



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115461365 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 09

(21) 申请号 202180031397.9

Z · 徐

(22) 申请日 2021.04.26

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(30) 优先权数据

63/015889 2020.04.27 US

63/015894 2020.04.27 US

63/015902 2020.04.27 US

专利代理师 黄登高 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.27

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/053429 2021.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/220140 EN 2021.11.04

(71) 申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

权利要求书2页 说明书121页

序列表19页 附图24页

(72) 发明人 K · 本斯利 M · 克拉克 J · 刘

(54) 发明名称

用于治疗幼年特发性关节炎的物质和方法

(57) 摘要

本发明涉及利用抗TNF抗体,例如具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC)的抗TNF抗体戈利木单抗,用于治疗幼年特发性关节炎(JIA)并且特别是用于多关节幼年特发性关节炎(pJIA)的组合物和方法。

1. 一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法, 所述方法包括向所述儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的抗TNF抗体, 其中所述抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC), 并且其中>50%的所述儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述儿科患者为2岁至小于18岁。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述幼年特发性关节炎 (JIA) 是多关节幼年特发性关节炎 (pJIA)。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中在第0周、第4周和此后每8周, 所述IV剂量是 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的所述抗TNF抗体。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述方法还包括向所述儿科患者施用甲氨蝶呤 (MTX)。

6. 一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法, 所述方法包括向所述儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的抗TNF抗体, 其中所述抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC), 并且其中>20%的所述儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分 (JADAS 71)。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述儿科患者为2岁至小于18岁。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述幼年特发性关节炎 (JIA) 是多关节幼年特发性关节炎 (pJIA)。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其中在第0周、第4周和此后每8周, 所述IV剂量是 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的所述抗TNF抗体。

10. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述方法还包括向所述儿科患者施用甲氨蝶呤 (MTX)。

11. 一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法, 所述方法包括向所述儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的抗TNF抗体, 其中所述抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC), 并且其中所述儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 非活动性疾病的标准。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中>30%的所述儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR非活动性疾病的标准。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述儿科患者为2岁至小于18岁。

14. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述幼年特发性关节炎 (JIA) 是多关节幼年特发性关节炎 (pJIA)。

15. 根据权利要求11所述的方法, 其中在第0周、第4周和此后每8周, 所述IV剂量是 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的所述抗TNF抗体。

16. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述方法还包括向所述儿科患者施用甲氨蝶呤 (MTX)。

17. 一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法, 所述方法包括向所述儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的抗TNF抗体, 其中所述抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基

酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中所述儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中>10%的所述儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR临床缓解的标准。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述儿科患者为2岁至小于18岁。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

21. 根据权利要求17所述的方法,其中在第0周、第4周和此后每8周,所述IV剂量是 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的所述抗TNF抗体。

22. 根据权利要求17所述的方法,其中所述方法还包括向所述儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

用于治疗幼年特发性关节炎的物质和方法

[0001] 以电子方式提交的参考序列表

[0002] 本申请含有序列表,该序列表以电子方式经由EFS-Web作为ASCII格式化序列表提交,文件名为“JBI6307USNP1SeqListing.txt”,创建日期为2021年4月20日,并且大小为25kb。经由EFS-Web提交的该序列表是本说明书的一部分并且全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及利用抗TNF抗体(例如具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC)的抗TNF抗体戈利木单抗)用于治疗幼年特发性关节炎(JIA)并且特别是用于多关节幼年特发性关节炎(pJIA)的组合物和方法。

背景技术

[0004] TNF α 是17kD蛋白质亚基的可溶性同源三聚体。还存在膜结合的26kD前体形式的TNF。

[0005] 除单核细胞或巨噬细胞以外的细胞也产生TNF α 。例如,人非单核细胞肿瘤细胞系产生TNF α 以及CD4⁺和CD8⁺外周血T淋巴细胞,并且一些培养的T细胞系和B细胞系也产生TNF α 。

[0006] TNF α 引起促炎作用,该促炎作用导致组织损伤诸如软骨和骨的降解,粘附分子的诱导,诱导血管内皮细胞上的促凝活性,增加中性粒细胞和淋巴细胞的粘附,以及刺激巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞释放血小板活化因子。

[0007] TNF α 一直以来与感染、免疫障碍、肿瘤病理学、自身免疫病理学和移植物抗宿主病理学相关联。TNF α 与癌症和感染性病理学的关联通常与宿主的分解代谢状态有关。癌症患者体重减轻,通常与厌食症有关联。

[0008] 与癌症和其他疾病相关联的明显消瘦被称为“恶病质”。恶病质包括渐进性体重减轻、厌食和恶性生长引起的瘦体重持续侵蚀。恶病质状态导致很多癌症发病率和死亡率。有证据表明TNF α 与癌症、感染性病理学和其他分解代谢状态中的恶病质有关。

[0009] 据信,TNF α 在革兰氏阴性脓毒症和内毒素休克(包括发烧、不适、厌食和恶病质)中起着重要作用。内毒素强烈激活单核细胞/巨噬细胞的产生以及TNF α 和其他细胞因子的分泌。TNF α 和其他单核细胞衍生的细胞因子介导对内毒素的代谢和神经激素响应。向人类志愿者施用内毒素会产生急性疾病,伴有类似流感的症状,包括发烧、心动过速、代谢率增加和应激激素释放。革兰氏阴性脓毒症患者的循环TNF α 增加。

[0010] 因此,TNF α 涉及炎性疾病、自身免疫疾病、病毒、细菌和寄生虫感染、恶性肿瘤和/或神经退行性疾病,并且是用于疾病诸如类风湿性关节炎和克罗恩氏病的特定生物治疗的有用靶点。已经报道了使用针对TNF α 的单克隆抗体的开放标记试验中的有益效果为抑制炎症,并且在类风湿性关节炎和克罗恩氏病复发后成功再治疗。还报道了在随机化、双盲、安慰剂对照试验中在类风湿性关节炎中具有抑制炎症的有益效果。

[0011] 已在除人类以外的哺乳动物中显示出中和TNF的抗血清或mAb可消除不利的生理

变化,并防止实验性内毒素血症和菌血症的致死剂量攻击后的死亡。这种效应已经在例如啮齿动物致死率测定和灵长类动物病理学模型系统中得到证实。

[0012] 已公开了hTNF的推定受体结合基因座,并且已公开了由TNF的氨基酸11-13、37-42、49-57和155-157组成的TNF α 的受体结合基因座。

[0013] 非人类哺乳动物、嵌合抗体、多克隆抗体(例如,抗血清)和/或单克隆抗体(Mab)以及片段(例如,蛋白水解消化或其融合蛋白质产物)是在一些情况下正在研究以尝试治疗某些疾病的潜在治疗剂。然而,当施用给人类时,此类抗体或片段可引发免疫应答。此类免疫应答可导致免疫复合物介导的抗体或片段从循环中清除,并使重复施用不适于治疗,从而降低对患者的治疗有益效果并限制抗体或片段的重新施用。例如,重复施用包含非人部分的抗体或片段可导致血清病和/或过敏反应。为了避免这些和其他问题,已采取了多种方法来降低此类抗体及其部分的免疫原性,包括本领域所熟知的嵌合和人源化。然而,这些和其他方法仍可导致抗体或片段具有一些免疫原性、低亲和力、低亲合力,或者在细胞培养、放大、生产和/或低产量方面存在问题。因此,此类抗体或片段可能不太适合制造或用作治疗性蛋白质。

[0014] 需要提供克服这些问题中的一个或多个问题的TNF抑制剂,从而导致目前市售的抗TNF抗体和其他TNF抑制剂的开发,例如抗TNF抗体,诸如**REMICADE[®]**(英夫利昔单抗)、**HUMIRA[®]**(阿达木单抗)和**SIMPONI[®]**(戈利木单抗)。其他TNF抑制剂包括例如**CIMZIA[®]**(赛妥珠单抗)、PEG化抗体片段和**ENBREL[®]**(依那西普)、可溶性TNF受体融合蛋白。关于TNF抑制剂的综述,参见例如Lis等人,Arch Med Sci.2014年12月22日;第10卷第6期,第1175页至1185页。

发明内容

[0015] 一般和优选的实施方案分别由本文所附的独立权利要求和从属权利要求限定,为了简洁起见,这些权利要求以引用方式并入本文。根据下面结合附图的详细描述,本发明的各个方面的其他优选的实施方案、特征和优点将是显而易见的。

[0016] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准。

[0017] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>30%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR非活动性疾病的标准。

[0018] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾

病的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0019] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0020] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且在第0周、第4周和此后每8周IV剂量为80mg/m²的抗TNF抗体。

[0021] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准。

[0023] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>30%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR非活动性疾病的标准。

[0024] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0025] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0026] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其

中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且在第0周、第4周和此后每8周该组合物的IV剂量包含80mg/m²的抗TNF抗体。

[0027] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)非活动性疾病的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

[0028] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准。

[0029] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>10%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR临床缓解的标准。

[0030] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0031] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0032] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且在第0周、第4周和此后每8周IV剂量为80mg/m²的抗TNF抗体。

[0033] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

[0034] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎

(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准。

[0035] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>30%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA ACR非活动性疾病的标准。

[0036] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0037] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0038] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且在第0周、第4周和此后每8周该组合物的IV剂量包含80mg/m²的抗TNF抗体。

[0039] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)临床缓解的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

[0040] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR)30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准。

[0041] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链

(LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0042] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0043] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且在第0周、第4周和此后每8周IV剂量为80mg/m²的抗TNF抗体。

[0044] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会(JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

[0045] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)。

[0046] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0047] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0048] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼

年关节炎疾病活动评分 (JADAS 71) 并且在第0周、第4周和此后每8周IV剂量为80mg/m²的抗TNF抗体。

[0049] 在某些实施方案中,本发明提供了一种治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的抗TNF抗体,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分 (JADAS 71) 并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤 (MTX)。

[0050] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准。

[0051] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0052] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且所述幼年特发性关节炎 (JIA) 是多关节幼年特发性关节炎 (pJIA)。

[0053] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且在第0周、第4周和此后每8周该组合物的IV剂量包含80mg/m²的抗TNF抗体。

[0054] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>50%的这些儿科患者在治疗52周后满足JIA美国风湿病学会 (JIA ACR) 30、JIA ACR 50和JIA ACR 70的标准并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤 (MTX)。

