
 3. изменение относительно исходного уровня показателя SF-36 PCS на неделе 14;
 4. Доля субъектов, которые достигли эффекта ACR 50 на неделе 24.
 5. Доля субъектов, которые достигли эффекта ACR 70 на неделе 14.
 6. изменение относительно исходного уровня показателя SF-36 MCS на неделе 14.
- Для контроля на множественность вышеуказанные конечные показатели будут последовательно тестировать в вышеуказанном порядке, только если основные и все главные вторичные конечные показатели достигнут статистической значимости. В противном случае будут приведены номинальные значения p .

Другие вторичные конечные показатели включают в себя следующее.

В дополнение к основным, главным вторичным и контролируемым вторичным конечным показателям будут оцениваться следующие конечные показатели.

Конечные показатели, относящиеся к уменьшению признаков и симптомов и физической функции.

1. Доля субъектов, которые достигли эффекта ACR 20 на неделе 2.
2. Доля субъектов, достигших ответов ACR 20, ACR 50, ACR 70 и ACR 90 с течением времени.
3. Изменение относительно исходного уровня компонентов ответа ACR с течением времени.
4. Доли субъектов, которые продемонстрировали улучшения $\geq 20\%$, $\geq 50\%$, $\geq 70\%$ и $\geq 90\%$ по каждому компоненту ответа ACR с течением времени.
5. Изменение относительно исходного уровня показателя HAQ-DI с течением времени.
6. Доля субъектов, которые достигли клинически значимого улучшения, среди субъектов с PsA (улучшение $\geq 0,3$), по показателю HAQ-DI с течением времени.
7. Изменение относительно исходного уровня оценки дактилита у субъектов с дактилитом на исходном уровне и доля субъектов с пораженными дактилитом пальцами с течением времени.
8. Изменение относительно исходного уровня оценки энтезита у субъектов с энтезитом на исходном уровне и доля субъектов с энтезитом с течением времени.
9. Доля субъектов, которые достигли ответа ACR 20 на неделе 52, среди субъектов, достигших ответа ACR на неделе 24; аналогичные конечные показатели для пациентов с ответом ACR 50, 70 и 90 также будут оценены.
10. Доля субъектов, которые достигли ответа по шкале HAQ-DI (субъекты, достигшие улучшения показателя HAQ-DI $\geq 0,3$) на неделе 52, среди субъектов, достигших ответа по шкале HAQ-DI на неделе 24.

11. Доля субъектов, которые достигли MDA с течением времени.

Конечные показатели, относящиеся к кожным заболеваниям, включают в себя:

1. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне доля субъектов, которые достигли улучшения $\geq 50\%$, $\geq 75\%$, ≥ 90 и 100% по PASI относительно исходного уровня с течением времени в целом и в зависимости от использования MTX на исходном уровне.
2. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне улучшение оценки PASI с течением времени относительно исходного уровня.
3. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне доля субъектов, которые достигли ответа PASI 75 и ответа ACR 20 с течением времени.
4. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне доля субъектов, которые достигли ответа PASI 50 и улучшения DLQI ≥ 5 с течением времени.
5. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне доля субъектов, которые достигли ответа PASI 75 и ответа по модифицированной шкале PsARC с течением времени.

Конечные показатели, относящиеся к структурному повреждению суставов, включают в себя следующее.

Для конечных показателей структурного повреждения будет проведено 2 оценочных мероприятия: оценочное мероприятие 1 будет относиться к анализу на неделе 24, а оценочное мероприятие 2 будет относиться к анализам на неделе 52.

1. Доля субъектов, у которых наблюдается изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S ≤ 0 на неделе 24.
2. Изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 и неделе 52.
3. Изменение общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S с недели 0 до недели 24, с недели 24 до недели 52. Изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S в зависимости от области (руки, ноги) на неделе 24 и неделе 52.

4. Изменение относительно исходного уровня количества баллов по модифицированной шкале vdH-S в зависимости от типа повреждения (эрозия и JSN) на неделе 24 и неделе 52.

5. Число субъектов с сохранением состояния без повреждений сустава (общий балл по модифицированной шкале vdH-S равен 0, балл эрозии равен 0, или балл JSN равен 0) на исходном уровне, неделе 24 и неделе 52.

6. Число субъектов с изменением относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S ≤ 0 или $\leq 0,5$ на неделе 24 и неделе 52.

Конечные показатели, относящиеся к связанному со здоровьем качеству жизни, включают в себя:

1. Изменение относительно исходного уровня показателя PCS и показателя MCS SF-36 с течением времени.

2. Изменение относительно исходного уровня баллов по SF-36 с течением времени.

3. Доля субъектов, которые достигли улучшения по шкале SF-36 PCS ≥ 5 баллов с течением времени.

4. Доля субъектов, которые достигли улучшения по шкале SF-36 MCS ≥ 5 баллов с течением времени.

Завершение/прекращение участия в исследовании субъектом.

Завершение участия.

Субъект будет считаться завершившим исследование после выполнения оценок на неделе 60 исследования. Субъекты, преждевременно прекратившие исследуемое лечение по любой причине, не будут считаться завершившими исследование.

Прекращение применения исследуемого лечения.

Если необходимо прервать исследуемое лечение субъекта до завершения схемы лечения, это не приведет к автоматическому исключению субъекта из исследования.

Если субъект прекращает введение исследуемого агента на неделе 52 или ранее, необходимы специальные посещения для оценки эффективности и конечное посещение для оценки безопасности.

Введение исследуемого агента необходимо прекратить на постоянной основе при возникновении любой из следующих ситуаций.

Наличие беременности или планирование беременности в течение периода исследования или в течение 4 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

Реакция, приводящая к бронхоспазму со свистящим дыханием и/или одышкой, требующей применения аппарата ИВЛ, или симптоматическая гипотензия, возникающие после введения исследуемого агента.

Реакция, которая приводит к миалгии и/или арталгии, с лихорадкой и/или сыпью (указывающими на сывороточную болезнь и не отражающими признаки и симптомы других признанных клинических синдромов), возникающими в период 1-14 дней после инфузии исследуемого агента. Эти симптомы могут сопровождаться другими явлениями, включая зуд, отек на лице, руках или губах, дисфагию, уртикарию, боль в горле и/или головную боль.

Оппортунистическая инфекция.

Злокачественные опухоли, исключая немеланомный рак кожи.

ЗСН.

Демиелинизирующее заболевание.

Субъект является непригодным для участия в соответствии со следующими критериями скрининга на TB:

диагностирован активный TB;

субъект, получающий лечение латентного TB, прекращает это лечение преждевременно или не соблюдает режим терапии;

у субъекта присутствуют симптомы, указывающие на активный TB, на основании вопросов для оценки состояния и/или физического осмотра при последующем наблюдении, или субъект недавно вступил в тесный контакт с человеком с активным TB и не может или не сможет продолжать подвергаться дополнительным оценкам;

у субъекта, подвергающегося непрерывной оценке, на рентгенограмме грудной клетки присутствуют признаки текущего активного TB, и/или имеется положительный результат теста Gold QuantiFERON®-TB (и/или положительный результат пробы TST в странах, в которых тест Gold QuantiFERON®-TB не одобрен/не зарегистрирован, либо TST требуется местными органами здравоохранения), за исключением случаев, когда можно исключить активный TB и начать соответствующее лечение латентного TB перед следующим введением исследуемого агента и продолжать его до завершения исследования. Субъекты с устойчиво неопределенными результатами теста QuantiFERON® (TB Gold) могут продолжать исследование без лечения латентного TB, если активный TB исключен, на рентгенограмме грудной клетки не видно никаких отклонений, указывающих на TB (активный или застарелый неактивный TB), и субъект не имеет дополнительных факторов риска по TB, определенных исследователем. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь. Субъект, получающий лечение от латентного TB, прекращает это лечение преждевременно или

не придерживается схемы лечения;

начало приема запрещенных протоколом лекарственных препаратов.

Исследователь или медицинский наблюдатель спонсора уверен, что по причинам безопасности это в наибольшей мере соответствует интересам субъекта.

Вопрос о прекращении введения исследуемого агента необходимо рассмотреть у субъектов, у которых развилась серьезная инфекция.

Прекращение участия в исследовании.

Субъект будет исключен из исследования по любой из следующих причин:

невозможность последующего наблюдения;

отзыв согласия;

летальный исход.

В случае невозможности последующего наблюдения за субъектом персонал исследовательского центра должен приложить все целесообразные усилия, чтобы связаться с субъектом и определить причину отмены лечения/исключения из исследования. Меры, принятые для осуществления последующего наблюдения, должны быть зафиксированы в документации.

Если субъект выходит из исследования до его завершения, то причина исключения должна быть отражена в индивидуальной регистрационной карте (eCRF) и в первичном документе. Исследуемое лекарственное средство, предназначенное для выбывшего субъекта, не может быть назначено другому субъекту. Для выбывших субъектов замена не предусмотрена. Если субъект прекращает введение исследуемого агента до завершения лечения, следует выполнить оценки после лечения.

Прекращение участия в сборе дополнительных проб для научных исследований, но продолжение участия в основном исследовании.

Субъект может отозвать согласие на сбор необязательных проб, при этом он остается в исследовании. В таком случае необязательные пробы будут уничтожены. Способ уничтожения проб будет осуществляться, как описано выше.

Отказ от использования проб в будущих научных исследованиях.

Субъект может отозвать согласие на использование проб в будущих научных исследованиях. В таком случае пробы будут уничтожены после того, как они станут ненужными для клинического исследования. Подробная информация о сохранении пробы для научных исследований представлена в основной форме информированного согласия (ICF) и в отдельной ICF для необязательных проб для научных исследований.

Статистические способы.

Для суммирования большинства данных будут использовать простую описательную сводную статистику, такую как n , среднее, СО, медианное значение, межквартильный размах, минимум и максимум для непрерывных переменных, а также абсолютные значения и процентные доли для дискретных переменных.

Если не указано иное, для сравнения таких категориальных переменных, как доля субъектов, отвечающих на лечение, будет использоваться критерий хи-квадрат или критерий Кохрана-Мантеля-Гензеля (CMH), стратифицированный по использованию МТХ на исходном уровне (да/нет). В целом, если не указано иное, для анализа непрерывных переменных будет использоваться дисперсионный анализ с использованием терапии МТХ на исходном уровне в качестве фактора. Все статистические исследования будут выполнены при $\alpha=0,05$ (2-сторонний). Если конечные показатели будут признаны негауссовскими, будут использоваться нормальные метки Ван-дер-Вардена, например, изменение относительно исходного уровня баллов по шкале vdH-S. Кроме статистических анализов для обобщения/представления данных также можно использовать графическое отображение данных (например, линейные графики) и списки субъектов.

При анализе эффективности и исходных показателей пациентов будут использовать всех субъектов с назначенным лечением (т.е. всех рандомизированных субъектов), если не указано иное. Данные по субъектам, включенным в анализы эффективности, будут обобщенно представлены согласно группам с распределенным лечением, вне зависимости от того, получали ли они назначенное лечение.

Анализ безопасности и ФК будут включать всех субъектов, которым по меньшей мере один раз ввели исследуемое лечение.

Информация о субъекте.

Демографические данные субъектов (например, возраст, раса, пол, рост, вес) и исходные характеристики заболевания (например, продолжительность заболевания, количество суставов и СРБ) будут объединены по группам лечения.

Определение размера выборки.

Оценки размера выборки основаны на данных самого последнего исследования PsA спонсора с использованием биологического препарата устекинумаба (моноклональное антитело к IL12/23, разработанное спонсором). Исследование устекинумаба фазы 3 (CNTO1275PSA3001) у субъектов с активным PsA включало критерий минимального СРБ и отражало текущую популяцию с PsA. Доля ответов ACR 20 в исследовании CNTO1275PSA3001 составляла 22,8, 42,4 и 49,5% на неделе 24 в группах лечения плацебо,

устекинумабом 45 мг и 90 мг соответственно. Всего 440 субъектов, по 220 в каждой группе лечения, обеспечат 99% мощность для определения значимых различий в доле ответивших на лечение пациентов между группами лечения на неделе 14, при этом предполагается наличие ответа ACR 20 40% в группе голимумаба 2 мг/кг и 20% в группе плацебо при 2-стороннем уровне значимости 0,05 с использованием критерия хи-квадрат (табл. 6).

Таблица 6

Результаты расчетов мощности, часть субъектов с ответами ACR 20

Размер выборки на группу	Голимумаб % ACR 20 ответивших на лечение пациентов	Плацебо % ACR 20 ответивших на лечение пациентов	Дельта	Мощность (%)
220	0,25	0,10	0,15	98,7
220	0,30	0,10	0,20	> 99,9
220	0,35	0,10	0,25	> 99,9
220	0,40	0,10	0,30	> 99,9
220	0,35	0,20	0,15	94,3
220	0,40	0,20	0,20	99,6
220	0,45	0,20	0,25	> 99,9
220	0,50	0,20	0,30	> 99,9
220	0,45	0,30	0,15	90,4
220	0,50	0,30	0,20	99,1
220	0,55	0,30	0,25	> 99,9
220	0,60	0,30	0,30	> 99,9

Моделирование также выполняли в случае каждого сценария для расчета мощности для выявления значимых различий в изменении относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 (табл. 7).

На неделе 24 среднее (среднеквадратичное отклонение) изменение относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S, за исключением резко отклоняющихся значений, составило 0,92 (2,15), 0,28 (1,94) и 0,17 (1,446) в группах, получавших плацебо, устекинумаб 45 и 90 мг соответственно, исследование CNTO1275PSA3001. С учетом того, что среднее изменение относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S составляет 0,9 в группе плацебо, 0,35 в группе голимумаба 2 мг/кг, а среднеквадратичное отклонение составляет 2 для каждой группы лечения, соответственно, 440 субъектов (т.е. по 220 в группе) обеспечат мощность 90,7% для выявления значимого различия на уровне значимости 0,05 (2-сторонний).

Таблица 7

Результаты расчетов мощности, изменение относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S

Дельта	Плацебо среднее значение изменения	Голимумаб среднее изменение	Мощность (%)
0,30	0,90	0,60	40,2
0,35	0,90	0,55	52,3
0,45	0,90	0,45	75,1
0,50	0,90	0,40	84,1
0,55	0,90	0,35	90,7

0,60	0,90	0,30	94,8
0,65	0,90	0,25	97,2
0,70	0,90	0,20	98,7
0,75	0,90	0,15	99,5
0,80	0,90	0,10	99,8
0,85	0,90	0,05	99,9
0,90	0,90	0,00	> 99,9
0,95	0,90	-0,05	> 99,9
1,00	0,90	-0,10	> 99,9

Промежуточный анализ.

Промежуточный анализ выполнять не планируется. Однако независимый комитет по мониторингу данных (DMC) будет периодически проверять данные по безопасности для мониторинга безопасности субъекта.

Анализ эффективности.

Анализ основного конечного показателя.

Основным конечным показателем является доля пациентов, которые достигли ответа ACR 20 на неделе 14.

Уменьшение признаков и симптомов артрита будут оценивать путем сравнения доли субъектов, которые достигли ответа ACR 20 на неделе 14, между группами лечения. Для этого анализа будет применен критерий Кохрана-Мантеля-Гензеля (СМН) со стратификацией по применению МТХ (да или нет) на исходном уровне с уровнем значимости 0,05 (2-сторонний).