[0055] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎 (JIA) 的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内 (IV) 剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链 (HC) 和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链 (LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计

数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)。

[0056] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且所述儿科患者为2至小于18岁。

[0057] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且所述幼年特发性关节炎(JIA)是多关节幼年特发性关节炎(pJIA)。

[0058] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且在第0周、第4周和此后每8周该组合物的IV剂量包含80mg/m²的抗TNF抗体。

[0059] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗儿科患者的幼年特发性关节炎(JIA)的方法,该方法包括向儿科患者施用静脉内(IV)剂量的包含抗TNF抗体的组合物,其中该抗TNF抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链(LC),并且其中>20%的这些儿科患者在治疗52周后具有低疾病活动的计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71)并且该方法还包括向儿科患者施用甲氨蝶呤(MTX)。

附图说明

[0060] 图1示出了显示TNV mAb在杂交瘤细胞上清液中抑制TNF α 结合至重组TNF受体的能力的测定的图示。将不同量的含有已知量TNV mAb的杂交瘤细胞上清液用固定浓度(5ng/ml)的¹²⁵I标记的TNF α 预温育。将混合物转移到已预先用p55-sf2(重组TNF受体/IgG融合蛋白质)包被的96孔光学板中。在洗去未结合的物质并使用 γ 计数器计数后,测定在mAb存在下与p55受体结合的TNF α 的量。尽管在这些实验中测试了八个TNV mAb样本,但为简单起见,这里未显示通过DNA序列分析显示的与其他TNV mAb之一相同的三种mAb。对每个样本一式两份进行测试。所示的结果表示两次独立实验的结果。

[0061] 图2A至图2B示出了TNV mAb重链可变区的DNA序列。所示的种系基因是DP-46基因。“TNV”表示所示序列是TNV14、TNV15、TNV148和TNV196的序列。TNV序列中的前三个核苷酸限定翻译起始Met密码子。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前19个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示以成熟mAb起始的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系

DNA序列(CDR3)中的缺口是由于当时种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb重链使用J6连接区。

[0062] 图3示出了TNV mAb轻链可变区的DNA序列。所示的种系基因是人 κ 种系可变区基因的Vg/38K家族的代表性成员。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前16个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示成熟mAb的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系DNA序列(CDR3)中的缺口是由于种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb轻链使用J3连接序列。

[0063] 图4示出了TNV mAb重链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。DP-46种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“TNV”表明所示序列涉及所有TNV mAb,除非显示了不同的序列。种系序列(CDR3)中的破折号表明该序列在种系基因中是未知的或不存在的。

[0064] 图5示出了TNV mAb轻链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。Vg/38K型轻链种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“所有”表明所示序列涉及TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV186。

[0065] 图6示出了用于制备表达rTNV148B的C466细胞的重链和轻链表达质粒的示意图。p1783是重链质粒,并且p1776是轻链质粒。rTNV148B可变区和恒定区编码结构域显示为黑色框。J-C内含子中的免疫球蛋白增强子显示为灰色框。显示了相关的限制性位点。质粒显示为定向的,使得Ab基因的转录以顺时针方向进行。质粒p1783的长度为19.53kb,并且质粒p1776的长度为15.06kb。两种质粒的完整核苷酸序列是已知的。p1783中的可变区编码序列可通过替换BsiWI/BstBI限制性片段而容易地替换为另一个重链可变区序列。p1776中的可变区编码序列可通过替换SalI/AflIII限制性片段而替换为另一个可变区序列。

[0066] 图7示出了五种产生rTNV148B的细胞系的生长曲线分析的图示。培养开始于第0天,将细胞接种到T75烧瓶中的I5Q+MHX培养基中,使30ml体积中的活细胞密度为 1.0×10^5 个细胞/ml。自执行转染和亚克隆以来,用于这些研究的细胞培养物一直处于连续培养中。在随后的几天,将T烧瓶中的细胞彻底重悬并移除培养物的0.3ml等分试样。当细胞计数降至 1.5×10^5 个细胞/ml以下时,终止生长曲线研究。通过台盼蓝排除法确定等分试样中活细胞的数量,并将等分试样的剩余部分储存用于稍后的mAb浓度测定。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0067] 图8示出了在不同浓度的MHX选择的存在下细胞生长速率的比較的图示。将细胞亚克隆C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM,5% FBS,2mM谷氨酰胺)中并再培养2天。然后将两种细胞培养物分成不含MHX、0.2X MHX或1X MHX的三种培养物。一天后,用培养物

以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。使用SOP PD32.025中的公式计算前5天期间的倍增时间,并显示在条上方。

[0068] 图9示出了来自两个产生rTNV148B的细胞系的mAb产量随时间推移的稳定性的图示。自执行转染和亚克隆以来,一直处于连续培养中的细胞亚克隆用于在24孔培养皿中开始长期连续培养。在具有和不具有MHX选择的I5Q培养基中培养细胞。通过每4至6天分离培养物以维持新的活培养物而连续传代细胞,同时允许先前的培养物耗尽。在培养物耗尽后不久收集用过的细胞上清液的等分试样并储存直至测定mAb浓度。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0069] 图10示出了与实施例4中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg 197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。

[0070] 图11A至图11C示出了基于如实施例4所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周依然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0071] 图12示出了与实施例5中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg 197的重量变化。在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2周、第3周和第4周时从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的诱导性免疫应答和药代动力学清除率。

[0072] 图13A至图13C为表示基于关节炎指数的实施例5中疾病严重程度的进展的图。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差

异。

[0073] 图14示出了与实施例6中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg 197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0074] 图15示出了基于如实施例6所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0075] 图16示出了与实施例7中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg 197的重量变化。比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0076] 图17示出了基于如实施例7所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第8周)。TNV148治疗组和1mg/kg的cA2治疗组均在第4周时显示出AI的显著降低。尽管先前的研究(P-099-017)显示,在单次1mg/kg腹腔内推注后,TNV148在降低关节炎指数方面略有效,但本研究显示两种版本的TNV抗体治疗组的AI均略高。虽然(第6周除外)1mg/kg的cA2治疗组当与10mg/kg cA2组相比时没有显著增加,并且TNV148治疗组在第7周和第8周时显著较高,但在研究中的任何时间点,1mg/kg cA2、1mg/kg TNV148和1mg/kg TNV148B之间不存在AI的显著差异。

[0077] 图18示出了pJIA临床研究设计的图示。DBL=数据库锁,LTE=长期扩展,MSE=重要次要终点,PE=主要终点。在指定时间用箭头标记戈利木单抗80mg/m² IV输注。患者还至少以与研究入选时相同的每周基于BSA的剂量接受商业MTX到第28周。

[0078] 图19示出了整个研究中患者处置的图示。*由于1名患者有超过1个不合格原因,合计51名。AE,不良事件;JIA,幼年特发性关节炎;n,患者数量。

[0079] 图20A-B示出了在具有poly-JIA的患者和成年RA参考群体中按年龄组划分的在第28周观察到的稳态血清谷戈利木单抗浓度($\mu\text{g/mL}$) (A)和血清戈利木单抗浓度的模型预测AUCss($\mu\text{g} \cdot \text{天/mL}$) (B)。框内的水平线表示中值,框的下边缘表示第1四分位数,并且框的上边缘表示第3四分位数。晶须表示1.5 $\times$ 四分位数范围内最极端的观察结果。AUCss,稳态曲线下面积;JIA,幼年特发性关节炎;n,群体中的患者数量;RA,类风湿性关节炎;WK,周。

[0080] 图21A-D示出了到第52周的临床疗效;JIA ACR 30/50/70/90响应者的百分比(A),具有JIA ACR非活动性疾病或药物治疗的临床缓解的患者百分比(B),平均(标准偏差)CHAQ和父母对疼痛的评估评分(C),和平均(95%置信区间)JADAS 71评分(D)。对于(A),在JIA ACR 30、50、70和90的所有时间点,N=127;根据ITT原则,按照NRI和LOCF处理缺失数据。对

于(B),非活动性疾病和药物治疗的临床缓解的所有时间点,N=127。药物治疗的临床缓解被定义为在接受poly-JIA药物治疗时每次访视 ≥ 6 个月的周期内无活动性疾病(涵盖之前至少24周的所有访视必须满足非活动性疾病标准)。根据ITT原则,对于非活动性疾病和临床缓解,按照LOCF和NRI处理缺失数据。对于(C),疼痛和CHAQ评分基于观察到的数据。对于(D),JADAS评分基于观察到的数据。95%置信区间基于正态近似:平均值 $\pm 1.96 \times SD / \sqrt{N}$ 。ACR,美国风湿病学会;BSL,基线;CHAQ,儿童健康评估问卷;HDA,高疾病活动;ID,非活动性疾病;ITT,意向治疗;JADAS,幼年关节炎疾病活动评分;JIA,幼年特发性关节炎;LDA,低疾病活动;LOCF,末次观察推进;N,所有接受治疗的患者;n,可评价患者的数量;NRI,无响应者插补;SD,标准偏差。

具体实施方式

[0081] 本发明提供了包含具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)的抗TNF抗体的组合物以及制备此类抗TNF抗体的制备方法。

[0082] 如本文所用,“抗肿瘤坏死因子 α 抗体”、“抗TNF抗体”、“抗TNF抗体部分”或“抗TNF抗体片段”和/或“抗TNF抗体变体”等包括含有下述分子的任何蛋白质或肽:该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,诸如但不限于,重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分,或者TNF受体或结合蛋白质的至少一个可以结合到本发明的抗体中的部分。此类抗体任选地还影响特异性配体,诸如但不限于,在此类抗体在体外、在原位和/或在体内调节、降低、提高、拮抗、激动、缓和、减轻、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种TNF活性或结合,或者TNF受体活性或结合的情况下。作为非限制性示例,本发明的合适的抗TNF抗体、特定部分或变体可以结合至少一种TNF或其特定部分、变体或结构域。合适的抗TNF抗体、特定部分或变体还可任选地影响至少一种TNF活性或功能,诸如但不限于RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。术语“抗体”还旨在涵盖抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能片段包括结合哺乳动物TNF的抗原结合片段。例如,本发明涵盖能够结合TNF或其部分的抗体片段,包括但不限于Fab片段(例如通过木瓜蛋白酶消化得到)、Fab'片段(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原得到)和F(ab')₂片段(例如通过胃蛋白酶消化得到)、facb片段(例如通过纤溶酶消化得到)、pFc'片段(例如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化得到)、Fd片段(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原以及重聚集得到)、Fv或scFv片段(例如通过分子生物学技术得到)(参见例如Colligan, Immunology, 出处同上)。

[0083] 此类片段可通过如本领域已知和/或如本文所述的酶裂解、合成或重组技术产生。也可使用抗体基因以多种截短形式产生抗体,其中一个或多个终止密码子已引入天然终止位点的上游。例如,可将编码F(ab')₂重链部分的组合基因设计成包括编码重链的CH₁结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的各个部分可通过常规技术用化学方法连接在一起,或可使用遗传工程技术制备为连续蛋白质。

[0084] 如本文所用,术语“人抗体”是指这样的抗体:其中基本上蛋白质的每个部分(例如CDR、框架、C_L、C_H结构域(例如C_H1、C_H2、CH3)、铰链(V_L、V_H))在人类中为基本上无免疫原性的,仅具有小的序列改变或变化。类似地,指明属灵长类(猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类(小鼠、大

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

[0085] 还可以使用双特异性抗体例如DuoBody[®](双特异性抗体)、异种特异性抗体、异种缀合抗体或类似抗体,它们是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆的、优选人或人源化的抗体。在本情况中,结合特异性中的一种针对至少一种TNF蛋白质,另一种结合特异性针对任何其他抗原。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。通常,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuello,Nature 305:537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))产生可能的10种不同抗体分子的混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱步骤进行的正确分子的纯化可能由于低产物收率而效率低下,并且已经开发出不同策略来促进双特异性抗体产生。

[0086] 全长双特异性抗体可以例如使用两个单特异性二价抗体之间的Fab臂交换(或半分子交换)通过下列方式产生:在每个半分子中的重链CH3交界处引入置换以促成两个在体外无细胞环境中或使用共表达而具有不同特异性的抗体半分子的异源二聚体形成。Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3结构域解离-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键被还原。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3域通过解离-缔合而释放和重新形成。可将Fab臂的CH3结构域改造成促成异源二聚化而非同源二聚化。所得产物是具有两个Fab臂或半分子的双特异性抗体,这两个Fab臂或半分子各自结合不同的表位。

[0087] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指具有含有相同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0088] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指具有含有不同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0089] “钮扣(knob-in-hole)”策略(参见例如PCT国际公布W02006/028936)可用于产生全长双特异性抗体。简而言之,在人IgG中形成CH3结构域的交界的选定氨基酸可在影响CH3结构域相互作用的位置处突变,从而促进异源二聚体形成。将具有小侧链(杵)的氨基酸引入特异性地结合第一抗原的抗体的重链中,并将具有大侧链(杵)的氨基酸引入特异性地结合第二抗原的抗体的重链中。在两种抗体共表达后,由于具有“扣”的重链与具有“杵”的重链的优先相互作用而形成异源二聚体。形成钮和扣的示例性CH3置换对(表示为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置)是:T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0090] 还可使用其他策略,诸如通过在一个CH3表面置换带正电荷的残基并在第二CH3表面置换带负电荷的残基使用静电相互作用促进重链异源二聚化,如美国专利公布US2010/

0015133;美国专利公布US2009/0182127;美国专利公布US2010/028637或美国专利公布US2011/0123532中所述。在其他策略中,可通过下面的置换(表示为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置)促进异源二聚化: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、或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布US2012/0149876或美国专利公布US2013/0195849中所述。

[0091] 除上述方法之外,双特异性抗体还可在体外无细胞环境中通过下列方式产生:在两种单特异性同源二聚抗体的CH3区中引入不对称突变,并且在还原条件下由两种亲本单特异性同源二聚抗体形成双特异性异源二聚抗体,从而根据国际专利公布W02011/131746中所述的方法允许二硫键异构化。在所述方法中,将第一单特异性二价抗体和第二单特异性二价抗体工程化为在CH3域处具有促进异源二聚体稳定性的某些置换;将这些抗体在足以使铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一同温育;从而通过Fab臂交换产生双特异性抗体。温育条件最理想地可恢复到非还原条件。可使用的示例性还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇,优选为选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦组成的组的还原剂。例如,可使用如下条件:在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下,在5-8的pH例如pH7.0或pH7.4,至少20℃的温度下,温育至少90分钟。

[0092] 可用于本发明的方法和组合物中的抗TNF抗体(也称作TNF抗体)的特征可任选地在于与TNF高亲和力结合以及任选且优选地具有低毒性。具体地,本发明的抗体、特定片段或变体(其中各个成分,诸如可变区、恒定区和构架区单独和/或共同地任选且优选地具有低免疫原性)可用于本发明中。可用于本发明的抗体的特征任选地在于它们能长期用于治疗患者,可测量地减轻症状并具有低毒性和/或可接受的毒性。低的或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他合适的特性,可有助于实现治疗结果。“低免疫原性”在本文中被定义为在小于约75%,或优选地小于约50%的受治疗的患者中引起显著的HAHA、HACA或HAMA响应,和/或在受治疗的患者中引起低滴度(以双抗原酶免疫测定法测量的小于约300,优选地小于约100)(Elliott等人,Lancet 344:1125-1127(1994),其以引用方式全文并入本文)。

[0093] 效用:本发明的分离核酸可用于产生至少一种抗TNF抗体或其特定变体,其可以用于在细胞、组织、器官或动物(包括哺乳动物和人)中测量或实现,以诊断、监测、调节、治疗、减轻、帮助预防至少一种TNF病症的发生或减轻其症状,所述TNF病症选自但不限于免疫障碍或疾病、心血管障碍或疾病、感染性、恶性和/或神经性障碍或疾病中的至少一者。

[0094] 此类方法可包括向需要对症状、效果或机制进行此类调节、治疗、减轻、预防或减少的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的含有至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。该有效量可以包括每单次施用(例如,推注)、多次施用或连续施用约0.001mg/kg至500mg/kg的量,或者每单次施用、多次施用或连续施用实现0.01-5000μg/ml的血清浓度的量,或者其中的任何有效范围或值,该有效量使用如本文所述的或相关领域中已知的已知方法进行施用和测定。引用。本文引用的所有出版物或专利都以引用方式全文并入本文中,因为它们显示了本发明时的技术发展水平,并且/或者提供了本发明的描述和实现。出版物

是指任何科学出版物或专利公布、或可以任何媒体格式获得的任何其他信息,该媒体格式包括所有记录格式、电子格式或印刷格式。以下参考以引用方式全文并入本文:Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,NY (1987-2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,NY(1989);Harlow和Lane,antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY(1989);Colligan等人编辑,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1994-2001);Colligan等人,Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY,NY,(1997-2001)。

[0095] 本发明的抗体:包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的至少一种抗TNF抗体可任选地通过细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体来生产,如本领域所熟知的。参见例如Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,NY(1987-2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,NY(1989);Harlow和Lane,antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY(1989);Colligan等人编辑,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1994-2001);Colligan等人,Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY,NY,(1997-2001),各自以引用方式全文并入本文。

[0096] 可针对适当的免疫原性抗原产生对人TNF蛋白质或其片段特异的人抗体,诸如分离的和/或TNF蛋白质和/或其部分(包括合成分子,诸如合成肽)。可以类似地产生其他特异或一般性的哺乳动物抗体。使用任何合适的技术可执行免疫原性抗原的制备和单克隆抗体的产生。

[0097] 在一种方法中,杂交瘤是通过合适的无限增殖化细胞系(例如骨髓瘤细胞系,诸如但不限于,Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等,或异型骨髓瘤(heteromyloma),其融合产物,或由其衍生的任何细胞或融合细胞,或如本领域已知的任何其他合适的细胞系。参见,例如www.atcc.org、www.lifetech.com.等与产抗体细胞融合来产生,这些产抗体细胞诸如但不限于分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体细胞或其他免疫细胞或包括B细胞的细胞,或任何这样的其他细胞,它们将重链或轻链恒定序列或可变序列或框架序列或CDR序列表达为内源的或异源的核酸、为重组或内源的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、羊、灵长类动物、真核生物、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或它们的任何组合。参见,例如以引用方式全文并入本文的Ausubel,出处同上,和Colligan,Immunology,出处同上,第2章。

[0098] 产抗体细胞还可从人或已用感兴趣的抗原免疫过的其他合适动物的外周血,或优选地脾或淋巴结获得。任何其他合适的宿主细胞也可用于表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离,并且可通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可通过合适的测定法(例如ELISA)进行选择。

[0099] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于,从以下肽或蛋白质文库选择重组抗体的方法(例如,但不限于,噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA等展示文库;例如,购自Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax, Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys。参见例如EP 368, 684; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); 或随机生成的肽或蛋白质—US 5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862、WO 86/05803、EP 590 689 (Ixsys, 现为Applied Molecular Evolution (AME), 各自以引用方式全文并入本文))或者依赖于转基因动物的免疫(例如SCID小鼠, Nguyen等人, Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu等人, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren等人, Immunol. 93:154-161 (1998), 各自以引用方式以及相关专利和申请全文并入本文)能够产生全套人抗体,如本领域已知和/或如本文所述。此类技术包括但不限于核糖体展示(Hanes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (1997年5月); Hanes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (1998年11月)); 单细胞抗体产生技术(例如,选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利5,627,052, Wen等人, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); 凝胶微滴和流式细胞术(Powell等人, Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray等人, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny等人, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B细胞选择(Steenbakkers等人, Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak等人, Progress Biotech, 第5卷, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck编辑, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

[0100] 还可使用用于将非人或人抗体进行工程化或人源化的方法,这些方法是本领域所熟知的。一般来讲,人源化或工程化的抗体具有一个或多个来自非人来源的氨基酸残基,所述非人来源是例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基,它们一般取自己知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。

[0101] 已知的人Ig序列在许多出版物和网站中公开,例如:

[0102] www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

[0103] www.atcc.org/phage/hdb.html;

[0104] www.sciquest.com/;

[0105] www.abcam.com/;

[0106] www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;

[0107] www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;

[0108] www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;