В этом основном анализе эффективности данные всех рандомизированных субъектов будут проанализированы в соответствии с группой лечения, в которую они распределены, независимо от фактического полученного лечения. Процедуру переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) будут использовать для ввода пропущенных компонентов ACR при наличии у субъектов данных по меньшей мере для 1 компонента ACR на неделе 14. Если у субъектов на неделе 14 нет данных для всех компонентов ACR, они будут считаться не ответившими на лечение пациентами. Кроме того, будут применяться правила для определения неэффективности лечения.

Можно проводить анализы чувствительности с модифицированными наборами для анализа и по различным правилам.

Кроме того, будет выполнен анализ подгрупп для оценки однородности основного конечного показателя эффективности в зависимости от демографических характеристик, исходных характеристик заболевания и принимаемых на исходном уровне лекарственных средств. При необходимости также будет выполнен анализ взаимодействия между подгруппами и группой лечения.

Анализы главных вторичных конечных показателей.

Следующие анализы главных вторичных конечных показателей будут выполнены в порядке важности, описанном ниже.

1. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня показателя HAQ-DI на неделе 14 между группами лечения.

2. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов, которые достигли ответа ACR 50 на неделе 14, между группами лечения.

3. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов (с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне), которые достигли ответа PASI 75 на неделе 14, между группами лечения.

4. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 между группами лечения.

Поскольку существует только 2 группы лечения (1 статистическое сравнение), нет необходимости в коррекции на множественность в пределах каждого конечного показателя эффективности.

Для контроля частоты ошибок I рода на множественность первый главный вторичный конечный показатель будет проверен только в том случае, если основной конечный показатель достигнет статистической значимости на уровне значимости 0,05 (2-сторонний). Последующие главные вторичные конечные показатели будут проанализированы только в том случае, если различия в основном конечном показателе и предыдущем (их) главном (ых) вторичном (ых) конечном (ых) показателе (ях) будут статистически значимыми при уровне значимости 0,05 (2-сторонний).

В анализ главного вторичного конечного показателя "изменение относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24" будет включена модифицированная популяция ИТТ, которая включает в себя всех рандомизированных субъектов, для которых доступны данные об общем балле по модифицированной шкале vdH-S относительно исходного уровня. Для замещения отсутствующих данных при подсчете рентгенологических показателей на неделе 24 будут использо-

вать метод множественного восстановления отсутствующих данных. Будут также выполнять анализ чувствительности с использованием данных рентгенографии на неделе 24 независимо от того, соответствовал ли субъект критериям раннего исключения или покинул исследование перед неделей 24.

Другие запланированные анализы эффективности.

Анализы контролируемых вторичных конечных показателей (с контролем частоты ошибок I рода на множественность).

В дополнение к анализам основного и главных вторичных конечных показателей будут выполнены следующие анализы эффективности.

1. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня оценки энтезита на неделе 14 у субъектов с энтезитом на исходном уровне между группами лечения.

2. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня оценки дактилита на неделе 14 у субъектов с дактилитом на исходном уровне между группами лечения.

3. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня SF-36 PCS на неделе 14 между группами лечения.

4. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов с эффектом ACR 50 на неделе 24 между группами лечения.

5. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов, которые достигли ответа ACR 70 на неделе 14, между группами лечения.

6. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня SF-36 MCS на неделе 14 между группами лечения.

Для контроля на множественность вышеуказанные анализы будут последовательно выполнять в вышеуказанном порядке, только если основные и главные вторичные конечные показатели достигнут статистической значимости. В противном случае будут приведены номинальные значения p .

Анализы других вторичных конечных показателей включают в себя следующее.

Анализы, относящиеся к уменьшению признаков и симптомов и физической функции.

Приведенные ниже конечные показатели будут обобщены по группам лечения. Сводные данные будут представлены во времени до недели 52, если посещение для оценки конечного показателя не указано. Сравнения между группами лечения будут проводиться во время посещений перед и на неделе 24.

1. Обобщение данных о доле субъектов, которые достигли ответа ACR 20 на неделе 2, по группам лечения и сравнение между группами.

2. Доля субъектов, достигших ответов ACR 20, ACR 50, ACR 70 и ACR 90 на неделе 24. Сводные данные будут составляться в зависимости от использования MTX на исходном уровне, а также будут представлены общие сводные данные. Кроме того, эти конечные показатели также будут суммированы с использованием наблюдаемых данных без замещения.

3. Сравнение процентного изменения относительно исходного уровня компонентов ответа ACR между группами лечения на неделе 14 и неделе 24 и представление сводных данных во времени.

4. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня показателя HAQ-DI для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделе 24.

5. Обобщение данных о долях пациентов с ответом HAQ-DI (субъекты, которые достигли повышения показателя HAQ-DI $\geq 0,3$) для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

6. Обобщение данных о процентном изменении относительно исходного уровня оценки дактилита у субъектов с дактилитом на исходном уровне и доле субъектов с пораженными дактилитом пальцами для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделе 24.

7. Обобщение данных о процентном изменении относительно исходного уровня оценки энтезита у субъектов с энтезитом на исходном уровне и доле субъектов с энтезитом для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделе 24.

8. Обобщение данных о доле субъектов, достигших ответа ACR 20 на неделе 52, среди субъектов, достигших ответа на неделе 24, по группам лечения. Схожие сводные данные будут получены для пациентов с ответами ACR 50, 70 и 90.

9. Обобщение данных о доле субъектов, достигших ответа по шкале HAQ-DI (субъекты, достигшие улучшения $\geq 0,3$ по шкале HAQ-DI) на неделе 52, среди субъектов, достигших ответа на неделе 24, по группам лечения.

10. Обобщение данных о доле субъектов, достигших MDA, для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

Анализы, относящиеся к кожным заболеваниям, включают в себя следующее.

Будут проводиться следующие анализы.

1. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне обобщение данных о доле субъектов, достигших улучшения $\geq 50\%$, $\geq 75\%$, $\geq 90\%$ и 100% по PASI относительно исходного уровня, для каждой группы лечения во времени совокупно и в зависимости от применения MTX на исходном уровне и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

2. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне обобщение данных о процентном улучшении по сравнению с исходным уровнем индекса PASI для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

3. Для субъектов с поражением кожи псориазом $\geq 3\%$ на исходном уровне обобщение данных о доле субъектов, достигших как ответа PASI 75, так и ACR 20, для каждой группы лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

Анализы, относящиеся к структурному повреждению суставов, включают в себя следующее.

Анализы на неделе 24 будут выполняться на данных оценочного мероприятия 1, а анализы на неделе 52 будут выполняться на данных из оценочного мероприятия 2.

Будут проводиться следующие анализы.

1. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов, у которых наблюдалось изменение относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S ≤ 0 на неделе 24, между группами лечения.

2. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 и неделе 52 по группам лечения и по статусу раннего исключения.

3. Сравнение данных об изменении относительно исходного уровня общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 и неделе 52 между группами лечения.

4. Обобщение данных об изменении общего количества баллов по модифицированной шкале vdH-S с недели 0 до недели 24 и с недели 24 до недели 52 по группам лечения и по статусу раннего исключения.

5. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S в зависимости от области (руки, ноги) по группам лечения и сравнение между группами лечения на неделе 24 и неделе 52.

6. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S в зависимости от типа повреждения (эрозия и JSN) по группам лечения и сравнение между группами лечения на неделе 24 и неделе 52.

7. Обобщение данных о числе субъектов с сохранением состояния без повреждений сустава (общий балл по модифицированной шкале vdH-S равен 0, балл эрозии равен 0, или балл JSN равен 0) по группам лечения и сравнение между группами лечения на неделе 24 и неделе 52.

8. Обобщение данных о числе субъектов с изменением относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S ≤ 0 или $\leq 0,5$ по группам лечения и сравнение между группами лечения на неделе 24 и неделе 52.

9. Будет представлена эмпирическая кумулятивная функция гамма-распределения изменения относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S на неделе 24 и неделе 52.

10. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S, балла эрозии и балла JSN на неделе 24 и неделе 52 по группам лечения.

Анализы, относящиеся к связанному со здоровьем качеству жизни, включают в себя следующее.

Будут проводиться следующие анализы.

1. Сравнение данных об изменении относительно исходного уровня показателя PCS и показателя MCS SF-36 на неделе 24 между группами лечения.

2. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня показателя PCS и показателя MCS SF-36 для каждой группы лечения во времени.

3. Обобщение данных об изменении относительно исходного уровня баллов шкале SF-36 по группам лечения во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

4. Обобщение данных о доле субъектов, достигших улучшения по шкале SF-36 PCS ≥ 5 баллов во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

5. Обобщение данных о доле субъектов, достигших улучшения по шкале SF-36 MCS ≥ 5 баллов во времени и сравнение между группами лечения на неделях 14 и 24.

Критерии для конечных показателей.

Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ACR 20 на неделе 14 будет статистически значимо выше в группе голимумаба по сравнению с группой плацебо.

Информация об исследуемом лекарственном средстве.

Физическое описание исследуемого лекарственного средства.

Голимумаб.

Конечный продукт во флаконе (FVP) голимумаб 50 мг для в/в введения поставляется в виде стерильного раствора для однократного применения, содержащего IgG CNTO 148, во флаконе из стекла типа I объемом 4 мл. В каждом флаконе содержится 4 мл раствора голимумаба 12,5 мг/мл в водной среде с содержанием гистидина, сорбита и полисорбата 80 при pH 5,5. Консерванты отсутствуют.

Плацебо.

Нормальный физиологический раствор будет поставляться в виде стерильной жидкости для в/в ин-

фузии в одноразовых инфузионных мешках. Консерванты отсутствуют.

Метотрексат.

Метотрексат (пероральный или инъекционный) не будет поставляться спонсором, его необходимо приобрести в коммерческой аптеке.

Лекарственные средства, назначенные при раннем исключении.

Метотрексат, НПВС, кортикостероиды, сульфасалазин, гидроксихлорохин и лефлуномид не будут поставляться спонсором, их необходимо приобрести в коммерческой аптеке.

Подготовка, обращение и хранение.

В исследовательском центре флаконы с раствором голимумаба необходимо хранить в защищенном холодильнике при температуре от 2 до 8°C (от 35,6 до 46,4°F) без замораживания и в защищенном от света месте. Следует избегать энергичного встряхивания продукта. Перед введением продукт следует визуально проверить на наличие частиц и изменение цвета. Если в растворе наблюдается изменение цвета, видимые частицы или другие инородные частицы, продукт не следует использовать.

Исследуемый агент в стеклянных флаконах будет готов к применению. Внутривенные инфузии исследуемого агента будут подготовлены фармацевтом или другим соответствующим образом лицензированным и уполномоченным персоналом, которому будет известна информация о назначенном лечении, в соответствии с весом субъекта. Фармацевт или другой соответствующим образом лицензированный и уполномоченный персонал подготовит необходимый объем исследуемого агента с использованием соответствующего числа флаконов.

Во время подготовки и введения исследуемого материала необходимо использовать асептические процедуры. Во время подготовки и введения следует избегать воздействия прямых солнечных лучей.

Результаты и вывод.

Эффективность и безопасность до недели 24 для внутривенного голимумаба у взрослых пациентов с активным псориатическим артритом.

Введение.

Исследование GO-VIBRANT представляет собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3, которое было разработано для оценки безопасности и эффективности голимумаба при внутривенном (в/в) введении у взрослых пациентов с активным PsA (ранее не получавших биологических препаратов). Ранее не получавших биологические препараты пациентов с активным PsA рандомизировали (1:1) для в/в введения голимумаба в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель или плацебо на неделях 0, 4, 12 и 20 с переходом на голимумаб на неделе 24. Основным конечным показателем был ответ ACR20 на неделе 14. Конечные показатели с контролем на множественность включали в себя ACR50, ACR70, PASI 75, изменение относительно исходного уровня HAQ-DI, энтезит, дактилит, баллы по SF-36 PCS/MCS на неделе 14; и ACR50 и изменение относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S (структурные повреждения) на неделе 24. Анализы эффективности проводили на основании рандомизированного лечения, и были зафиксированы нежелательные явления (НЯ) до недели 24. Исследователям не было известно о назначенном лечении до недели 60.

Результаты.

Рандомизировали 480 пациентов (плацебо: 239; голимумаб: 241). В исследовании были достигнуты основной конечный показатель и все контролируемые вторичные конечные показатели. На неделе 14 значимо большая доля пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, достигла ACR 20 (75,1 и 21,8%). Кроме того, лечение голимумабом приводило к значимому изменению относительно исходного уровня индекса HAQ-DI (-0,60 и -0,12), ACR50 (43,6 и 6,3%), PASI 75 (59,2 и 13,6%), ACR70 (24,5 и 2,1%), изменению относительно исходного уровня оценок энтезита и дактилита (-1,8 и -0,8, и -7,8 и -2,8 соответственно) и изменению относительно исходного уровня оценок SF-36 PCS и SF-36 MCS (8,65 и 2,69, и 5,33 и 0,97 соответственно) (все $p < 0,001$) на неделе 14. На неделе 24 значимо большая доля пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, достигла ACR 50 (53,5 и 6,3%, $p < 0,001$). На неделе 24 наблюдалось значимо меньшее прогрессирование структурного повреждения у пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, на основании изменения относительно исходного уровня общего балла по модифицированной шкале vdH-S (-0,36 и 1,95; $p < 0,001$). ACR20 был значимо выше при использовании голимумаба по сравнению с плацебо уже на неделе 2 (45,6 и 7,5%; $p < 0,001$), и 27,0% пациентов, получавших голимумаб (по сравнению с 4,2% получавших плацебо пациентов) достигали минимальной активности заболевания к неделе 14. При значимом различии в пациентах, получавших голимумаб, и пациентах, получавших плацебо, число, необходимое для достижения ACR20, составило 1,9 в ретроспективном анализе на неделе 14 (таблица). До недели 24 у 46,3% пациентов, получавших голимумаб, и 40,6% пациентов, получавших плацебо, было ≥ 1 НЯ; у 2,9% пациентов и 3,3% пациентов соответственно было ≥ 1 серьезного НЯ. Наиболее распространенным типом НЯ, возникающим в процессе лечения, была инфекция (20,0% пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с 13,8% пациентов, получавших плацебо); серьезными были только 3. До недели 24 не было зафиксировано никаких оппортунистических инфекций или случаев туберкулеза. Сообщалось о двух смертельных случаях, 2 злокачественных опухолях и 1 де-

миелинизирующем заболевании. Частота реакций на инфузии была низкой и составляла < 2%; ни одна из них не была серьезной или тяжелой.

Вывод.

У пациентов с активным PsA голимумаб в/в продемонстрировал клинически значимые и неожиданно статистически значимые улучшения в отношении активности заболевания и физической функции, устранения псориаза кожи, уменьшения дактилита и энтезита, HRQoL и ингибирования прогрессирования структурного повреждения. Голимумаб также хорошо переносился до недели 24, и профиль безопасности был согласован с другими видами терапии к ФНО, включая п/к введение голимумаба.

Таблица 8

Клинический ответ			
	Плацебо	Голимумаб 2 мг/кг	P-значения
Рандомизированные пациенты, n	239	241	
<u>Клиническая эффективность на неделе 14</u>			
ACR20, n (%)	52 (21,8%)	181 (75,1%)	p < 0,001
ACR50, n (%)	15 (6,3%)	105 (43,6%)	p < 0,001
ACR70, n (%)	5 (2,1%)	59 (24,5%)	p < 0,001
PASI 75, n (%)*	27/198 (13,6%)	116/196 (59,2%)	p < 0,001
Изменение относительно исходного уровня HAQ-DI			
n	222	233	
Среднее (CO)	-0,12 (0,47)	-0,60 (0,53)	p < 0,001
Изменение энтезита относительно исходного уровня**			
n	173	182	
Среднее (CO)	-0,8 (1,98)	-1,87 (1,75)	p < 0,001
Изменение дактилита относительно исходного уровня**			
n	115	130	
Среднее (CO)	-2,8 (7,03)	-7,8 (8,57)	p < 0,001

Минимальная активность заболевания			
MDA n/N (%)	10/239 (4,2%)	65/241 (27,0%)	p < 0,001
Число, необходимое для лечения			
NNT (95% ДИ)		1,9 (1,64, 2,18)	
<u>Клиническая эффективность на неделе 24</u>			
ACR50, n (%)	15 (6,3%)	129 (53,5%)	
<u>Данные визуализации на неделе 24</u>			
Изменение относительно исходного уровня Балла по vdH-S			
N	237	237	
Среднее (SE)	1,95 (0,264)	-0,36 (0,144)	p < 0,001
<u>HRQoL на неделе 14</u>			
Изменение относительно исходного уровня балла по SF-36 PCS			
n	222	233	
Среднее (CO)	2,69 (5,92)	8,65 (7,60)	p < 0,001
Изменение относительно исходного уровня балла по SF-36 MCS			
n	222	233	
Среднее (CO)	0,97 (7,64)	5,33 (9,95)	p < 0,001
* Среди пациентов с поражением $\geq 3\%$ BSA ** Среди пациентов с заболеванием на исходном уровне ACR - критерии Американской коллегии ревматологов; PASI - индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести; HAQ-DI - показатель инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья; ДИ - доверительный интервал; CO - среднеквадратичное отклонение; SE - стандартная ошибка; vdH-S - общий балл по модифицированной шкале Шарпа - ван дер Хейде; HRQoL - связанное со здоровьем качество жизни; SF-36 PCS/MCS - общий показатель физического/психического компонента по краткому опроснику для оценки состояния здоровья из 36 пунктов			

Таблица 9

Число субъектов, достигших ответа ACR 20 на неделе 14, стратифицированных по использованию MTX на исходном уровне; полная выборка для анализа

	Плацебо	Голимумаб 2 мг/кг
Субъекты, поддающиеся оценке по ответу ACR 20 на неделе 14 ^a	239	241
Субъекты с ответом ACR 20	52 (21,8%)	181 (75,1%)
% различия (95% ДИ) ^b		53,4 (45,80, 60,90)
значение p ^c		< 0,001
Использование MTX на исходном уровне: Да	173	163
Субъекты с ответом ACR 20	38 (22,0%)	126 (77,3%)
Использование MTX на исходном уровне: Нет	66	78
Субъекты с ответом ACR 20	14 (21,2%)	55 (70,5%)
^a ответ ACR 20 основан на замещенных данных с использованием неудачного лечения, LOCF для частичного отсутствия данных и NRI для полного отсутствия данных. ^b Доверительный интервал основан на статистическом контроле Вальда для использования MTX на исходном уровне (да, нет). ^c p-значение основано на контроле по критерию СМН для использования MTX на исходном уровне (да, нет).		

Эффективность и безопасность до недели 52 голимумаба при в/в введении у взрослых пациентов с активным псориатическим артритом и корреляция с изменениями активности заболевания и прогрессированием по данным рентгенографии.

Предпосылки создания изобретения.

Исследование GO-VIBRANT представляет собой исследование фазы 3 голимумаба при внутривенном (в/в) введении, представляющего собой моноклональное антитело к фактору некроза опухоли альфа (ФНО-α), у взрослых пациентов с активным псориатическим артритом (PsA).

Цель.

Оценка того, коррелируют ли изменения в показателях активности заболевания при PsA (DAPSA), шкале активности псориатического артрита (PASDAS), минимальной активности заболевания (MDA), очень низкой активности заболевания (VLDA) и индексе клинической активности заболевания (CDAI) с прогрессированием по данным рентгенографии.

Способы.

В данном многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании 480 ранее не получавших биопрепараты пациентов с активным PsA (≥ 5 опухших и ≥ 5 болезненных суставов, С-реактивный белок $\geq 0,6$ мг/дл, активный бляшковидный псориаз или подтвержденный документально анамнез, несмотря на лечение csDMARD и/или НПВС) получали голимумаб в/в 2 мг/кг (N=241) на неделях 0/4, а затем один раз в 8 недель или плацебо (N=239) на неделях 0/4/12/20 с последующим переходом на получение голимумаба на неделе 24. В ретроспективном анализе исследовали ассоциацию показателей активности заболевания DAPSA, PASDAS, MDA, VLDA и CDAI с прогрессированием по данным рентгенографии. Общий балл по модифицированной ван дер Хейде шкале Шарпа (vdH-S) позволял оценить прогрессирование по данным рентгенографии на неделях 0/24/52. Для частичного отсутствия данных использовали замещение путем переноса последнего наблюдения вперед, а для отсутствия данных использовали замещение не ответившим на лечение пациентом. Номинальные значения представлены без коррекции на множественность. значения P получены на основании дисперсионного анализа (ANOVA) с ранговым критерием ван дер Вардена.

Результаты.

Исходные демографические данные (табл. 10) и характеристики заболевания (табл. 11) были по существу сопоставимыми в группах лечения GLM и PBO. Средние изменения относительно исходного уровня баллов vdH-S были меньше при использовании голимумаба по сравнению с плацебо на неделе 24 (-0,36 и 1,95 соответственно, $p < 0,001$) и на неделе 52 после перехода с плацебо на голимумаб (-0,49 и 0,76). Изменения всех показателей активности заболевания, по-видимому, коррелировали с прогрессированием по данным рентгенографии (табл. 12). У пациентов, получавших голимумаб, наблюдалось меньшее прогрессирование по данным рентгенографии независимо от показателя активности заболевания. У

пациентов, получавших голимумаб, на стадии ремиссии или с низкой активностью заболевания, как правило, наблюдалась меньшая тенденция к прогрессированию по данным рентгенографии на неделе 52 по сравнению с пациентами с умеренной или высокой активностью заболевания (среднее изменение vdH-S: DAPSA ремиссия или низкая активность заболевания -0,88, умеренная активность -0,48, высокая активность заболевания 0,41). Аналогичный характер изменений наблюдался для PASDAS и CDAI (табл. 12). Независимо от уровня активности заболевания у пациентов, получавших голимумаб, в течение недель 0-52 наблюдалась тенденция к меньшему прогрессированию по данным рентгенографии по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, которые перешли на голимумаб на неделе 24 (среднее изменение vdH-S в течение недель 0-52 при лечении голимумабом по сравнению с плацебо→голимумаб: DAPSA ремиссия или низкая активность заболевания -0,88 и 1,49, умеренная активность -0,48 и 1,38, высокая активность заболевания 0,41 и 1,27).

Интересно, что у пациентов, получавших голимумаб, которые не продемонстрировали MDA или VLDA к 52 неделе, также наблюдалась меньшая тенденция к прогрессированию по данным рентгенографии по сравнению с пациентами, получавшими плацебо (среднее изменение без MDA: голимумаб 0,03 по сравнению с плацебо 1,50; $p=0,0011$; и среднее изменение без VLDA: голимумаб -0,30 по сравнению с плацебо 1,45; $p < 0,0001$).

Вывод.

В этом анализе по существу все показатели активности заболевания по существу коррелировали с прогрессированием по данным рентгенографии от исходного уровня до недели 24 и до недели 52. Более высокая активность заболевания была связана с увеличением прогрессирования по данным рентгенографии. Пациенты, получавшие лечение голимумабом, не продемонстрировавшие MDA и VLDA на неделе 52, как правило, имели меньшую тенденцию к прогрессированию по данным рентгенографии по сравнению с пациентами, получавшими от плацебо до голимумаба. Неожиданно обнаруженная способность голимумаба подавлять прогрессирование по данным рентгенографии, несмотря на отсутствие у пациентов клинической ремиссии или низкой активности заболевания, иллюстрирует пример "рассоединения" клинических результатов и прогрессирования по данным рентгенографии, наблюдаемого в других исследованиях.

Таблица 10

Исходные демографические данные*

	Плацебо (n=239)	Голимумаб 2 мг/кг (n=241)
Возраст, лет	46,7 (12,5)	45,7 (11,3)
Мужчины, n (%)	121 (50,6)	128 (53,1)
Принадлежность к белой расе, n (%)	237 (99,2)	241 (100)
ИМТ, кг/м ²	28,9 (6,2)	28,9 (6,4)
Продолжительность PsA, годы	5,3 (5,9)	6,2 (6,0)
Поражения кожи псориазом $\geq 3\%$ BSA, n (%)	198 (82,8)	196 (81,3)
Пациенты, принимающие пероральные кортикостероиды, n (%)	67 (28,0)	66 (27,4)
Преднизон или эквивалентная доза, мг/день	7,6 (2,5)	7,4 (2,6)
Пациенты, принимающие метотрексат, n (%)	173 (72,4)	163 (67,6)
Доза метотрексата, мг/неделя	14,9 (4,8)	14,8 (4,7)
ИМТ=индекс массы тела; BSA=площадь поверхности тела PsO=псориаз; CO=среднеквадратичное отклонение; * Если не указано иное, значения представляют собой среднее значение (CO)		

Таблица 11

Характеристики клинических заболеваний на исходном уровне*

	Плацебо (n=239)	Голимумаб 2 мг/кг (n=241)
Число набухших суставов, 0-66	14,1 (8,2)	14,0 (8,4)
Число болезненных суставов, 0-68	26,1 (14,4)	25,1 (13,8)
Оценка боли пациентом (VAS), 0-10 см	6,4 (2,1)	6,3 (2,1)
Общая оценка активности заболевания пациентом (VAS), 0-10 см	6,3 (2,1)	6,5 (1,9)
Общая оценка активности заболевания врачом (VAS), 0-10 см	6,4 (1,6)	6,2 (1,7)
Балльная оценка PASI (0-72)	8,9 (9,0)	11,0 (9,9)
DAPSA	72,8 (32,1)	71,8 (34,0)
n	236	237
CDAI (0-76)	34,4 (13,1)	33,3 (12,5)
n	227	232
PASDAS (0-10)	6,7 (1,1)	6,7 (1,1)
n	227	232
Пациенты с MDA, n (%)	0 (0)	0 (0)
Пациенты с VLDA, n (%)	0 (0)	0 (0)
Индекс инвалидизации HAQ (0-3)	1,3 (0,6)	1,3 (0,6)
СРБ, мг/дл	20 (2,1)	1,9 (2,5)
Пациенты с дактилитом, n (%)	124 (51,9)	134 (55,6)
Индекс дактилита (1-60)	9,9 (10,1)	9,3 (9,4)
Пациенты с энтезитом, n (%)	181 (75,7)	185 (76,8)
Индекс LEI (0-6)	2,5 (1,9)	2,4 (1,9)
СРБ=С-реактивный белок; HAQ=Опросник оценки состояния здоровья LEI=Лидский индекс энтезита; PASI=индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести VAS=визуальная аналоговая шкала		
* Если не указано иное, значения представляют собой среднее значение (СО)		

Таблица 12

Среднее изменение относительно исходного уровня (CO) общего балла по модифицированной шкале vdH-S, стратифицированного по CDAI, DAPSA, PASDAS, MDA и VLDA, у пациентов с PsA из исследования GO-VIBRANT

	От исходного уровня до недели 24		Исходная оценка по Wk52	
	PBO	GLM 2 мг/кг	PBO→GLM 2 ^a	GLM 2 мг/кг
DAPSA				
Ремиссия - низкая активность заболевания (≤14), n	10	107	105	119
Среднее изменение (CO)	-0,05±2,14	-0,64±1,66	1,49±4,96	-0,88±2,34
p-значение		0,4422		<0,001
Умеренная активность заболевания (> 14-28), n	37	59	66	64
Среднее изменение (CO)	0,29±1,81	-0,32±1,54	1,38±4,16	-0,48±1,82
p-значение		0,0268		0,0025
Активная форма заболевания (> 28), n	190	71	66	54
Среднее изменение (CO)	1,77±3,56	0,21±1,97	1,27±4,36	0,41±3,30
p-значение		0,0007		0,2598
PASDAS				
Неактивная форма заболевания (≤3,2), n	12	101	114	118
Среднее изменение (CO)	-0,17 ± 2,136	-0,64±1,729	1,53±4,850	-1,01±2,384
p-значение		0,4305		<0,0001
Умеренная активность заболевания (> 3,2 и < 5,4), n	85	109	83	83
Среднее изменение (CO)	0,73±1,926	-0,16±1,750	1,14±3,727	-0,20±1,965
p-значение		0,0003		0,0055
Высокая активность заболевания (≥ 5,4), n	125	22	19	17
Среднее изменение (CO)	2,29±4,107	0,47±1,891	3,81±7,052	0,54±3,066
p-значение		0,0290		0,1122
MDA				
Да, n	11	78	80	101
Среднее изменение (CO)	0,91±2,49	-0,83±1,78	1,19±3,86	-1,16±2,46
p-значение		0,0232		<0,0001
Нет, n	226	159	157	136
Среднее изменение (CO)	1,49±3,39	-0,05±1,70	1,50±4,90	0,03±2,44
p-значение		<0,0001		0,0011
VLDA				
Да, n	1	16	24	35
Среднее изменение (CO)	0	-0,91±1,04	0,91±3,32	-1,49±2,22
p-значение		0,3749		0,0041
Нет, n	236	221	213	202
Среднее изменение (CO)	1,47±3,36	-0,26±1,80	1,45±4,69	-0,30±2,52
p-значение		<0,0001		<0,0001

CDAI				
Ремиссия ($\leq 2,8$), n	5	43	58	63
Среднее изменение (CO)	-0,60 $\pm$ 1,34	-0,80 $\pm$ 1,76	-0,80 $\pm$ 1,76	-1,06 $\pm$ 2,41
p-значение		0,9170		0,0003
Низкая активность заболевания ($> 2,8$ и ≤ 10), n	28	98	78	92
Среднее изменение (CO)	0,77 $\pm$ 2,01	-0,41 $\pm$ 1,43	1,21 $\pm$ 3,59	-0,81 $\pm$ 2,12
p-значение		0,0011		<0,0001
Умеренная активность заболевания (> 10 и ≤ 22), n	67	66	64	69
Среднее изменение (CO)	0,88 $\pm$ 2,73	-0,10 $\pm$ 2,04	1,32 $\pm$ 4,25	0,20 $\pm$ 2,82
p-значение		0,0429		0,0905
Высокая активность заболевания (> 22), n	137	30	37	13
Среднее изменение (CO)	1,96 $\pm$ 3,79	0,30 $\pm$ 1,95	1,75 $\pm$ 5,34	1,11 $\pm$ 2,65
p-значение		0,0079		0,8144
CDAI=индекс клинической активности заболевания; DAPSA=шкала активности заболевания для псориатического артрита; GLM=голимумаб; НД=неделя; Нед=недели; MDA=минимальная активность заболевания; PBO=плацебо; PASDAS=шкала активности псориатического артрита; PsA=активный псориатический артрит; CO=среднеквадратичное отклонение; vdH-S=модифицированная ван дер Хейде шкала Шарпа; VLDA=очень низкая активность заболевания; ^a Пациенты PBO, перешедшие к получению GLM в/в 2 мг/кг на неделе 24. ^b P-значение основано на дисперсионном анализе с ранговым критерием Ван-дер-Вардена				

Влияние голимумаба для внутривенного введения, моноклонального антитела к ФНО- α , на качество жизни, обусловленное состоянием здоровья у пациентов с активным псориатическим артритом: Результаты 3 фазы 52-недельного исследования GO-VIBRANT.