- [0109] www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
- [0110] www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
- [0111] www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
- [0112] www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
- [0113] www.antibodyresource.com/;
- [0114] www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
- [0115] www.immunologylink.com/;
- [0116] www.pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
- [0117] www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
- [0118] www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
- [0119] www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
- [0120] www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
- [0121] www.biodesign.com/table.asp;
- [0122] www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
- [0123] www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
- [0124] www.isac-net.org/sites_geo.html;
- [0125] www.aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
- [0126] www.baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
- [0127] www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
- [0128] www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
- [0129] www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
- [0130] www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
- [0131] www.abgen.cvm.tamu.edu/lab/;
- [0132] www.abgen.html;
- [0133] www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html;
- [0134] www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
- [0135] www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caaewg/caaewg.htm;
- [0136] www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
- [0137] www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
- [0138] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
- [0139] www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
- [0140] www.jerini.de/frproducts.html;
- [0141] www.patents.ibm.com/ibm.html。Kabat等人,
- [0142] “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health, 1983年,各自以引用方式全文并入本文。

[0143] 此类输入序列可用于降低免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、结合率、解离率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他合适的特征,如本领域已知的。一般来讲,保留部分或全部非人或人CDR序列,而可变区和恒定区的非人序列用人或其他氨基酸置换。抗体还可以任选地人源化为保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这个目

标,人源化抗体还可以任选地使用亲本和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上的人源化产物的分析过程进行制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的并且是为本领域的技术人员所熟悉的。举例说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。这些展示的检测使得能分析在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中残基的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有和输入序列中选择和组合FR残基,从而能实现所需抗体特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。通常,CDR残基直接且基本上大多数涉及影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程化可使用任何已知方法执行,诸如但不限于以下中所描述的那些,Winter (Jones等人, Nature 321:522 (1986); Riechmann等人, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen等人, Science 239:1534 (1988)); Sims等人, J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta等人, J. Immunol. 151:2623 (1993), 美国专利:5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5,766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539、4816567; PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755; WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP 229246,各自以引用方式全文并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0144] 如本文所述和/或如本领域已知的,还可以通过能对产生全套人抗体的转基因动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等)进行免疫来任选地产生抗TNF抗体。可使用合适的方法,诸如本文描述的方法,从此类动物分离产生人抗TNF的抗体的细胞并使其无限增殖化。

[0145] 可以产生与人抗原结合的全套人抗体的转基因小鼠可以通过已知方法产生(例如但不限于美国专利:5,770,428、5,569,825、5,545,806、5,625,126、5,625,825、5,633,425、5,661,016和5,789,650,授予Lonberg等人; Jakobovits等人, WO 98/50433; Jakobovits等人, WO 98/24893; Lonberg等人, WO 98/24884; Lonberg等人, WO 97/13852; Lonberg等人, WO 94/25585; Kucherlapate等人, WO 96/34096; Kucherlapate等人, EP 0463 151B1; Kucherlapate等人, EP 0710 719A1; Surani等人, 美国专利5,545,807; Bruggemann等人, WO 90/04036; Bruggemann等人, EP0438 474B1; Lonberg等人, EP 0814 259A2; Lonberg等人, GB 2 272 440A; Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994); Taylor等人, Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994); Green等人, Nature Genetics 7:13-21 (1994); Mendez等人, Nature Genetics 15:146-156 (1997); Taylor等人, Nucleic Acids Research 20 (23):6287-6295 (1992); Tuailon等人, Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) 3720-3724 (1993); Lonberg等人, Int Rev Immunol 13 (1):65-93 (1995) 和Fishwald等人, Nat Biotechnol 14 (7):845-851 (1996), 其各自以引用方式全文并入本文中)。一般来讲,这些小鼠包含至少一种包含来自至少一个发生了功能性重排或可经历功能性重排的人免疫球蛋白基因座的DNA的转基因。此类小鼠中的内源免疫球蛋白基因座可以被破坏或缺失,以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0146] 可使用肽展示文库方便地实现对与相似蛋白质或片段特异性结合的抗体的筛选。这种方法涉及在大型肽集合中筛选具有所需功能或结构的个别成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域熟知的。所展示的肽序列的长度可以为3至5000个或更多个氨基酸,常常长为5-

100个氨基酸,通常长为约8至25个氨基酸。除了用于产生肽文库的直接化学合成方法之外,有几种重组DNA方法也已得到描述。一种类型涉及在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞均含有编码具体展示的肽序列的核苷酸序列。这类方法描述于PCT专利公布91/17271、91/18980、91/19818和93/08278。用于产生肽文库的其他系统同时具有体外化学合成方法和重组方法的各方面。参见PCT专利公布92/05258、92/14843和96/19256。还可参见美国专利5,658,754;和5,643,768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从诸如Invitrogen (Carlsbad,CA) 和Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire,UK) 的供应商商购获得。参见例如美国专利4704692、4939666、4946778、5260203、5455030、5518889、5534621、5656730、5763733、5767260、5856456,转让给Enzon;5223409、5403484、5571698、5837500,转让给Dyax,5427908、5580717,转让给Affymax;5885793,转让给Cambridge antibody Technologies;5750373,转让给Genentech,5618920、5595898、5576195、5698435、5693493、5698417,转让给Xoma,Colligan,出处同上;Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上,以上专利和出版物中的每一者以引用方式全文并入本文。

[0147] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因动物或哺乳动物,诸如山羊、奶牛、马、绵羊等,也可以制备本发明的抗体,所述转基因动物或哺乳动物能够在它们的奶中产生此类抗体。此类动物可使用已知的方法提供。参见例如但不限于美国专利5,827,690;5,849,992;4,873,316;5,849,992;5,994,616;5,565,362;5,304,489等,这些专利中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0148] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草和玉米),也可以制备本发明的抗体,所述转基因植物和培养的植物细胞在其植物部分或从植物部分培养得到的细胞中产生此类抗体、其特定部分或变体。作为非限制性示例,表达重组蛋白质的转基因烟草叶已成功地用于提供大量重组蛋白质,例如使用诱导型启动子。参见,例如Cramer等人,Curr.Top.Microbol.Immunol.240:95-118(1999),以及其中引用的参考文献。同样,转基因玉米也已用于以商业生产规模表达哺乳动物蛋白质,其生物活性等同于在其他重组系统中生产或从天然来源纯化的那些哺乳动物蛋白质。参见,例如Hood等人,Adv.Exp.Med.Biol.)464:127-147(1999),以及其中引用的参考文献。也可由转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎)大量生产抗体,包括抗体片段,诸如单链抗体(scFv)。参见,例如Conrad等人,Plant Mol.Biol.)38:101-109(1998),以及其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体还可使用转基因植物根据已知方法进行生产。还可参见,例如Fischer等人,Biotechnol.Appl.Biochem.30:99-108(Oct.,1999);Ma等人,Trends Biotechnol.13:522-7(1995);Ma等人,Plant Physiol.109:341-6(1995);Whitelam等人,Biochem.Soc.胞吞转运22:940-944(1994);以及其中引用的参考文献。以上参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0149] 本发明的抗体可以宽范围的亲和力(K_D)结合人TNF。在一个优选的实施方案中,本发明的至少一种人mAb可任选地以高的亲和力结合人TNF。例如,人mAb可以等于或小于约 10^{-7} M,诸如但不限于0.1-9.9(或其中的任何范围或数值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或数值的 K_D 结合人TNF。

[0150] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何合适的方法通过实验确定。(参见例如Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions,”In Fundamental Immunology,

Paul, W.E. 编辑, Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, NY (1992); 以及本文所述的方法)。如果在不同的条件(例如, 盐浓度、pH)下测量, 则测得的特定抗体-抗原相互作用的亲和力会不同。因此, 亲和力和其他抗原结合参数(例如 K_D 、 K_a 、 K_d)的测量优选使用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液(例如本文所述的缓冲液)来进行。

[0151] 核酸分子。使用本文提供的信息, 诸如编码SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8中的至少一者的至少70%-100%的邻接氨基酸的核苷酸序列、其特定片段、变体或共有序列, 或者包含这些序列中的至少一者的经寄载体, 可使用本文描述的或如本领域已知的方法获得编码包含SEQ ID NO: 1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO: 4、5和6的所有轻链可变CDR区的至少一种抗TNF抗体的本发明核酸分子。

[0152] 本发明的核酸分子可以是RNA的形式, 诸如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其他形式, 或者为DNA的形式, 包括但不限于, 通过克隆或合成产生的cDNA和基因组DNA, 或它们的任何组合。DNA可以为三链的、双链的或单链的或它们的任何组合。DNA或RNA的至少一条链的任何部分可以是编码链, 也称为有义链, 或其可以是非编码链, 也称为反义链。

[0153] 本发明的分离核酸分子可包括具有开放阅读框(ORF), 任选地具有一个或多个内含子的核酸分子, 例如但不限于至少一个CDR的至少一个指定部分, 如至少一条重链(例如SEQ ID NO: 1-3)或轻链(例如SEQ ID NO: 4-6)的CDR1、CDR2和/或CDR3; 包含抗TNF抗体或可变区的编码序列的核酸分子(例如, SEQ ID NO: 7、8); 以及包含与上述那些显著不同的核苷酸序列, 但由于遗传密码的简并性, 仍然编码至少一种如本文所述和/或如本领域中已知的抗TNF抗体的核酸分子。当然, 遗传密码是本领域熟知的。因此, 对于本领域技术人员而言, 应该可以按常规产生编码本发明的特异性抗TNF抗体的此类简并核酸变体。参见例如Ausubel等人, 出处同上, 并且此类核酸变体包括在本发明中。本发明的分离的核酸分子的非限制性示例包括SEQ ID NO: 10、11、12、13、14、15, 分别对应于编码HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC可变区和LC可变区的核酸的非限制性示例。

[0154] 如本文所指出, 本发明核酸分子包含编码抗TNF抗体的核酸, 所述核酸可包括但不限于单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些核酸; 整个抗体或其部分的编码序列; 抗体、片段或部分的编码序列以及附加序列, 诸如具有或不具有上述附加编码序列的至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列; 诸如至少一个内含子; 还包括附加非编码序列, 包括但不限于非编码5'和3'序列, 诸如在转录、mRNA加工(包括剪接和聚腺苷化信号(例如mRNA的核糖体结合和稳定))中发挥作用的转录、非翻译序列; 编码附加氨基酸, 诸如提供附加功能的那些氨基酸的附加编码序列。因此, 编码抗体的序列可以与标记序列诸如编码肽的序列融合, 所述肽可促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化。