Актуальность/цель.

В рандомизированном исследовании 3 фазы GO-VIBRANT больше пациентов с псориатическим артритом (PsA) продемонстрировали ACR 20/50/70 через 24 недели при в/в лечении моноклональным антителом против ФНО- α голимумаб (GLM-IV) по сравнению с плацебо (PBO) ($p < 0,001$). После перехода от PBO к GLM-IV на неделе 24 полученный на 52 неделе эффект ACR был одинаковым в двух экспериментальных группах. В данном случае мы изучаем влияние на показатели качества жизни, обусловленные состоянием здоровья (HRQoL) до 52 недели лечения.

Способы.

Взрослых пациентов с активным PsA, которые соответствовали критериям CASPAR (N=480), рандомизировали (1:1) на получение GLM-IV в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4, и впоследствии каждые 8 недель или соответственно PBO до 20 недели с последующим переходом на GLM-IV на 24, 28 неделях, и впоследствии каждые 8 недель. Физическую функцию оценивали с использованием опросника оценки состояния здоровья: индекса инвалидизации (HAQ-DI). Показатели HRQoL включали краткие формы-36 индекса физического и психического здоровья центральных компонентах (SF-36 PCS/MCS), показатели по шкале функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT) - подшкале утомляемости, визуальной аналоговой шкале EuroQoL-5D (EQ-VAS) и дерматологическому индексу качества жизни (DLQI), полученные на неделе 0, 8, 14, 24, 36 и 52.

Результаты.

Группы, получавшие GLM-IV и PBO имели сопоставимые характеристики HRQoL на исходном уровне (табл. 13). Уже на неделе 8 средние улучшения относительно исходного уровня показателей HRQoL (HAQ-DI; SF-36 PCS; SF-36 MCS; FACIT-утомляемость; EQ-VAS; и DLQI) были значительно выше в группе, получавшей GLM-IV, по сравнению с группой, получавшей плацебо (табл. 13). На 24 неделе изменения относительно исходного уровня также были больше в группе GLM-IV по сравнению с PBO соответственно (HAQ-DI -0,63 по сравнению с -0,14; SF-36 PC 9,4 по сравнению с 2,4; SF-36 MCS 5,3 по сравнению с 0,8; FACIT-утомляемость 9,2 по сравнению с 2,3; EQ-VAS 20,2 по сравнению с 5,5; и DLQI -8,1 по сравнению с -1,9). На неделе 24 большее число пациентов, получавших GLM-IV, по сравнению с PBO продемонстрировало минимальное клинически значимое улучшение относительно исходного уровня HAQ ($\geq 0,35$ балла), SF-36 (≥ 5 баллов) и FACIT-утомляемость (≥ 4 баллов). Среди пациентов, рандомизированных на получение GLM-IV, изменения в показателях HRQoL сохранялись с 24 до 52 недели. Среди пациентов, рандомизированных на получение PBO, после перехода на GLM-IV на неделе 24 улучшения показателей HRQoL с недели 36 до недели 52 были сопоставимы с показателями пациентов, изначально рандомизированных на получение GLM-IV (табл. 13 и 14).

Вывод.

Улучшения показателей HRQoL у пациентов с PsA через 8 недель лечения GLM-IV были значительно выше, чем у пациентов, получавших PBO, и сохранялись до 52 недели лечения. У пациентов, переходящих с PBO на GLM-IV на 24 неделе, наблюдались улучшения HRQoL к 36 неделе, которые сохранялись до 52 недели, и были сопоставимы показателям, полученным у пациентов, изначально рандомизированных на получение GLM-IV.

Таблица 13

Изменения показателей HR-QoL относительно исходного уровня с 8 по 52 неделю в ходе рандомизированного исследования фазы 3 у пациентов с активным псориатическим артритом

	GLM-IV 2 мг/кг			Переход на 24-й неделе с PBO на GLM-IV 2 мг/кг		
	n	Исходный показатель (среднее $\pm$ CO)	Изменение относительно исходного уровня (среднее $\pm$ CO)	n	Исходный показатель (среднее $\pm$ CO)	Изменение относительно исходного уровня (среднее $\pm$ CO))
HAQ-DI						
Исходный уровень	237	1,3 $\pm$ 0,6		236	1,3 $\pm$ 0,6	
Неделя 8	237		-0,52 $\pm$ (0,47)*	236		-0,11 $\pm$ 0,44
Неделя 24	237		-0,63 $\pm$ 0,5*	236		-0,14 $\pm$ 0,5
Неделя 36	237		-0,64 $\pm$ 0,6	236		-0,50 $\pm$ 0,5
Неделя 52	237		-0,66 $\pm$ 0,6	236		-0,56 $\pm$ 0,5
SF-36 PCS						
Исходный уровень	237	33,1 $\pm$ 6,9		236	34,0 $\pm$ 7,2	
Неделя 8	237		8,0 $\pm$ 7,3*	236		1,7 $\pm$ 5,4
Неделя 24	237		9,4 $\pm$ 8,1*	236		2,4 $\pm$ 6,1
Неделя 36	237		9,8 $\pm$ 8,2	236		8,1 $\pm$ 7,5
Неделя 52	237		10,6 $\pm$ 8,9	236		9,0 $\pm$ 8,2
SF-36 MCS						
Исходный уровень	237	43,5 $\pm$ 11,4		236	42,5 $\pm$ 10,2	
Неделя 8	237		5,0 $\pm$ 9,8*	236		1,2 $\pm$ 7,6
Неделя 24	237		5,3 $\pm$ 10,2*	236		0,8 $\pm$ 7,4
Неделя 36	237		5,3 $\pm$ 10,7	236		4,4 $\pm$ 8,8
Неделя 52	237		5,4 $\pm$ 10,8	236		3,8 $\pm$ 9,5
FACIT-утомляемость						
Исходный уровень	237	27,9 $\pm$ 9,6		236	27,7 $\pm$ 9,7	
Неделя 8	237		7,9 $\pm$ 9,5	236		2,0 $\pm$ 7,9
Неделя 24	237		9,2 $\pm$ 9,8*	236		2,3 $\pm$ 7,8
Неделя 36	218		9,6 $\pm$ 9,6	215		8,1 $\pm$ 8,7
Неделя 52	218		9,9 $\pm$ 10,6	215		8,2 $\pm$ 9,3
EQ VAS						

Исходный уровень	237	46,9 ± 20,1		236	46,2 ± 20,3	
Неделя 8	237		17,2±(22,7)*	236		3,7 ± 21,8
Неделя 24	237		20,2 ± 24,2*	236		5,5 ± 23,1
Неделя 36	218		21,0 ± 25,3	215		17,7 ± 25,7
Неделя 52	218		21,6 ± 27,6	215		20,8 ± 25,7
DLQI						
Исходный уровень	194	12,0 ± 7,5		195	10,0 ± 6,8	
Неделя 8	194		-7,2± 7,2*	194		-1,7 ± 4,9
Неделя 24	194		-8,1 ± 7,7*	195		-1,9 ± 5,9
Неделя 36	194		-7,6 ± 7,6	195		-5,8 ± 6,8
Неделя 52	194		-7,8 ± 7,2	195		-5,8 ± 7,4
*р по сравнению с РВО <0,0001, значения р являются номинальными и не скорректированы на множественность. Результаты SF-36 рассчитывали с использованием смешанной статистической модели для повторных измерений. Результаты EQ VAS, HAQ-DI, FACIT-утомляемость и DLQI рассчитывали с использованием ковариационного анализа. DLQI=Дерматологический индекс качества жизни; EQ VAS=опросник EuroQol-5D, визуальная аналоговая шкала; FACIT-утомляемость=Функциональная оценка терапии хронического заболевания-утомляемость; GLM-IV=голимумаб для внутривенного введения; HAQ-DI=опросник оценки состояния здоровья - индекс инвалидизации; HR-QoL=качество жизни, обусловленное состоянием здоровья; РВО=плацебо; SF-36 PCS/MCS=краткие формы 36 индекса физического/психического здоровья						

Таблица 14
Достижение минимальной клинически значимой разницы (MCID) от исходного уровня † с 8 до 52 недели в рандомизированном исследовании фазы 3 GO-VIBRANT у пациентов с активным псориатическим артритом

	GLM-IV 2 мг/кг		Переход на 24-й неделе с РВО на GLM-IV 2 мг/кг	
	n	Пациенты с ≥MCID относительно исходного уровня, %	n	Пациенты с ≥MCID относительно исходного уровня, %
HAQ-DI				

	n	Пациенты с $\geq$ MCID относительно исходного уровня, %	n	Пациенты с $\geq$ MCID относительно исходного уровня, %
Неделя 8	241	63,9*	236	27,2
Неделя 24	241	69,3*	239	32,6
Неделя 36	241	68,9	239	56,5
Неделя 52	241	71	239	62,8
SF-36 PCS				
Неделя 8	241	63,5*	236	25,5
Неделя 24	241	69,7*	239	29,3
Неделя 36	241	69,3	239	63,2
Неделя 52	241	73,4	239	66,9
SF-36 MCS				
Неделя 8	241	45,6*	236	26,8
Неделя 24	241	46,9*	239	29,3
Неделя 36	241	47,7	239	46,0
Неделя 52	241	50,6	239	42,3
FACIT- утомляемость				
Неделя 8	241	69,4*	236	40,4
Неделя 24	231	70,1*	221	43,0
Неделя 36	218	72,5	215	69,3
Неделя 52	218	69,3	215	69,8
† Минимальные клинически значимые отличия от исходного уровня: HAQ-DI=0,35, SF-36=5, FACIT-утомляемость=4. *р по сравнению с РВО <0,0001, значения р являются номинальными и не скорректированы на множественность. FACIT= Функциональная оценка терапии хронического заболевания, утомляемость; GLM-IV=голимумаб для внутривенного введения HAQ-DI=опросник оценки состояния здоровья - индекс инвалидизации; MCID=минимальная клинически значимая разница; РВО=плацебо; SF-36 PCS/MCS=краткие формы 36 индекса физического/психического здоровья				

Оценка улучшения состояния псориаза кожи и ногтей у ранее не подвергавшихся лечению пациентов с активным псориатическим артритом, получавших лечение голимумабом. Результаты исследования GO-VIBRANT на неделе 52.

Цель.

Изучить, взаимосвязаны ли симптомы кожи и ногтей с улучшениями качества жизни (QoL) и симптомов суставов у пациентов с псориатическим артритом, получавших голимумаб внутривенно (в/в).

Способы.

Пациентов рандомизировали на получение голимумаба в/в в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4, затем каждые 8 недель (q8w) до недели 52 или плацебо на неделях 0, 4, затем q8w, с переходом на голимумаб в/в в дозе 2 мг/кг на неделях 24, 28, а затем от q8w до недели 52. Оценки включали в себя индекс тяжести поражения псориазом (PASI), модифицированный индекс тяжести псориаза ногтей (mNAPSI), дерматологический индекс качества жизни (DLQI) и критерии ревматоидного артрита Американского колледжа ревматологии (ACR).

Результаты.

До недели 24 полученные ответы PASI 75/90/100 ($p \leq 0,0098$) и средние улучшения mNAPSI (-11,4 по сравнению с -3,7; $p < 0,0001$) и DLQI (-9,8 по сравнению с 2,9; $p < 0,0001$) были значительно выше при использовании голимумаба по сравнению с плацебо. Ответы сохранялись у пациентов, получавших лечение голимумабом, до недели 52. У пациентов, получавших плацебо с перекрестным переходом на лечение другим препаратом увеличение доли пациентов, продемонстрировавших ответы PASI 75/90/100 наблюдалось с недели 24 до недели 52, а среднее улучшение по mNAPSI (с -3,7 до -12,9) и DLQI (с -2,9 до -

7,8) увеличилось с недели 24 до недели 52. Также наблюдалось одновременное достижение ответов по PASI и DLQI, ответов по PASI и ACR, а также ответов по mNAPSI и DLQI. Аналогичные ответы наблюдали для всех оценок во все моменты времени независимо от применения метотрексата.

Последствия.

Улучшения симптомов псориаза кожи и ногтей при внутривенном введении голимумаба у пациентов с псориатическим артритом на протяжении 1 года были связаны с улучшениями показателей QoL и активности заболевания артрита.

Выделенные области.

Симптомы со стороны кожи и ногтей улучшились у пациентов, получавших голимумаб внутривенно (в/в).

Ответ на в/в введение голимумаба был аналогичным при одновременном применении метотрексата или без него.

При в/в введении голимумаба достигались значительные одновременные ответы по PASI и DLQI.

При в/в введении голимумаба достигались значительные одновременные ответы по mNAPSI и DLQI.

При в/в введении голимумаба достигались значительные одновременные ответы по PASI и ACR20.

Введение.

Псориатический артрит развивается у до 30% пациентов с псориазом, а у 75-85% пациентов с псориатическим артритом симптомы со стороны суставов предшествуют повреждениям кожи с приблизительно средней задержкой 10 лет. Кроме того, приблизительно 80% пациентов с псориатическим артритом имеют активный кожный псориаз и до 90% поражение ногтей. Псориаз кожи и ногтей связан с высокой нагрузкой заболевания и оказывает существенное влияние на качество жизни (QoL). Псориаз кожи связан с физическими симптомами, включая зуд, образование псориатических чешуек и шелушение. Кроме того, видимость псориаза может приводить к неловкости, самосознанию и депрессии. Псориаз ногтей может вызывать боль и сложности при ежедневной деятельности и может приводить к тревоге и депрессии. Кроме того, псориаз ногтей может быть прогностическим фактором заболевания суставов, часто связан с обострением артрита и может быть сложным в лечении. Таким образом, при лечении псориатического артрита важно учитывать псориаз кожи и ногтей.

Нагрузка псориаза кожи и ногтей у пациентов с псориатическим артритом заметно влияет на руководящие указания по лечению и должна быть учтена врачом в процессе принятия решения о лечении псориатического артрита. Согласно рекомендациям по лечению GRAPPA (группа по исследованию и оценке псориаза и псориатического артрита), лечение псориатического артрита должно включать оценку всех 6 областей псориатического артрита, включая псориаз кожи и ногтей. Кроме того, рекомендации предполагают, что пациентов с псориатическим артритом следует лечить с использованием стратегии "лечение до достижения цели", такой как нацеливание на минимальную активность заболевания (MDA) или очень низкую активность заболевания (VLDA), обе из которых включают в себя компонент кожи как часть их критериев (т.е. область псориаза и индекс тяжести [PASI] ≤ 1).

GO-VIBRANT представляет собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 голимумаба для внутривенного (в/в) введения, полностью человеческого агента против опухолевого фактора некроза (ФНО) α у взрослых пациентов с активным псориатическим артритом. Ранее сообщались первичные и основные вторичные конечные точки GO-VIBRANT с недели 24 и до недели 52. Цели представленных в настоящем документе анализов заключались в оценке улучшения симптомов со стороны кожи и ногтей до недели 52 у пациентов с псориатическим артритом, получавших голимумаб внутривенно, с сопутствующим применением метотрексата и без него в исследовании GO-VIBRANT, а также для оценки взаимосвязи улучшения симптомов со стороны кожи и ногтей с улучшением дерматологического индекса качества жизни (DLQI) и улучшения критериев ревматоидного артрита Американского колледжа ревматологии на 20% (ACR20).

Пациенты и способы.

Пациенты.

В данном исследовании приняли участие ранее не подвергавшиеся лечению взрослые пациенты с активным псориатическим артритом, определяемым как ≥ 5 набухших и ≥ 5 болезненных суставов, С-реактивный белок $\geq 0,6$ мг/дл и активный или документально подтвержденный псориаз в анамнезе независимо от лечения модифицирующими течение заболевания противоревматическими лекарственными средствами и/или нестероидными противовоспалительными препаратами. Критерии полного включения/исключения описаны в других разделах документа. Все пациенты предоставили письменное согласие на участие.

Дизайн исследования.

Схема исследования GO-VIBRANT была опубликована ранее. Вкратце, пациентов рандомизировали 1:1 на получение голимумаба в/в в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w) до недели 52 или плацебо (нормальный физиологический раствор для в/в инфузии) на неделях 0 и 4, а затем q8w, с перекрестным переходом к голимумабу в/в в дозе 2 мг/кг на неделях 24 и 28, а затем q8w до неде-

ли 52. На неделе 16 всем пациентам, которые соответствовали критериям для досрочного перехода (улучшение по количеству набухших и болезненных суставов < 5%), было разрешено изменить сопутствующие лекарственные средства в соответствии с протоколом по усмотрению исследователя. Протокол исследования был одобрен независимым комитетом по этике или экспертным советом организации на каждом исследовательском центре, а исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, которые соответствуют принципам надлежащей клинической практики и местным нормативным требованиям.

Предусмотренные исследованием оценки.

У пациентов с поражением псориазом $\geq 3\%$ площади поверхности тела (BSA) на исходном уровне ответ со стороны кожи оценивали по PASI (0-72), изменение от исходного уровня QoL, обусловленного состоянием здоровья, связанного с симптомами кожи, оценивали по DLQI (0-30) у пациентов с DLQI >1 на исходном уровне, а активность периферического артрита оценивали с использованием критериев ACR для оценки улучшения при ревматоидном артрите. Одновременное достижение ответа по PASI (PASI50/75/90/100) и улучшение DLQI на ≥ 5 баллов (показано как клинически значимое улучшение DLQI) или ACR20 также оценивали у этих пациентов по полученным результатам. Ответ со стороны кожи и ногтей оценивали с использованием модифицированного индекса тяжести псориаза ногтей (mNAPSI, 0-130) у пациентов с mNAPSI >0 на исходном уровне. Одновременное достижение улучшения mNAPSI на 50%, 75% или 100% относительно исходного уровня и улучшение DLQI на ≥ 5 баллов относительно исходного уровня также оценивали по полученным результатам у пациентов с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA, DLQI >1 и mNAPSI >0 относительно исходного уровня.

Статистические анализы.

Все статистические тесты для оценок PASI проводили при альфа-уровне 0,05 (2-сторонний), а различия между экспериментальными группами оценивали с использованием теста Кохрана-Мантеля-Хенселя для дихотомичных конечных точек и методологии повторных измерений на основе смешанной модели с использованием изучаемых данных для непрерывных переменных. Для оценки различий в изменениях показателей по mNAPSI и DLQI относительно исходного уровня между экспериментальными группами использовали ковариационный анализ (ANCOVA). Сравнения лечения после недели 24 после перехода с плацебо не проводили в виду отсутствия контрольной группы с этого момента времени. Непрерывные конечные точки заменяли с использованием данных последнего документированного значения для недостающих данных. Для двоичных конечных точек применяли метод подстановки недостающих данных для пациентов, не продемонстрировавших ответа, в случае отсутствия всех составляющих.

Результаты.

Распределение участников исследования и характеристика заболеваний.

Всего 480 пациентов рандомизировали на получение голимумаба (n=241) или плацебо (n=239). Средний возраст составлял 46 лет, и 52% всех пациентов были мужчинами. Демографические характеристики и характеристики заболевания были хорошо сбалансированы между экспериментальными группами. На исходном уровне у 394 пациентов (плацебо, n=198; голимумаб, n=196) поражение псориазом на исходном уровне составляло $\geq 3\%$ BSA, а у 367 пациентов mNAPSI на исходном уровне был >0 (среднее 18,6; плацебо, n=170; голимумаб (n=197)). Среди пациентов с исходным поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA средний балл по PASI составил 9,9. Среди пациентов с DLQI >1 и поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне (n=283) средний показатель DLQI составил 13,7.

Ответ по PASI.

Среднее изменение PASI относительно исходного уровня у пациентов с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне было значительно больше ($p < 0,001$) у пациентов, получавших лечение голимумабом, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, на неделе 14 (-8,44 по сравнению с -1,02, соответственно) и на неделе 24 (-8,74 по сравнению с -1,34, соответственно). На неделе 52 улучшение сохранялось у пациентов, получавших лечение голимумабом (-9,13), и численно увеличилось у пациентов, получавших лечение плацебо, после перекрестного перехода на голимумаб на неделе 24 (-6,87). Кроме того, как сообщалось ранее, на неделях 14 и 24 (фиг. 19A) значительно большие доли пациентов, получавших лечение голимумабом, по сравнению с пациентами, получавшими лечение плацебо, продемонстрировали ответ PASI75, PASI90 или PASI100 (улучшение по шкале PASI на $\geq 75\%$, $\geq 90\%$ или 100%) на неделях 14 и 24 (Фиг. 19A). У пациентов, рандомизированных на получение голимумаба, ответы по PASI сохранялись с недели 24 до недели 52; Ответ по PASI75 составил 64,8 и 71,9% на неделях 24 и 52, соответственно; PASI90 составило 42,9 и 56,1%, соответственно; и PASI100 составило 25,5 и 28,6%, соответственно (фиг. 19A). Аналогичные результаты наблюдались во все моменты времени независимо от применения метотрексата на исходном уровне (фиг. 19B и 19C).

У пациентов, которые перешли с плацебо на голимумаб на неделе 24, ответ по PASI увеличивался численно с недели 24 до недели 52; эффект по PASI75 увеличился с 13,1% на неделе 24 до 60,6% на неделе 52; PASI90 увеличился с 7,6 до 41,9%, соответственно; и PASI100 увеличился с 5,6 до 18,7% соответственно (фиг. 19A). Аналогичные результаты наблюдались у пациентов, получавших плацебо, независимо от применения метотрексата на исходном уровне (фиг. 19B и 19C).

Ответ по mNAPSI.

У пациентов с баллом по mNAPSI >0 на исходном уровне среднее улучшение балла mNAPSI относительно исходного уровня было значительно выше у пациентов, получавших лечение голимумабом, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, на неделе 14 (-9,6 по сравнению с -1,9, $p<0,0001$) и неделе 24 (-11,4 по сравнению с -3,7, $p<0,0001$; как указано выше в публикации Husni 2019) (фиг. 20A). На неделе 52 ответ по mNAPSI сохранялся у пациентов, рандомизированных на получение голимумаба (-11,4 на неделе 24 и -12,1 на неделе 52) и увеличивался численно (с -3,7 до -12,9) у пациентов, которые перешли с плацебо на голимумаб на неделе 24. Аналогичные схемы ответа по mNAPSI у пациентов, получавших лечение голимумабом и получавших плацебо, наблюдались в каждый момент времени независимо от применения метотрексата на исходном уровне.

Ответ по DLQI.

Среди пациентов с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне значительно больше пациентов, получавших лечение голимумабом, чем пациентов, получавших плацебо, продемонстрировали улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов на неделе 14 (62,2% по сравнению с 26,8%, $p<0,0001$) и неделе 24 (67,3% по сравнению с 24,7%, $p<0,0001$) (неопубликованные данные). Среди пациентов с поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA и оценкой DLQI >1 на исходном уровне среднее улучшение оценки по DLQI по сравнению с исходным уровнем было существенно больше у пациентов, получавших лечение голимумабом, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо на неделе 14 (-9,3 по сравнению с -3,0, $p<0,0001$) и неделе 24 (-9,8 по сравнению с -2,9, $p<0,0001$) (фиг. 20B). На неделе 52 среднее улучшение по DLQI сохранялось у пациентов, рандомизированных на получение голимумаба (-9,8 на неделе 24 и -9,5 на неделе 52), и увеличивалось численно у пациентов, которые перешли с плацебо на голимумабом на неделе 24 (с -2,9 на неделе 24 до -7,8 на неделе 52). Аналогичные схемы значимости наблюдали в каждый момент времени независимо от применения метотрексата на исходном уровне.

Одновременные ответы со стороны кожи, ногтей и совместные ответы.

По сравнению с пациентами, получавшими плацебо, значительно большие доли пациентов, получавших голимумаб, с mNAPSI >0, DLQI >1 и поражением псориазом $\geq 3\%$ BSA на исходном уровне продемонстрировали улучшение по mNAPSI на ≥ 50 , ≥ 75 или 100% по сравнению с исходным уровнем и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов по сравнению с исходным уровнем на 14 и 24 неделях ($p<0,0001$) (фиг. 20C). На неделе 24 57,9% по сравнению с 11,2, 45,9% по сравнению с 5,6 и 25,6% по сравнению с 5,6% пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, одновременно продемонстрировали улучшение по mNAPSI на ≥ 50 , ≥ 75 и 100% соответственно и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов. На неделе 52 доли пациентов в группе пациентов, получавших плацебо с переходом на другой препарат, которые продемонстрировали одновременные улучшения по mNAPSI и DLQI, увеличивались по сравнению с неделей 24 и приближались к долям, наблюдаемым в экспериментальной группе, получающей голимумабом. Среди пациентов, рандомизированных на получение голимумаба, 35,3% продемонстрировала улучшение по mNAPSI на 100% и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов по сравнению с 25,2% пациентов, получавших плацебо с переходом на другой препарат. Результаты были аналогичными независимо от применения метотрексата (фиг. 22A-B).

По сравнению с пациентами, получавшими плацебо, на неделях 14 и 24 ($p<0,0001$) значительно большие доли пациентов, получавших голимумаб, продемонстрировали одновременные ответы по PASI (PASI50, PASI75, PASI90 или PASI100) и улучшения по DLQI на ≥ 5 баллов (фиг. 21A) или ACR20 (фиг. 21B). Полученные одновременные ответы сохранялись до недели 52 по всем конечным точкам у пациентов, рандомизированных на получение голимумаба, и увеличивались с недели 24 до недели 52 у пациентов, которые перешли с плацебо на голимумаб на неделе 24. Результаты были аналогичными независимо от применения метотрексата (фиг. 22C-F).

PASI90 и DLQI с улучшенными на ≥ 5 баллов одновременно наблюдались у 36,0% пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с 4,5% пациентов, получавших плацебо ($p<0,0001$), на неделе 14 и у 39,3% по сравнению с 5,3% пациентов ($p<0,0001$) соответственно на неделе 24 (фиг. 21A). На неделе 52 51,3% пациентов, рандомизированных на получение голимумаба, и 34,6% пациентов, получавших плацебо, продемонстрировали PASI90 и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов. Результаты были схожими у пациентов, которые применяли (фиг. 22C) либо не применяли (фиг. 22D) метотрексат на исходном уровне.

PASI90 и ACR20 одновременно наблюдались у 33,2% пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с 3,0% пациентов, получавших плацебо ($p<0,0001$), на неделе 14 и у 38,8% по сравнению с 4,5% пациентов ($p<0,0001$) соответственно на неделе 24 (фиг. 21B). На неделе 52 47,4% пациентов, рандомизированных на получение голимумаба, и 37,4% пациентов, получавших плацебо, продемонстрировали ответ PASI90 и ACR20. Результаты были схожими у пациентов, которые применяли (фиг. 22E) и не применяли (фиг. 22F) метотрексат на исходном уровне.

Обсуждение.

Внутривенное лечение голимумабом показало клинически значимое улучшение при псориазе кожи и ногтей независимо от применения метотрексата. Значительно более высокие доли пациентов, получавших голимумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, продемонстрировали ответ

PASI75, PASI90 или PASI100 на неделе 14, и эти ответы сохранялись до недели 52. Аналогичным образом, улучшения показателей по mNAPSI и DLQI были значительно выше у пациентов, получавших голимумаб, чем у пациентов, получавших плацебо, на неделе 14, и эти улучшения сохранялись до недели 52. Кроме того, ответы по всем оценкам численно улучшились с недели 24 до недели 52 у пациентов, получавших плацебо с переходом на голимумаб на неделе 24. Все результаты были сопоставимыми у пациентов, которые применяли или не применяли метотрексат на исходном уровне.

Одновременное достижение клинически важных ответов по PASI и DLQI и ответов по mNAPSI и DLQI среди относительно больших долей пациентов, получавших голимумаб В/В, на неделях 14-52 указывает на наличие взаимосвязи между этими оценками и DLQI. Взаимосвязь между DLQI и PASI была установлена ранее у пациентов с псориазом отдельно и у пациентов с псориатическим артритом. Как при псориазе, так и при псориатическом артрите исследования показали, что улучшения по PASI и DLQI по сравнению с исходным уровнем после биологической терапии взаимосвязаны (подтверждено корреляционным анализом). Исследование, проведенное Cozzani и коллегами, также показало, что показатели по PASI и DLQI у пациентов с псориазом или псориатическим артритом, получающих неспецифическое лечение, взаимосвязаны, что подтверждалось корреляционными анализами и линейной регрессией. Аналогичная взаимосвязь между mNAPSI и DLQI не установлена у пациентов с псориазом или псориатическим артритом; однако было доказано, что mNAPSI взаимосвязан с общим показателем физического здоровья по краткой форме исследования медицинских результатов 36. Также было установлено, что псориаз для ногтей может отрицательно влиять на качество жизни (QoL). Полученные результаты свидетельствуют о том, что улучшения симптомов со стороны кожи и ногтей могут приводить к соответствующим улучшениям QoL, обусловленного состоянием здоровья, измеренным по DLQI.

Одновременное получение ответа PASI50/75/90/100 и ACR20 у значительно более высоких долей пациентов, получавших голимумаб, по сравнению пациентами, получавшими плацебо, в данном исследовании, указывает, что голимумаб в/в эффективен при одновременном стимулировании и поддержании ответов со стороны кожи и суставов у пациентов с псориатическим артритом. Насколько нам известно, взаимосвязь между PASI и ACR, аналогичная взаимосвязи между PASI и DLQI, не подтверждена; однако одновременное достижение PASI75 и ACR20 использовали для оценки эффективности адалимумаба и инфликсимаба у пациентов с псориатическим артритом, и было показано, что одновременное достижение указанных конечных точек связано с улучшенным QoL, обусловленного состоянием здоровья.