[0155] 与本文所述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸。本发明提供在选择性杂交条件下与本文所公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此, 本实施方案的多核苷酸可用于分离、检测和/或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如, 本发明的多核苷酸可用于鉴定、分离或扩增寄存文库中的部分或全长克隆。在一些实施方案中, 多核苷酸是分离的基因组序列或cDNA序列, 或与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA互补。

[0156] 优选地, cDNA文库包含至少80%全长序列, 优选地至少85%或90%全长序列, 更优选地至少95%全长序列。cDNA文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格

杂交条件一般但不是唯一地用于相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列。中等和高严格条件可以任选地用于同一性更大的序列。低严格条件允许具有约70%序列同一性的序列进行选择杂交,并且可用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0157] 任选地,本发明的多核苷酸将编码由本文所述多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如Ausubel(出处同上);Colligan(出处同上),各自以引用方式全文并入本文。

[0158] 核酸的构建。可使用本领域熟知的(a)重组方法、(b)合成技术、(c)纯化技术或它们的组合来制备本发明的分离的核酸。

[0159] 所述核酸可方便地包含除了本发明的多核苷酸之外的序列。例如,可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸中以帮助该多核苷酸的分离。此外,可以插入可翻译序列以帮助分离翻译出的本发明多核苷酸。例如,六组氨酸标记序列为纯化本发明的蛋白质提供了便利手段。本发明的核酸(编码序列除外)任选地为用于克隆和/或表达本发明多核苷酸的载体、衔接子或接头。

[0160] 可将附加序列添加此类克隆和/或表达序列来优化它们在克隆和/或表达中的功能,以帮助分离所述多核苷酸,或改善该多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域熟知的。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上)。

[0161] 用于构建核酸的重组方法。本发明的分离的核酸组合物,诸如RNA、cDNA、基因组DNA或它们的任何组合,可使用多种本领域技术人员已知的克隆方法从生物学来源获得。在一些实施方案中,将在严格条件下与本发明多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在cDNA或基因组DNA文库中鉴定所需序列。RNA的分离,以及cDNA和基因组文库的构建是本领域普通技术人员熟知的。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上)。

[0162] 核酸筛选和分离方法。cDNA或基因组文库可使用基于本发明多核苷酸的序列(诸如本文所公开的那些)的探针进行筛选。探针可用于与基因组DNA或cDNA序列杂交以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域的技术人员将会知道,在测定中可以采用各种严格性程度的杂交;并且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格,在探针和靶之间必须存在更高层次的互补性才能使双链体形成得以发生。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH和部分变性溶剂诸如甲酰胺的存在中的一者或多者加以控制。例如,通过例如在0%至50%的范围内操纵甲酰胺的浓度使反应物溶液的极性变化,从而方便地改变杂交的严格性。对于可检测结合所需的互补性程度(序列同一性)将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度将最佳为100%或70%-100%或其中的任何范围或值。然而应当理解,探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0163] 扩增RNA或DNA的方法是本领域熟知的,并且基于本文呈现的教导和指导,无需过度实验即可根据本发明使用。

[0164] 已知的DNA或RNA扩增方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)和相关的扩增方法(参见例如授予Mullis等人的美国专利4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188;授予Tabor等人的4,795,699和4,921,794;授予Innis的5,142,033;授予Wilson等人的5,122,464;授予Innis的5,091,310;授予Gyllensten等人的5,066,584;授予Gelfand等人的4,

889,818;授予Silver等人的4,994,370;授予Biswas的4,766,067;授予Ringold的4,656,134)以及使用靶序列的反义RNA作为双链DNA合成模板的RNA介导的扩增(授予Malek等人的美国专利5,130,238,其商品名为NASBA),这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上。)

[0165] 例如,可使用聚合酶链反应(PCR)技术直接从基因组DNA或cDNA文库扩增本发明的多核苷酸和相关基因的序列。例如PCR和其他体外扩增方法也可用于克隆编码待表达的蛋白质的核酸序列、制备核酸以用作探针来检测样本中所需mRNA的存在,用于核酸测序,或用于其他目的。足以在整个体外扩增方法中指导技术人员的技术的示例可见于Berger(出处同上)、Sambrook(出处同上)和Ausubel(出处同上),以及Mullis等人的美国专利4,683,202(1987);以及Innis等人,PCR Protocols A Guide to Methods and Applications,Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA(1990)。用于基因组PCR扩增的可商购获得的试剂盒是本领域已知的。参见例如,Advantage-GC Genomic PCR Kit(Clontech)。此外,例如,T4基因32蛋白质(Boehringer Mannheim)可用于提高长PCR产物的得率。

[0166] 用于构建核酸的合成方法。本发明的分离的核酸还可通过已知方法通过直接化学合成进行制备(参见,例如Ausubel等人,出处同上)。化学合成一般会产生单链寡核苷酸,其可以通过与互补序列杂交,或通过使用该单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合而转变成双链DNA。本领域技术人员将认识到,虽然DNA的化学合成可能限制于约100个或更多个碱基的序列,但较长的序列可以通过连接较短序列来获得。

[0167] 重组表达盒。本发明还提供包含本发明核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列,例如编码本发明抗体的cDNA或基因组序列,可用于构建可导入到至少一种所需宿主细胞中的重组表达盒。重组表达盒通常会包含与转录起始调节序列可操作地连接的本发明多核苷酸,所述转录起始调节序列会引导所述多核苷酸在预定的宿主细胞中的转录。异源和非异源(即内源)启动子两者均可用于引导本发明核酸的表达。

[0168] 在一些实施方案中,可在非异源形式的本发明多核苷酸的适当位置(上游、下游或内含子中)引入作为启动子、增强子或其他元件的分离核酸,以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如,可通过突变、缺失和/或置换在体内或体外改变内源启动子。

[0169] 载体和宿主细胞。本发明还涉及包含本发明的分离的核酸分子的载体、用该重组载体进行遗传工程改造的宿主细胞以及通过本领域熟知的重组技术生产至少一种抗TNF抗体。参见例如Sambrook等人(出处同上);Ausubel等人(出处同上),各自全文以引用方式并入本文。

[0170] 可将所述多核苷酸任选地与包括可选择标记的载体连接,以在宿主中增殖。一般来讲,质粒载体在沉淀物诸如磷酸钙沉淀物中,或在与带电脂质的复合物中被导入。如果载体是病毒,那么它可以使用适当的包装细胞系在体外进行包装并且然后转导进宿主细胞内。

[0171] 应将DNA插入物与适当的启动子可操作地连接。表达构建体还会含有转录起始位点、终止位点以及在转录区中含有用于翻译的核糖体结合位点。该构建体表达的成熟转录物的编码部分将优选地包括在待翻译的mRNA开始处的翻译起始位点和在该mRNA末端适当位置的终止密码子(例如,UAA、UGA或UAG),对于哺乳动物或真核细胞表达优选UAA和UAG。

[0172] 表达载体将优选但任选地包括至少一个可选择标记。此类标记包括例如但不限

于:对于真核细胞培养物,为甲氨喋呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR,美国专利4,399,216;4,634,665;4,656,134;4,956,288;5,149,636;5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS,美国专利5,122,464;5,770,359;5,827,739)抗性基因;以及对于大肠杆菌(*E.coli*)和其他细菌或原核生物培养,为四环素或氨苄青霉素抗性基因(以上专利以引用方式全文并入本文)。用于上述宿主细胞的适当的培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员来说将是显而易见的。载体构建体导入宿主细胞可受到磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他已知方法的影响。此类方法已在本领域中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第1-4章和第16-18章;Ausubel(出处同上),第1、9、13、15、16章。

[0173] 本发明的至少一种抗体可以修饰形式(诸如融合蛋白质)表达,并且可不仅包括分泌信号,而且还可包括附加异源功能区。例如,可将附加氨基酸(尤其是带电氨基酸)的区域添加至抗体的N-端,以改善纯化期间或随后的处理和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可将肽部分添加至本发明的抗体以帮助纯化。此类区域可在抗体或其至少一个片段的最终制备之前去除。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第17.29-17.42章和第18.1-18.74章;Ausubel(出处同上),第16、17和18章。

[0174] 本领域技术人员可认识到许多表达系统可用于表达编码本发明蛋白质的核酸。

[0175] 另选地,本发明的核酸可在含有编码本发明抗体的内源DNA的宿主细胞中通过开启(通过操纵)而在宿主细胞中表达。此类方法是本领域熟知的,例如,如美国专利5,580,734、5,641,670、5,733,746和5,733,761中所述,所述专利以引用方式全文并入本文。

[0176] 可用于生产抗体、其特定部分或变体的例示性细胞培养物是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式,但也可使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。在本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的合适宿主细胞系,包括COS-1(例如ATCC CRL 1650)、COS-7(例如ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如ATCC CRL-10)、CHO(例如ATCC CRL 1610)和BSC-1(例如ATCC CRL-26)细胞系,Cos-7细胞、CHO细胞、hep G2细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293细胞、HeLa细胞等,它们可容易地从例如美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA)获得。优选的宿主细胞包括CHO细胞和淋巴来源的细胞,诸如骨髓瘤细胞和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是CHO细胞、P3X63Ag8.653细胞(ATCC登记号CRL-1580)和SP2/0-Ag14细胞(ATCC登记号CRL-1851)。

[0177] 这些细胞的表达载体可包括以下的表达控制序列中的一者或多者,诸如但不限于:复制起点;启动子(例如,晚期或早期SV40启动子、CMV启动子(美国专利5,168,062;5,385,839)、HSV tk启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利5,266,491)、至少一种人免疫球蛋白启动子;增强子和/或加工信息位点诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点(例如SV40大T Ag聚A添加位点)和转录终止子序列。参见例如Ausubel等人(出处同上);Sambrook等人(出处同上)。可用于产生本发明的核酸或蛋白质的其他细胞也是已知的和/或可例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录或其他已知的来源或商业来源得到。

[0178] 当使用真核宿主细胞时,通常会将多腺苷酸化或转录终止序列并入载体内。终止序列的示例是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的示例是来自SV40的VP1内含子(Sprague等人,J.Virol.45:773-781(1983))。