Заключение.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что голимумаб в/в приводит к значительному, устойчивому улучшению симптомов псориаза со стороны кожи и ногтей у пациентов с псориатическим артритом независимо от применения метотрексата на исходном уровне. Улучшения симптомов со стороны кожи и ногтей, по-видимому, сопровождаются улучшениями QoL и симптомов со стороны суставов. Лечение всех областей, относящихся к псориатическому артриту, может улучшать результаты для пациентов, и его важность следует учитывать у всех пациентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом (PsA), включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w), причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается ремиссия - низкая активность заболевания по шкале оценки активности болезни при PsA (DAPSA), отсутствие активности заболевания по шкале оценки активности заболевания PsA (PASDAS), ремиссия по индексу клинической активности заболевания (CDAI), минимальная активность заболевания (MDA) или очень низкая активность заболевания (VLDA).

2. Способ по п.1, в котором у >45% пациентов наблюдается ремиссия по шкале DAPSA, у >45% пациентов наблюдается отсутствие активности заболевания по шкале PASDAS, у >25% пациентов наблюдается ремиссия по шкале CDAI, у >40% пациентов наблюдается MDA и у >12% пациентов наблюдается VLDA.

3. Способ лечения пациентов с активным псориатическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w), причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов наблюдается улучшение индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) на 75% (PASI75), улучшение индекса PASI на 90% (PASI90) или улучшение индекса PASI на 100% (PASI100).

4. Способ по п.3, в котором на исходном уровне пациенты имеют поражение псориазом >3% площади поверхности тела (BSA).

5. Способ по п.3, в котором >70% пациентов демонстрируют PASI75, >55% пациентов демонстри-

руют PASI90 или >25% пациентов демонстрируют PASI100.

6. Способ по п.3, в котором у пациентов наблюдается улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов.

7. Способ по п.6, в котором >60% пациентов демонстрируют PASI75 и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов, >50% пациентов демонстрируют PASI75 и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов или >20% пациентов демонстрируют PASI100 и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов.

8. Способ по п.3, в котором у пациентов наблюдается улучшение ответа согласно критериям Американской коллегии ревматологов на 20% (ACR20).

9. Способ по п.8, в котором >55% пациентов демонстрируют ответ PASI75 и ACR20, >45% пациентов демонстрируют ответ PASI90 и ACR20 или >20% пациентов демонстрируют ответ PASI100 и ACR20.

10. Способ лечения пациентов с активным псориазическим артритом, включающий внутривенное введение (в/в) пациентам дозы антител к ФНО, причем указанное антитело к ФНО вводят в дозе 2 мг/кг на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (q8w), причем антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и при этом через 52 недели лечения у пациентов с модифицированным индексом тяжести псориаза ногтей (mNAPSI) >0 на исходном уровне наблюдалось улучшение показателя mNAPSI на 100% и улучшение дерматологического индекса качества жизни (DLQI) на ≥ 5 баллов.

11. Способ по п.10, в котором пациенты на исходном уровне имеют поражение псориазом $\geq 3\%$ площади поверхности тела (BSA).

12. Способ по п.10, в котором >30% пациентов демонстрируют улучшение по mNAPSI на 100% и улучшение по DLQI на ≥ 5 баллов.

13. Способ по пп.1, 3 или 10, в котором возраст пациентов составляет ≥ 18 лет.

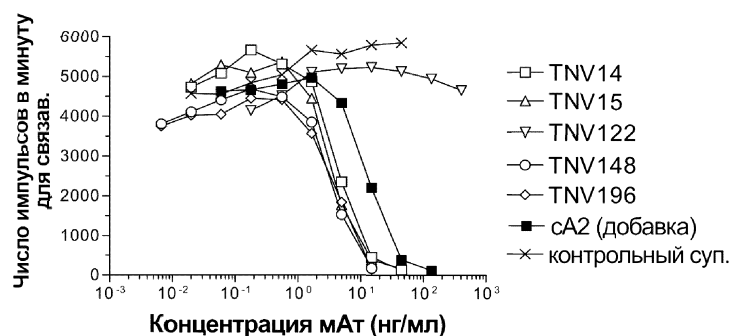
14. Способ по пп.1, 3 или 10, в котором лечение дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО с метотрексатом (MTX) или без него.

15. Способ по пп.1, 3 или 10, в котором указанное антитело к ФНО вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО.

16. Способ по п.15, в котором указанную композицию вводят таким образом: пациентам вводят антитело к ФНО в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель.

17. Способ по п.15, в котором возраст пациентов составляет ≥ 18 лет.

18. Способ по п.15, причем лечение дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX) или без него.



Фиг. 1

TNV	<u>ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGA</u>	
	Q V Q L V E S G G G V	
зародышевая линия	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG	
TNV	GGTGTCCAGTGT.....	
TNV148 (B)	GGTGTCCAGTGT.....A.....	
	V Q P G R S L R L S C A A S G	
зародышевая линия	GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA	
TNV		
	F T F S <u>S Y A M H</u> W V R Q A P	
зародышевая линия	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>	
зародышевая линия	GGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC	
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 R F T I S</u>	
зародышевая линия	AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCC	
TNV14	.GC...A.G....G.....A.....	
TNV15	..C...A.G.....C.....	
TNV148 (B)	A.G.....	
TNV196	A.G.C.....G.....	

Фиг. 2A

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

Фиг. 2B

TNV	<u>ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGGCTC</u>	
	E I V L T Q S P A T	
зародышевая линия	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC	
TNV	CCAGATACCACCGGA.....	
	L S L S P G E R A T L S C R A	
зародышевая линия	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC	
TNV		
	<u>S Q S V S S Y L A</u> W Y Q Q K P	
зародышевая линия	AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT	
TNV14,15		
TNV148,196	TA.....	
	G Q A P R L L I Y D A S N R A	
зародышевая линия	GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC	
TNV		
	<u>T</u> G I P A R F S G S G S G T D	
зародышевая линия	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC	
TNV		
	F T L T I S S L E P E D F A V	
зародышевая линия	TTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT	
TNV		
	Y Y C <u>Q Q R S N W P P F T F G</u>	SEQ ID NO:8
зародышевая линия	TATTACTGTCTAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC	SEQ ID NO:35
TNV	A.....	
	P G T K V D I K R	
зародышевая линия	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT	
TNV		

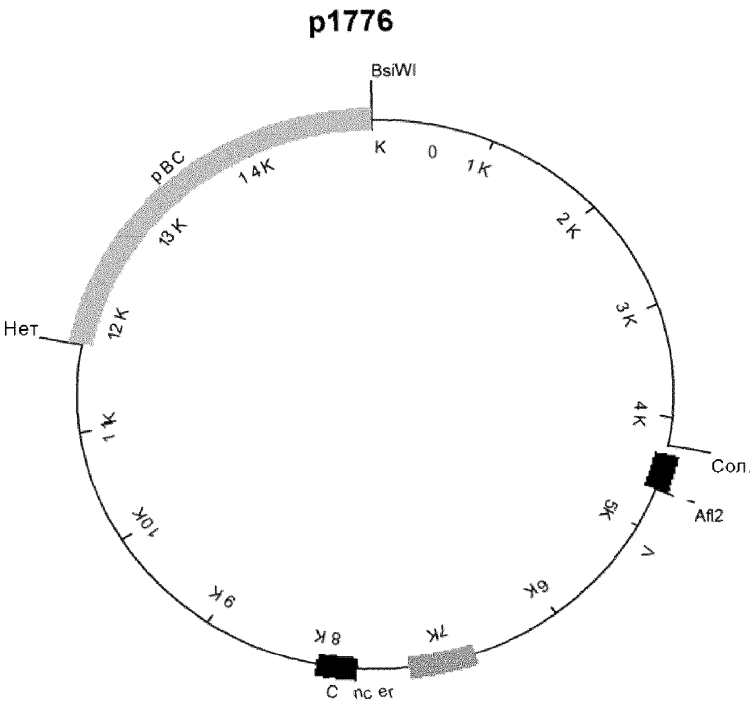
Фиг. 3

зародышевая линия	<u>MGFGLSWVFLVALLRGVQC</u>	сигнальная SEQ ID NO:32
TNV		
зародышевая линия	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	FR1 SEQ ID NO:7
TNV		
TNV148 (B)	I..	
зародышевая линия	SYAMH	CDR1 SEQ ID NO:1
TNV		
зародышевая линия	WVRQAPGKGLEWVA	FR2 SEQ ID NO:7
TNV		
TNV148 (B)	N.....	
зародышевая линия	VISYDGSNKYYADSVKG	CDR2 SEQ ID NO:2
TNV14 IL	...S.K.....D	
TNV15	F.L.....K.....	
TNV148 (B)	FM.....K.....	
TNV196	F.....KS.....	
зародышевая линия	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	FR3 SEQ ID NO:7
TNV14		
TNV15	A.....	
TNV148	P.....	
TNV148B		
TNV196	...V.....F.....F....	
зародышевая линия	-----YYYYYGMDV	CDR3 SEQ ID NO:3
TNV14	DRGISAGGN.....	
TNV15	...V...N.....	
TNV148 (B)	...A...N.....	
TNV196	...G...N.....	
зародышевая линия	WGQGTTVTVSS	J6 SEQ ID NO:7
TNV		

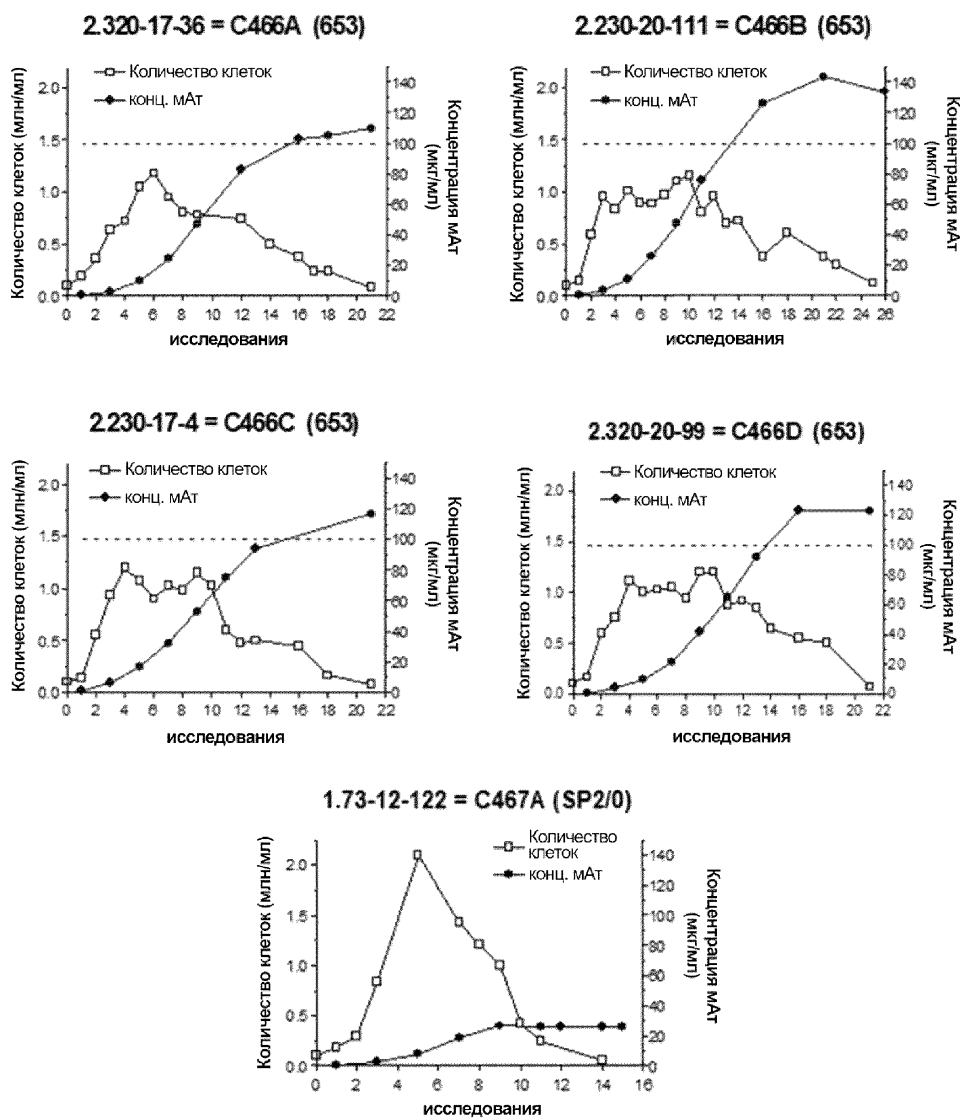
Фиг. 4

TNV	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	сигнальная SEQ ID NO:33
зародышевая линия TNV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1 SEQ ID NO:8
зародышевая линия TNV14	RASQSVSSYLA	CDR1 SEQ ID NO:4
TNV15		
TNV148 (B)	Y....	
TNV196	Y....	
зародышевая линия TNV	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2 SEQ ID NO:8
зародышевая линия TNV	DASNRAT	CDR2 SEQ ID NO:5
зародышевая линия TNV	GIPARFSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	FR3 SEQ ID NO:8
зародышевая линия TNV	QQRSNWPPFT	CDR3 SEQ ID NO:6
зародышевая линия TNV	FGPGTKVDIK	J3 SEQ ID NO:8

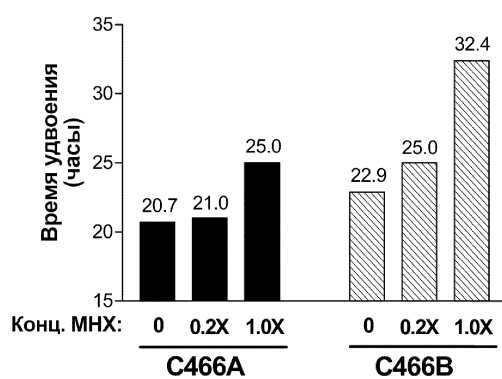
Фиг. 5



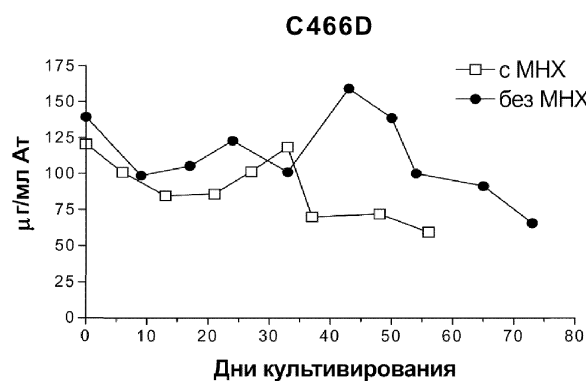
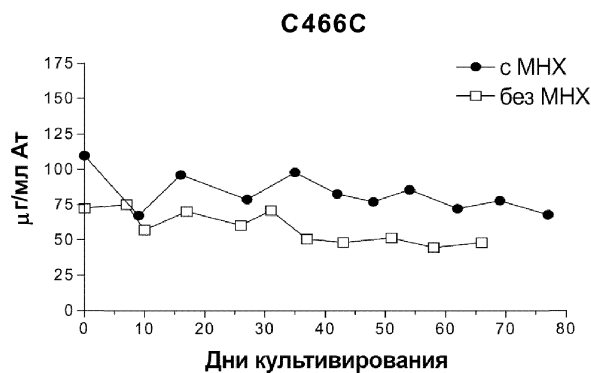
Фиг. 6