另外,如本领域已知,可将控制在宿主细胞中的复制的基因序列并入载体中。

[0179] 抗体的纯化。抗TNF抗体可通过公知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化,该方法包括但不限于蛋白质A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱(“HPLC”)也可以用于纯化。参见,例如Colligan,Current Protocols in Immunology或Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY,NY,(1997-2001),例如第1、4、6、8、9、10章,各自以引用方式全文并入本文。

[0180] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物和通过重组技术从真核宿主产生的产物,所述真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。根据重组生产程序中所采用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,糖基化的是优选的。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook,出处同上;Ausubel,出处同上,第10、12、13、16、18和20章,Colligan,Protein Science,出处同上,第12-14章,所有均以引用方式全文并入本文。

[0181] 示例性抗TNF抗体

[0182] 包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的分离的抗体包含本文所公开的由任何合适的多核苷酸编码的抗体氨基酸序列,或者任何分离的或制备的抗体。优选地,人抗体或抗原结合片段结合人TNF,从而部分或基本上中和该蛋白质的至少一种生物学活性。部分或优选地基本上中和至少一种TNF蛋白质或片段的至少一种生物学活性的抗体或其特定部分或变体可结合该蛋白质或片段,从而抑制通过TNF与TNF受体的结合或通过其他TNF依赖性的或介导的机制所介导的活性。如本文所用,术语“中和抗体”是指取决于测定法,可以使TNF依赖性活性被抑制约20%-120%的抗体,优选地至少约10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多。抗TNF抗体抑制TNF依赖性活性的能力,优选地通过至少一种如本文所述和/或如本领域已知的合适的TNF蛋白质或受体测定法来进行评估。本发明的人抗体可以是任何类型(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD等)或同种型,并且可包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施方案中,人抗体包含IgG重链或确定的片段,例如,同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的至少一者。这种类型的抗体可以如本文所述的和/或如本领域公知的通过使用转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物来制备,所述动物包含至少一种人轻链(例如IgG、IgA和IgM(例如, $\gamma 1$ 、 $\delta \gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$))转基因。在另一个实施方案中,抗人TNF人抗体包含IgG1重链和IgG1轻链。

[0183] 如本文所用,术语“抗体”或“多种抗体”包括根据2009年的生物制品价格竞争和创新法案(BPCI Act)和全球类似法律法规批准的生物仿制抗体分子。根据BPCI Act,如果数据显示,抗体与参考产品“高度相似”,但是临床非活性组分具有微小差异,并且在安全性、纯度和效能方面“预期”产生与参考产品相同的临床结果,则可证实抗体是生物仿制的(Endocrine Practice:2018年2月,第24卷,第2期,第195-204页)。为这些生物仿制药抗体分子提供了简化的批准途径,从而使申请人能够依靠创新药参考产品的临床数据来确保监管批准。与基于成功临床试验被FDA批准的原始创新药参考抗体相比,生物仿制药抗体分子在本文中称为“后续生物制剂”。如本文所示,SIMPONI®(戈利木单抗)是基于成功临床试验获得FDA批准的原始创新药参考抗TNF抗体。戈利木单抗自2009年以来已在美国销售。

[0184] 示例序列

[0185] 在各种实施方案中, TNF抑制剂包括抗TNF抗体 **SIMPONI[®]** (戈利木单抗) 或其抗原结合片段, 该抗原结合片段包含如下所示的序列。关于抗TNF抗体 **SIMPONI[®]** (戈利木单抗) 和其他抗TNF抗体的更多信息, 参见例如美国专利7,250,165; 7,691,378; 7,521,206; 7,815,909; 7,820,169; 8,241,899; 8,603,778; 9,321,836; 和9,828,424。

[0186] 示例抗TNF抗体序列例如 **SIMPONI[®]** (戈利木单抗)

[0187] 重链CDR (HCDR) 和轻链CDR (LCDR) 由Kabat限定。

[0188] 带有下划线CDR的戈利木单抗重链 (HC) 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:36)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA
PGNGLEWVAF MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
GIAAGGNYYY YGMDVWGQGT

[0189]

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

[0190] IEKTISKAKG QPREPQVYTL

361 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT

421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 456

[0191] 带有下划线CDR的戈利木单抗轻链 (LC) 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:37)

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQK
GQAPRLLIYD ASNRATGIPA

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG

[0192] PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP

121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS
QESVTEQDSK DSTYSLSTL

181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

[0193] 带有下划线CDR的戈利木单抗可变重链 (VH) 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:38)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA
PGNGLEWVAF MSYDGSNKKY

[0194] 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
GIAAGGNYYY YGMDVWGQGT

121 TVTVSS

[0195] 带下划线CDR的戈利木单抗可变轻链 (VL) 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:39)

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP
GQAPRLLIYD ASNRATGIPA

[0196] 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG
PGTKVDIKRT V

[0197] 戈利木单抗重链互补决定区1的氨基酸序列 (HCDR1): (SEQ ID NO:40)

[0198] SYAMH

[0199] 戈利木单抗抗体重链互补决定区2的氨基酸序列 (HCDR2): (SEQ ID NO:41)

[0200] FMSYDGSNKKYADSVKG

[0201] 戈利木单抗重链互补决定区3的氨基酸序列 (HCDR3): (SEQ ID NO:42)

[0202] DRGIAAGGNYYYYGMDV

[0203] 戈利木单抗轻链互补决定区1的氨基酸序列 (LCDR1): (SEQ ID NO:43)

[0204] RASQSVSYLA

[0205] 戈利木单抗轻链互补决定区2的氨基酸序列 (LCDR2): (SEQ ID NO:44)

[0206] DASNRAT

[0207] 戈利木单抗轻链互补决定区3的氨基酸序列 (LCDRL): (SEQ ID NO:45)

[0208] QQRSNWPPFT

[0209] 本发明的至少一种抗体结合至少一个特定表位,该表位对至少一种TNF蛋白质、亚基、片段、部分或它们的任何组合是特异性的。该至少一个表位可包含至少一个抗体结合区,该抗体结合区包含所述蛋白质的至少一部分,该表位优选地由所述蛋白质的至少一个细胞外的、可溶性的、亲水的、外部的或胞质的部分构成。该至少一个特定表位可包含这样的至少一种氨基酸序列的任何组合,所述至少一种氨基酸序列为SEQ ID NO:9的邻接氨基酸的至少1-3个氨基酸至整个特定部分。

[0210] 一般来讲,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含这样的抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 或至少一个重链可变区的变体以及至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 或至少一个轻链可变区的变体。作为非限制性示例,抗体或抗原结合部分或变体可包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3和/或具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3中的至少一者。在一个具体实施方案中,抗体或抗原结合片段可具有抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个重链CDR (即,CDR1、CDR2和/或CDR3) 的至少一部分,该重链CDR具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列 (例如SEQ ID NO:1、2和/或3)。在另一个具体实施方案中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有抗原结合区,所述抗原结合区包含具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列 (例如SEQ ID NO:4、5和/或6) 的至少一个轻链CDR (即CDR1、CDR2和/或CDR3) 的至少一部分。在一个优选的实施方案

案中,抗体或抗原结合片段的三个重链CDR和三个轻链CDR具有如本文所述的mAb TNV148、TNV14、TNV15、TNV196、TNV118、TNV32、TNV86中的至少一种的对应CDR的氨基酸序列。此类抗体可通过以下方法制备:使用常规技术将抗体的各个部分(例如CDR、框架)化学连接在一起,使用重组DNA技术的常规技术或通过使用任何其他合适的方法制备并表达编码该抗体的(即一种或多种)核酸分子。

[0211] 抗TNF抗体可包含具有确定氨基酸序列的重链或轻链可变区中的至少一者。例如,在一个优选的实施方案中,抗TNF抗体包含任选地具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个重链可变区,和/或任选地具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的至少一个轻链可变区。结合到人TNF并且包含限定的重链或轻链可变区的抗体可使用如本领域已知和/或如本文所述的合适方法诸如噬菌体展示(Katsube,Y.等人,Int J Mol.Med,1(5):863-868(1998))或采用转基因动物的方法制备。例如,可以用人TNF或其片段,对包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因和包含来自可经历功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的DNA的转基因的转基因小鼠进行免疫,以引发抗体的产生。如果需要,可以对产生抗体的细胞进行分离,并且可以如本文所述和/或如本领域已知制备杂交瘤或其他无限增殖化的产生抗体的细胞。另选地,可以使用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达抗体、特定部分或变体。

[0212] 本发明还涉及其包含的氨基酸序列基本上与本文所述的氨基酸序列相同的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和CDR。优选地,此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或CDR的抗体可以高的亲和力(例如小于或等于约 10^{-9} M的 K_D)结合人TNF。与本文所述序列基本上相同的氨基酸序列包括具有保守氨基酸置换以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸置换是指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸,所述第二种氨基酸具有的化学和/或物理特性(例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)与第一种氨基酸相似。保守置换包括在以下组中用一种氨基酸置换另一种氨基酸:赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H);天冬氨酸(D)和谷氨酸(E);天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)、K、R、H、D和E;丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)和甘氨酸(G);F、W和Y;C、S和T。

[0213] 氨基酸代码。构成本发明的抗TNF抗体的氨基酸通常采用缩写。可以通过氨基酸的单字母代码、三字母代码、名称或者三核苷酸密码子来表示氨基酸,由此指示氨基酸名称,这是本领域中众所周知的(参见Alberts,B.等人,Molecular Biology of The Cell,第三版,Garland Publishing,Inc.,New York,1994):

[0214]

单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
A	Ala	丙氨酸	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	半胱氨酸	UGC, UGU
D	Asp	天冬氨酸	GAC, GAU
E	Glu	谷氨酸	GAA, GAG
F	Phe	苯丙氨酸	UUC, UUU
G	Gly	甘氨酸	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	组氨酸	CAC, CAU
I	Ile	异亮氨酸	AUA, AUC, AUU
K	Lys	赖氨酸	AAA, AAG
L	Leu	亮氨酸	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	甲硫氨酸	AUG
N	Asn	天冬酰胺	AAC, AAU
P	Pro	脯氨酸	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	谷氨酰胺	CAA, CAG
R	Arg	精氨酸	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	丝氨酸	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	苏氨酸	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	缬氨酸	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	色氨酸	UGG
Y	Tyr	酪氨酸	UAC, UAU

[0215] 如文中说明的,本发明的抗TNF抗体可包括一个或多个来自天然突变或来自人工操纵的氨基酸置换、缺失或添加。

[0216] 当然,技术人员可进行的氨基酸置换数目取决于许多因素,包括上文所述的那些。如文中说明的,一般来讲,任何给定的抗TNF抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过40个、30个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个、1个,诸如1-30个或其中的任何范围或数值。

[0217] 本发明的抗TNF抗体中对功能必需的氨基酸可以通过本领域中已知的方法鉴定,这些方法诸如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如Ausubel,出处同上,第8、15章,Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085(1989))。后一程序在分子的每个残基处引入单个丙氨酸突变。随后测试所得突变分子的生物活性,诸如但不限于至少一种TNF中和活性。抗体结合至关重要的位点也可以通过结构分析进行鉴定,诸如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith等人,J.Mol.Biol.) 224:899-904(1992)以及de Vos等人,Science 255:306-312(1992))。

[0218] 本发明的抗TNF抗体可包括但不限于选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6中的至少一者的1个至所有邻接氨基酸的至少一个部分、序列或组合。

[0219] 抗TNF抗体还可任选地包含SEQ ID NO:7、8中的至少一者的70%-100%的邻接氨基酸中的至少一者的多肽。

[0220] 在一个实施方案中,免疫球蛋白链或其部分(例如可变区、CDR)的氨基酸序列与SEQ ID NO:7、8中的至少一者的对应链的氨基酸序列具有约70%-100%的同一性(例如70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或其中的任何范围或值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与SEQ ID

NO:8的序列进行比较,或者重链CDR3的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:7进行比较。优选地,使用如本领域已知的合适计算机算法确定出70%-100%氨基酸同一性(即90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或者其中的任何范围或值)。

[0221] 在SEQ ID NO:7、8中提供了示例性重链和轻链可变区序列。本发明的抗体,或其特定变体可包含任何数目的来自本发明抗体的邻接氨基酸残基,其中该数目选自抗TNF抗体中邻接残基数目的10%-100%的整数。任选地,该邻接氨基酸亚序列长度为至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或更多个氨基酸,或其中的任何范围或数值。此外,此类亚序列的数目可以为选自由1至20组成的组的任何整数,诸如至少2、3、4或5。

[0222] 技术人员将会知道,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体的比活性为天然(非合成)的、内源性或相关的且已知的抗体比活性的至少20%、30%或40%,并且优选地为至少50%、60%或70%,并且最优选地为至少80%、90%或95%-100%。测定和定量酶促活性和底物特异性的量度的方法是本领域技术人员熟知的。

[0223] 在另一方面,本发明涉及通过共价连接有机部分进行修饰的、如本文所述的人抗体和抗原结合片段。此类修饰可以产生具有改善的药代动力学特性(例如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或支化的亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在一个具体实施方案中,亲水性聚合物基团可以具有约800至约120,000道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约8至约40个碳原子。

[0224] 本发明的经修饰的抗体和抗原结合片段可包含一个或多个与抗体直接或间接共价键合的有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段键合的每个有机部分可独立地是亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”涵盖单羧酸和二羧酸。“亲水性聚合物基团”,该术语在本文中使用时是指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价连接聚赖氨酸来修饰的抗体包括在本发明内。适用于修饰本发明抗体的亲水性聚合物可以是直链或支链的,并且包括例如聚链烷二醇(例如PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG等)、碳水化合物(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚环氧链烷(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水性聚合物作为单独的分子实体具有约800至约150,000道尔顿的分子量。例如可使用PEG₅₀₀₀和PEG_{20,000},其中下标是聚合物的平均分子量(单位为道尔顿)。亲水性聚合物基团可用1至约6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可通过采用合适的方法制备。例如,可将包含胺基团的聚合物与脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸根偶联,且可将脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧酸根(例如用N,N-羰基二咪唑活化)与聚合物上的羟基偶联。

[0225] 适用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可含有一个或多个不饱和单位。适用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括例如正十二烷酸酯(C₁₂,月桂酸酯)、正十四烷酸酯(C₁₄,肉豆蔻酸酯)、正十八烷酸酯(C₁₈,硬脂酸酯)、正二十烷酸酯(C₂₀,花生酸酯)、正二十二烷酸酯(C₂₂,山嵛酸酯)、正三十烷酸酯(C₃₀)、正十四烷酸酯(C₄₀)、顺式- Δ^9 -十八

烷酸酯(C₁₈,油酸酯)、全顺式- Δ 5,8,11,14-二十碳四烯酸酯(C₂₀,花生四烯酸酯)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链的低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可包含1至约12个,优选地1至约6个碳原子。

[0226] 修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备,诸如通过与一种或多种修饰剂反应来制备。如本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的合适有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团,它们可在适当的条件下与第二化学基团反应,由此在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键。例如,胺反应性活化基团包括亲电子基团,诸如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括例如马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。可将醛官能团与含胺或酰肼的分子偶联,并且可将叠氮基团与三价磷基团反应以形成磷酰胺酯或磷酰亚胺键。将活化基团引入分子的合适方法为本领域公知的(参见例如Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996))。可将活化基团直接键合到该有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯),或者通过连接部分来键合,所述连接部分例如二价C₁-C₁₂基团,其中一个或多个碳原子可被杂原子诸如氧、氮或硫取代。合适的连接部分包括例如四甘醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH-和-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-。包含连接部分的修饰剂可例如通过以下产生:在存在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)的情况下,使单-Boc-烷基二胺(例如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应,以在游离胺和脂肪酸羧酸根之间形成酰胺键。可通过用三氟乙酸(TFA)处理从产物除去Boc保护基以暴露出伯胺,后者可偶联到另一羧酸酯(如所描述),或者可与马来酸酐反应并且所得的产物环化以产生脂肪酸的活化马来酰亚胺基衍生物。(参见例如Thompson等人的WO 92/16221,该专利的全部教导内容以引用方式并入本文。)

[0227] 本发明的经修饰抗体可通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。例如,有机部分可以通过使用胺反应性改性剂(例如PEG的NHS酯)以非位点特异性方式结合至抗体。经修饰的人抗体或抗原结合片段还可通过使抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键)还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可与硫醇反应性修饰剂反应,以产生本发明的经修饰抗体。包含与本发明抗体特定位点键合的有机部分的修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备,所述方法例如为逆向蛋白水解作用(Fisch等人, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen等人, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran等人, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh等人, *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)),以及在Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)中所述的方法。

[0228] 抗Tnf抗体组合物的抗独特型抗体。除了单克隆或嵌合的抗TNF抗体之外,本发明还涉及对本发明的此类抗体有特异性的抗独特型(抗Id)抗体。抗Id抗体是能识别通常与另一抗体的抗原结合区相关联的独特决定簇的抗体。抗Id可以通过用该抗体或其含CDR的区域免疫与Id抗体来源相同的物种和遗传类型(例如小鼠品系)的动物来进行制备。被免疫动物将识别免疫抗体的独特型决定簇且对其响应,从而产生抗Id抗体。抗Id抗体还可以用作“免疫原”以在另一动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗-抗Id抗体。

[0229] 抗Tnf抗体组合物。本发明还提供至少一种抗TNF抗体组合物，其包含如本文所述和/或如本领域已知的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多种抗TNF抗体，它们以非天然存在的组合物、混合物或形式提供。此类组合物包括非天然存在的组合物，所述非天然存在的组合物包含抗TNF抗体氨基酸序列的至少一个或两个全长序列、C-端和/或N-端缺失的变体、结构域、片段或特定变体，该抗TNF抗体氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8的70%-100%的邻接氨基酸或其特定片段、结构域或变体组成的组。优选的抗TNF抗体组合物包含至少一个或两个全长序列、片段、结构域或变体作为至少一个含CDR或LBR部分，所述含CDR或LBR部分来自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%的抗TNF抗体序列或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%或其特定片段、结构域或变体中的至少一者的40%-99%。此类组合物百分数按照液体或无水溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、摩尔浓度或重量摩尔浓度计算，如本领域已知或如本文所述。

[0230] 本发明的抗TNF抗体组合物还可包含任何合适和有效量的组合物或药物组合物中的至少一种，该组合物或药物组合物包含至少一种给予需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者的抗TNF抗体，任选地还包含至少一种选自以下的药剂：至少一种TNF拮抗剂（例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或片段、它们的融合蛋白质、或者小分子TNF拮抗剂）、抗风湿药（例如甲氨蝶呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶）、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物（NSAID）、止痛药、麻醉剂（anesthetic）、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂（例如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂）、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、镇咳剂、止吐剂、抗溃疡剂、缓泻剂、抗凝血剂、促红细胞生成素（例如红细胞生成素 α ）、非格司亭（例如G-CSF、优保津）、沙格司亭（GM-CSF、Leukine）、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂（例如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药物、催眠剂、拟交感神经药物、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶（百慕时）、细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性示例包括但不限于IL-1至IL-23中的任一者。合适的剂量是本领域熟知的。参见例如Wells等人编辑，Pharmacotherapy Handbook，第2版，Appleton and Lange，Stamford，CT（2000）；PDR Pharmacopoeia，Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000，Deluxe编辑，Tarascon Publishing，Loma Linda，CA（2000），上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0231] 此类抗癌药或抗感染药还可包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同配制或共同施用的毒素分子。毒素可任选地起到选择性杀死病理性细胞或组织的作用。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。此类毒素可以是（但不限于）纯化的或重组的毒素或包含毒素的至少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段，所述毒素例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一者。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组型细菌或病毒产生的内毒素和外毒素，其可在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况，包括

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

[0232] 本发明的抗TNF抗体化合物、组合物或组合可以还包含任何合适的辅助剂中的至少一种,诸如但不限于稀释剂、粘结剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、助剂等。可药用辅助剂是优选的。制备此类无菌溶液的非限制性示例和方法为本领域熟知的,诸如但不限于Gennaro编辑, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。可以按常规方式选择适合于抗TNF抗体、片段或变体组合物的施用方式、溶解性和/或稳定性的药学上可接受的载剂,如本领域所熟知或如本文所述。

[0233] 用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和低聚糖;衍生糖诸如糖醇、醛糖酸、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物), 药物赋形剂和添加剂可以单独或组合的方式存在,其单独或组合具有1-99.99重量%或体积%。示例性的蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,诸如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。还可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱

氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0234] 适合在本发明中使用的碳水化合物赋形剂包括例如单糖,诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,诸如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及糖醇,诸如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、肌醇等。用于本发明的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