Фиг. 7

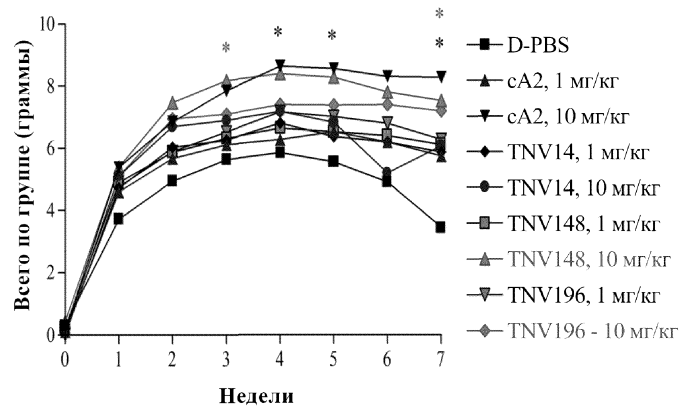


Фиг. 8



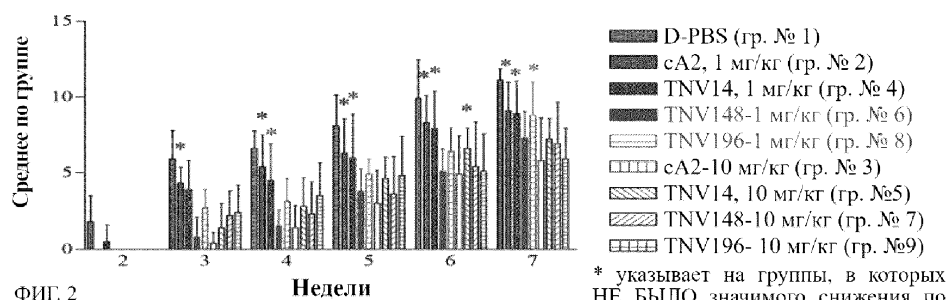
Фиг. 9

Изменение массы тела относительно исходного уровня



Фиг. 10

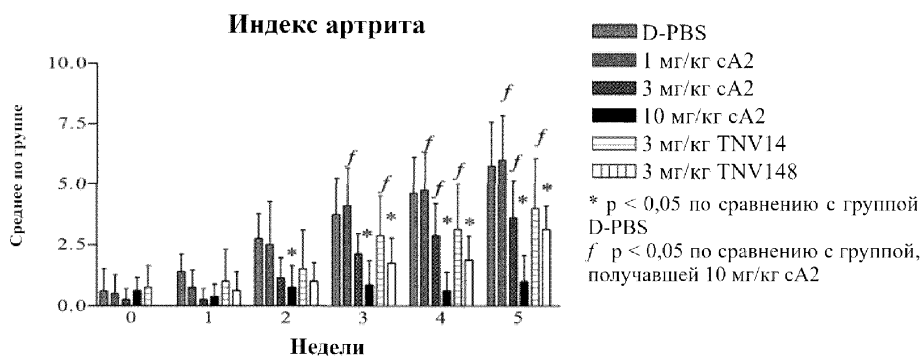
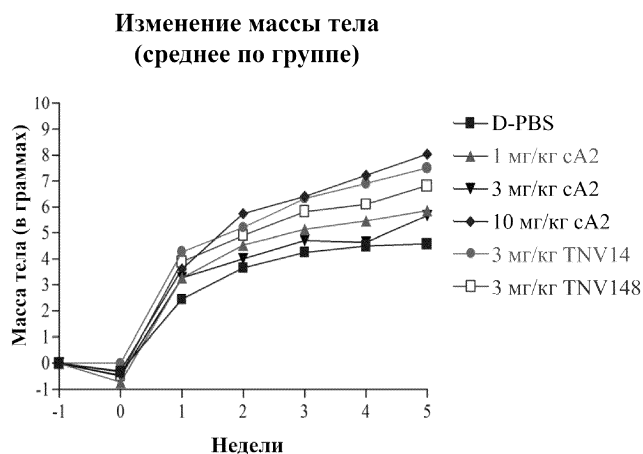
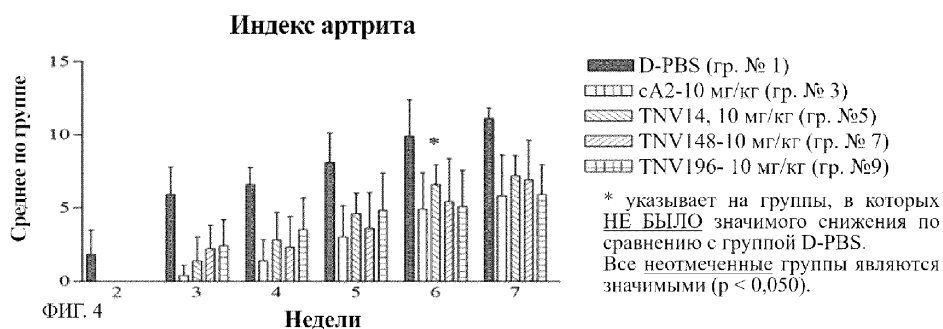
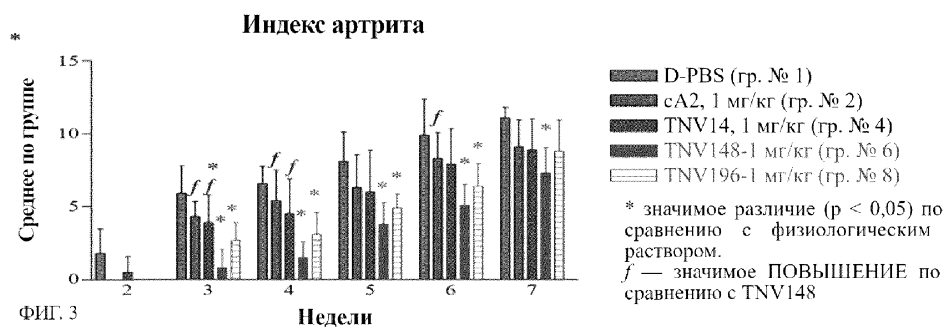
Индекс артрита



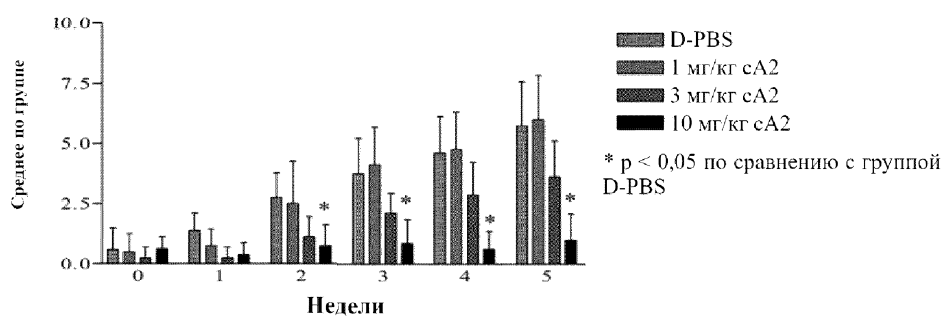
Фиг. 2

* указывает на группы, в которых НЕ БЫЛО значимого снижения по сравнению с группой D-PBS. Все неотмеченные группы являются значимыми ($p < 0,050$).

Фиг. 11А

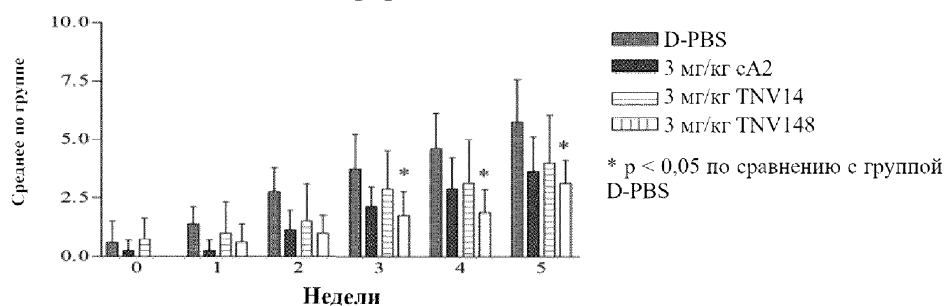


Индекс артрита (контроли)



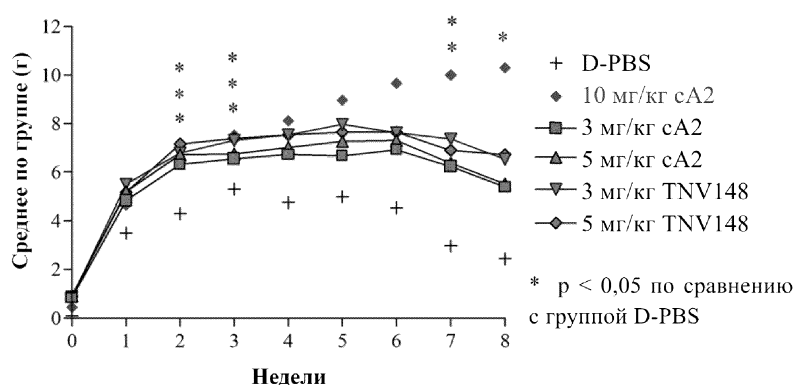
Фиг. 13В

Индекс артрита



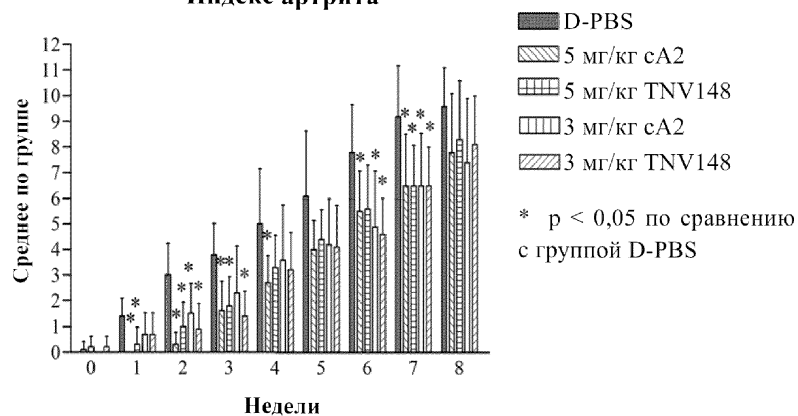
Фиг. 13С

Изменение массы тела



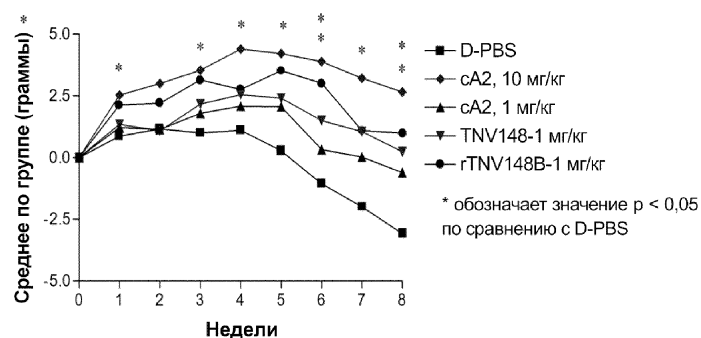
Фиг. 14

Индекс артрита



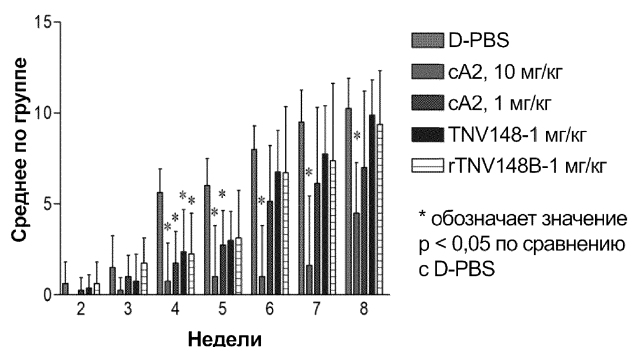
Фиг. 15

Изменение массы тела



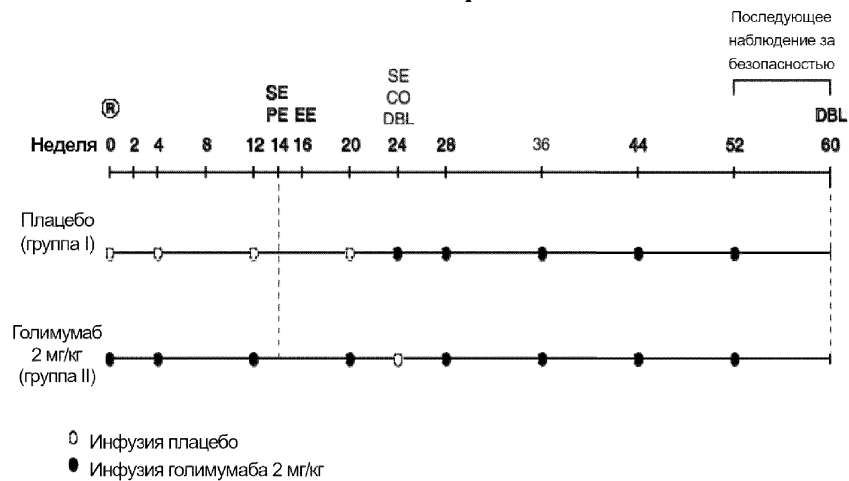
Фиг. 16

Индекс артрита



Фиг. 17

Схематический обзор исследования



® = рандомизация

SE = вторичный конечный показатель

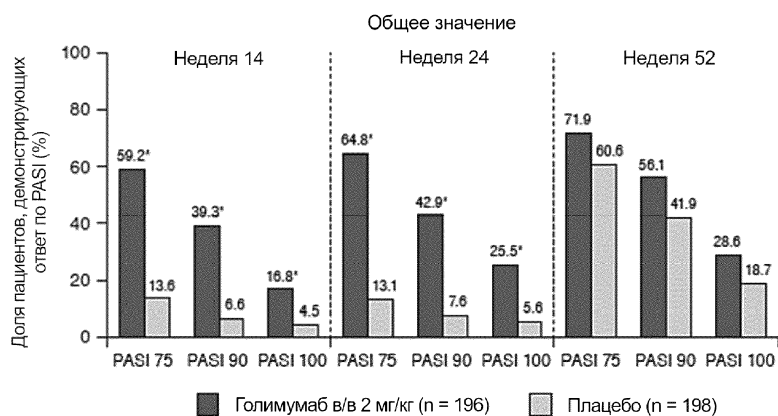
EE = ранний переход

PE = основной конечный показатель

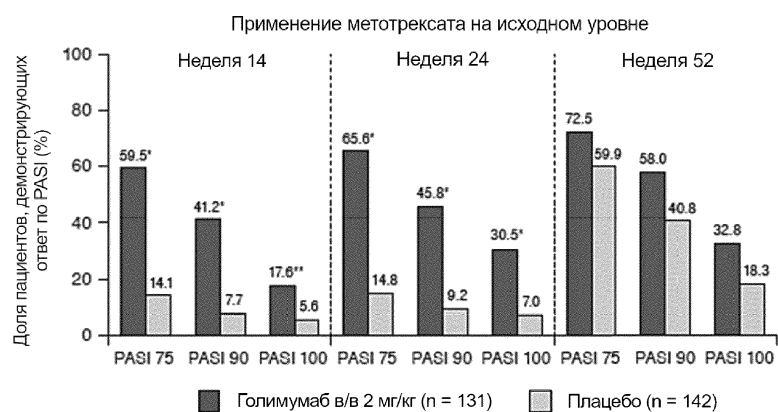
CO = переход с плацебо

DBL = блокировка базы данных

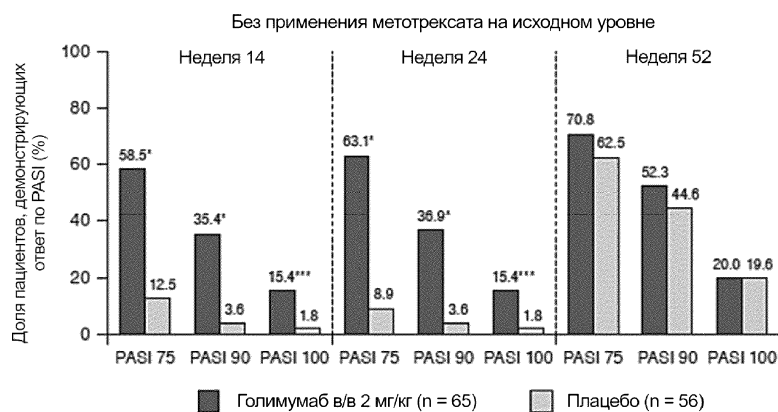
Фиг. 18



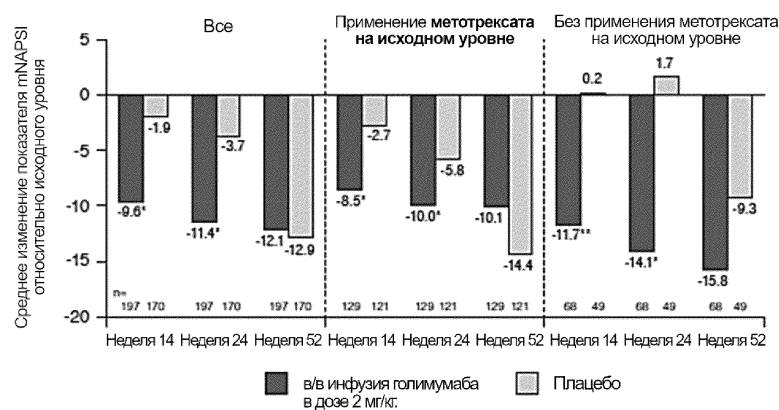
Фиг. 19А



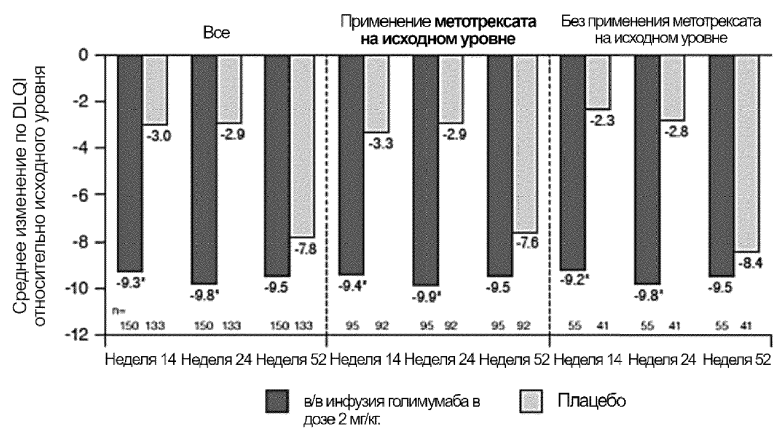
Фиг. 19В



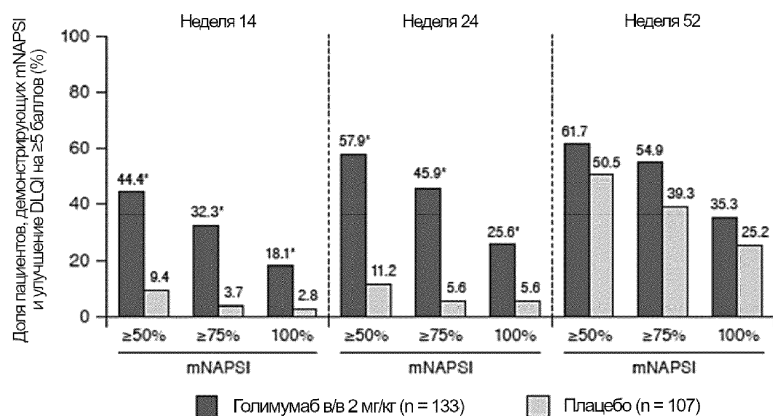
Фиг. 19С



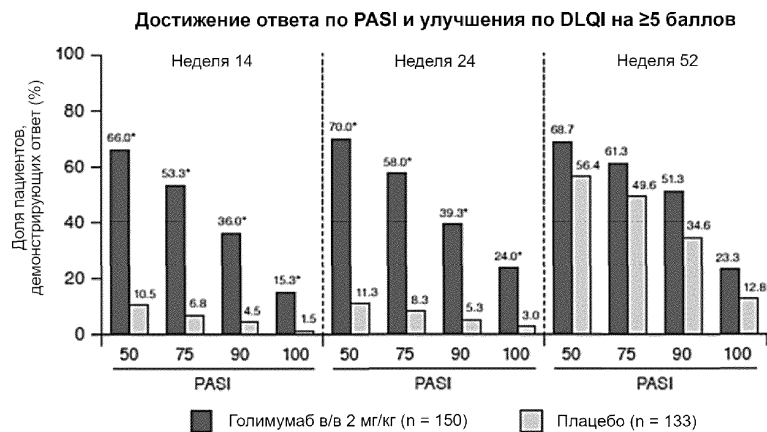
Фиг. 20А



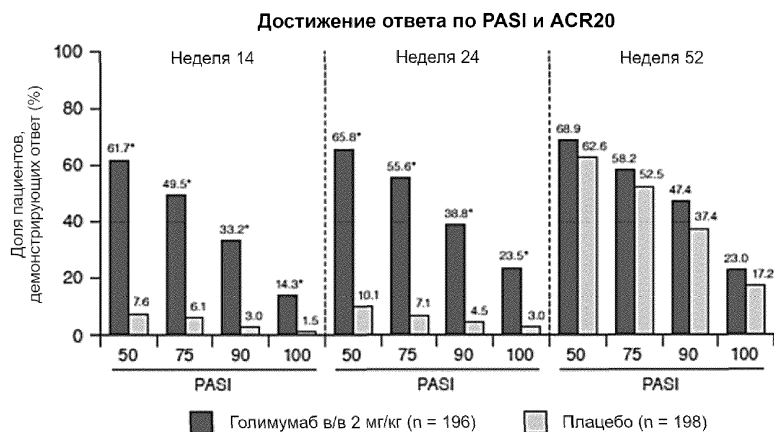
Фиг. 20В



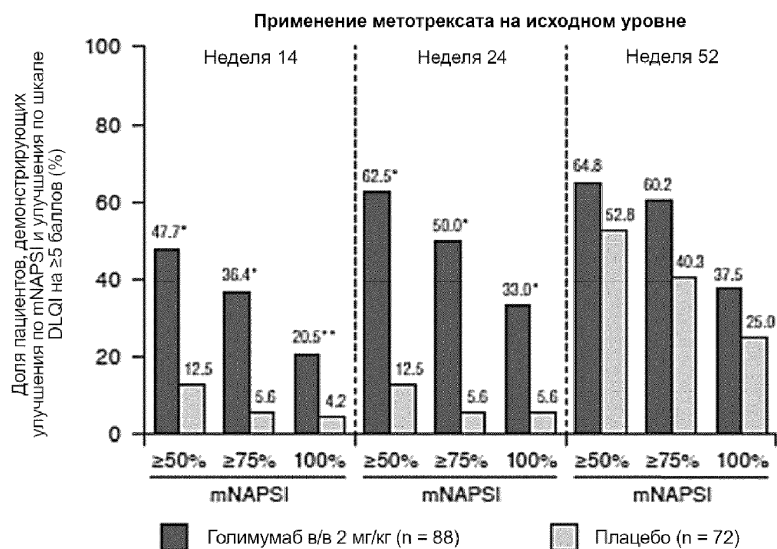
Фиг. 20С



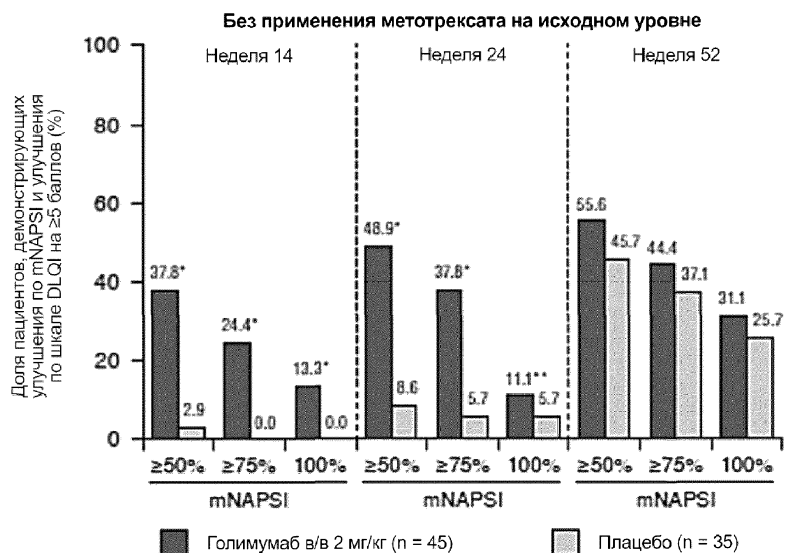
Фиг. 21А



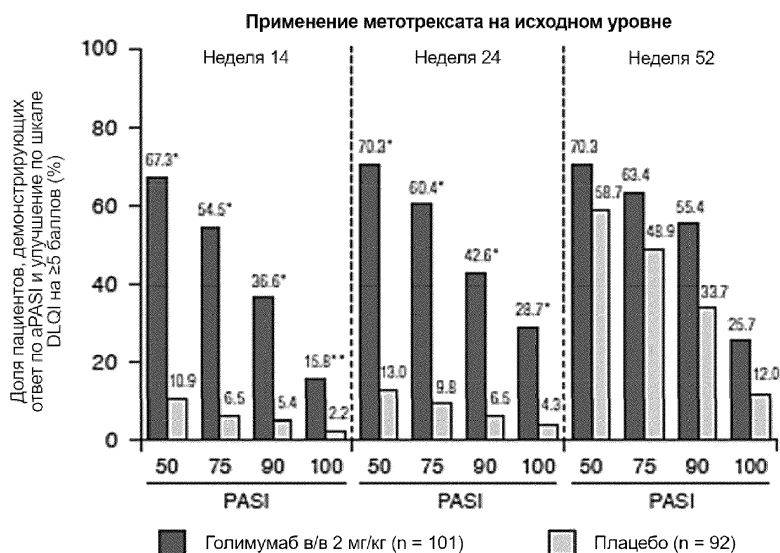
Фиг. 21В



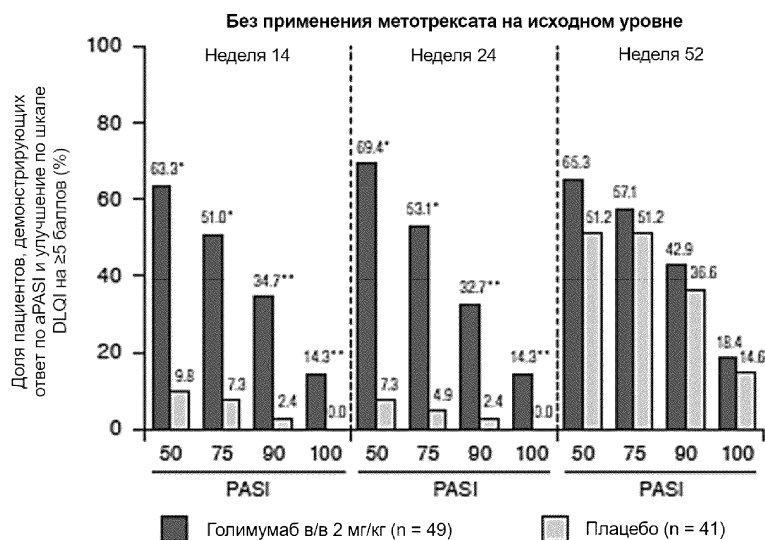
Фиг. 22А



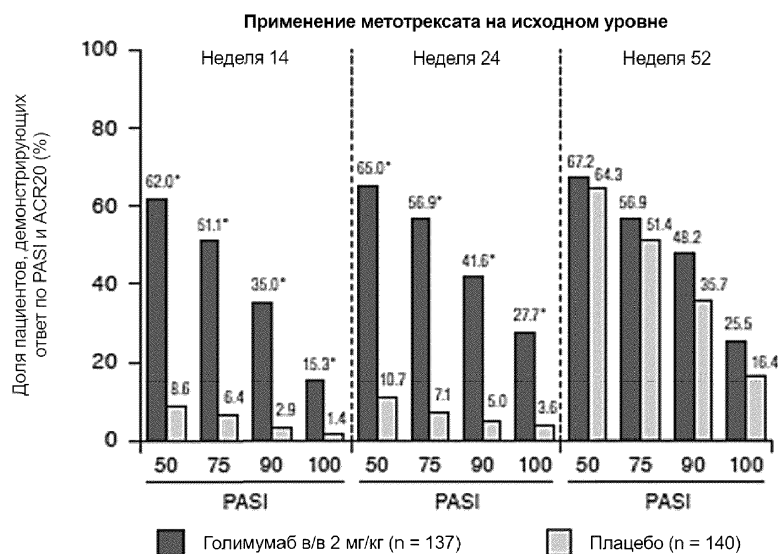
Фиг. 22В



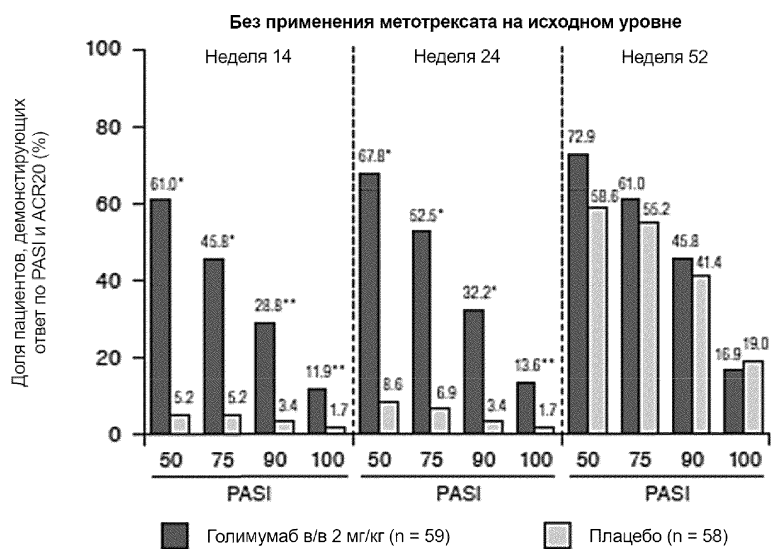
Фиг. 22С



Фиг. 22D



Фиг. 22Е



Фиг. 22F