[0235] 抗TNF抗体组合物还可包含缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是从有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐,诸如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;盐酸三羟甲基氨基甲烷或磷酸盐缓冲剂。用于在本发明组合物中使用的优选缓冲剂是有机酸盐,诸如柠檬酸盐。

[0236] 另外,本发明的抗TNF抗体组合物可包含聚合物赋形剂/添加剂,诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖(聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如环糊精,诸如2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如聚山梨醇酯,诸如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质(例如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇)和螯合剂(例如EDTA)。

[0237] 这些和附加的适用于本发明抗TNF抗体、部分或变体组合物的已知药物赋形剂和/或添加剂是本领域中已知的,例如,如在以下文献中列出的:“Remington:The Science & Practice of Pharmacy”,第19版,Williams & Williams, (1995),以及“Physician's Desk Reference”,第52版,Medical Economics, Montvale, NJ (1998),这些文献的公开内容以引用方式全文并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物(例如糖和醛醇)和缓冲剂(例如柠檬酸盐)或聚合物试剂。

[0238] 制剂。如上面指出,本发明提供适于药用或兽医用途的稳定制剂,其优选地为具有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液,以及含有防腐剂的防腐溶液和制剂,以及多用途防腐制剂,所述制剂包含可药用制剂中的至少一种抗TNF抗体。防腐制剂包括至少一种公知的防腐剂或任选地选自以下项组成的组:至少一种溶于含水稀释剂的苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯代丁醇、氯化镁(例如六水合物)、烷基苯甲酸酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。可以使用如本领域已知的任何合适的浓度或混合物,诸如0.001%-5%或其中的任何范围或值,诸如但不限于:0.001%、0.003%、0.005%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.3%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%,或其中的任何范围或值。非限制性示例包括:无防腐剂、0.1%-2%间甲酚(例如0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.1%-3%苄醇(例如0.5%、0.9%、1.1%、1.5%、1.9%、2.0%、2.5%)、0.001%-0.5%硫柳汞(例如0.005%、0.01%)、0.001%-2.0%苯酚(例如0.05%、0.25%、0.28%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.0005%-1.0%对羟基苯甲酸烷基酯(例如0.00075%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.005%、0.0075%、0.009%、0.01%、0.02%、

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

[0239] 如上文指出的,本发明提供了包括包装材料和至少一个小瓶的制品,所述小瓶包含至少一种抗TNF抗体与规定的缓冲剂和/或防腐剂的溶液(任选地溶于水性稀释剂中),其中所述包装材料包括标签,该标签标明此类溶液可以在1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72小时或更长时间段内保存。本发明还包括制品,该制品包括包装材料、包含冻干的至少一种抗TNF抗体的第一小瓶和包含规定缓冲剂或防腐剂的水性稀释剂的第二小瓶,其中所述包装材料包括标签,该标签指导患者在水性稀释剂中重构所述至少一种抗TNF抗体以形成可以在24小时或更长时间段内保存的溶液。

[0240] 根据本发明使用的至少一种抗TNF抗体可以通过重组手段制备,包括从哺乳动物细胞或转基因制品制备,或者可以从其他生物来源纯化,如本文所述或如本领域已知的。

[0241] 如果在湿润/干燥系统中,那么本发明产品中的至少一种抗TNF抗体的范围包括重构后产生约1.0 μ g/ml至约1000mg/ml的浓度的量,但是更低和更高的浓度是可行的并且取决于预期的递送介质,例如溶液制剂将不同于透皮贴剂、经肺、跨粘膜或渗透或微量泵方法。

[0242] 优选地,水性稀释剂还任选地包含可药用防腐剂。优选的防腐剂包括选自由以下项组成的组的那些:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。在制剂中使用的防腐剂的浓度是足以产生抗微生物作用的浓度。该浓度取决于所选防腐剂且容易由技术人员确定。

[0243] 其他赋形剂例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、增强剂可任选且优选地添加到稀释剂中。等渗剂诸如甘油常常以已知的浓度使用。优选地添加生理学耐受的缓冲剂以提供改善的pH控制。制剂可以覆盖宽的pH范围,诸如约pH 4至约pH 10,优选的范围是约pH 5至约pH 9,最优选的范围是约6.0至约8.0。优选地本发明的制剂具有介于约6.8和约7.8之间的pH。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂,最优选地磷酸钠,特别是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0244] 其他的添加剂,诸如药学上可接受的增溶剂,如Tween 20(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯)、Tween 40(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯)、Tween 80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)、Pluronic F68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和PEG(聚乙二醇)或者非离子型表面活性剂诸如聚山梨酸酯20或80或者泊洛沙姆184或188、Pluronic®多元醇、其他嵌段共聚物,以及螯合物诸如EDTA和EGTA,可以任选地被添加到制剂或组合物中以减少聚集。如果使用泵或塑料容器来施用制剂,则这些添加剂是特别有用的。可药用表面活性剂的存在减轻了蛋白质聚集的倾向。

[0245] 本发明的制剂可通过这样的方法制备,该方法包括将至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合,该防腐剂选自由以下项组成的组:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合。为了制备合适的制剂,例如,将缓冲液中的测定量的至少一种抗TNF抗体与所需的防腐剂在缓冲液中以一定量组合,所述量足以提供所需浓度的蛋白质和防腐剂。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进

行最优化的因素。

[0246] 受权利要求书保护的制剂可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构,所述第二小瓶容纳水、防腐剂和/或赋形剂,优选地磷酸盐缓冲液和/或盐水和所选的盐。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,并且因此可以提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0247] 本发明受权利要求书保护的制品可用于从立即到24小时或更长的时间段里进行施用。因此,本发明受权利要求书保护的制品提供了对于患者而言明显的优点。本发明的制剂可以任选地安全地储存于约2℃至约40℃的温度下,并且在长的时间内保持蛋白质的生物活性,从而允许包装标签标明溶液可在6、12、18、24、36、48、72或96小时或更长的时间段内保持和/或使用。如果使用防腐稀释剂,则此类标签可包括长达1-12个月、半年、一年半和/或2年的使用期。

[0248] 本发明的至少一种抗TNF抗体的溶液可通过包括将至少一种抗体在水性稀释剂中混合的方法来制备。混合是使用常规溶解和混合程序来进行。为了制备合适的稀释液,例如,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体以一定量组合,所述量足以提供蛋白质和任选的防腐剂或缓冲剂成所需的浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进行最优化的因素。

[0249] 受权利要求书保护的产品可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,并且因此提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0250] 受权利要求书保护的产品可通过给药房、门诊或其他此类机构和单位提供澄清的溶液或双小瓶来间接地提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,该抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。在这种情况下澄清溶液剂的容积尺寸可以最多为一升或甚至更大,从而提供大的贮存库,从中可以一次或多次取出较小部分的至少一种抗体溶液用于转移到较小的小瓶中,且通过药房或门诊提供给它们的顾客和/或患者。

[0251] 包括这些单小瓶系统的公认装置包括用于递送溶液的那些笔式注射器装置,诸如 **B-D[®]** (笔式注射器装置)、**NOVOPEN[®]** (笔式注射器装置)、**AUTOPEN[®]** (笔式注射器装置)、**OPTIPEN[®]** (笔式注射器装置)、**GENOTROPIN PEN[®]** (笔式注射器装置)、**HUMATROPEN[®]** (笔式注射器装置)、**BIOJECTOR[®]** (笔式注射器装置)、Reco-Pen、Humaject、J-tip无针注射器、Intraject、Med-Ject,例如,如由以下制造或开发:

[0252] Becton Dickensen (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com),

[0253] Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com);

[0254] Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com);

[0255] Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com),

[0256] Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com).

[0257] 包括双小瓶系统的公认装置包括用于在筒中将冻干药物重构的那些笔式注射器

系统,而该筒用于递送重构的溶液,诸如HUMATROPEN®(笔式注射器装置)

[0258] 本发明受权利要求书保护的产品包括包装材料。包装材料除了提供管理机构要求的信息之外,还提供本产品可得以使用的条件。对于双小瓶、湿润/干燥产品,本发明的包装材料提供指导患者在水性稀释剂中重构至少一种抗TNF抗体以形成溶液,以及在2-24小时或更长时间段内使用溶液的说明书。对于单小瓶溶液产品,标签标明此类溶液可以在2-24小时或更长时间段内使用。本发明受权利要求书保护的产品可用于人药物产品用途。

[0259] 本发明的制剂可通过这样的方法制备,该方法包括将至少一种抗TNF抗体和所选的缓冲剂混合,所述缓冲剂优选地为含有盐水或所选盐的磷酸缓冲液。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗体和缓冲剂在水性稀释剂中混合。例如,为了制备合适的制剂,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体与所需缓冲剂在一定量的水中混合,所述量足以提供所述蛋白质和缓冲剂成所需浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进行最优化的因素。

[0260] 可以将受权利要求保护的稳定或防腐的制剂以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂中的防腐剂或缓冲剂和赋形剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,并且因此提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0261] 在本文所述的稳定或保存制剂或溶液中的至少一种抗TNF抗体可根据本发明经由多种递送方法施用给患者,所述递送方法包括SC或IM注射;经皮、肺部、经粘膜、植入物、渗透泵、药液筒、微型泵或其他技术人员知道的工具,如本领域众所周知的。

[0262] 治疗应用。本发明还提供了使用至少一种本发明的双整联蛋白抗体调节或治疗如本领域已知或如本文所述的细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法。

[0263] 本发明还提供用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法,所述疾病包括但不限于肥胖症、免疫相关疾病、心血管疾病、传染性疾病、恶性疾病或神经疾病中的至少一者。

[0264] 本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法,所述免疫相关疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性发作的青少年类风湿性关节炎、强直性脊柱炎(Ankylosing Spondylitis)、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性脉管炎/韦格纳肉芽肿病、结节病、睾丸炎/输精管切除术逆向程序(vasectomy reversal procedures)、变应性/特应性疾病、哮喘、变应性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、超敏感性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主病、全身性炎性反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌性脓毒症、嗜中性白细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤/出血、灼伤、电离射线暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病理状态、结节病、克隆氏病理状态、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性

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

[0265] 本发明还提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法,所述心血管疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:心肌顿抑综合征、心肌梗塞、充血性心脏衰竭、中风、缺血性中风、出血、动脉硬化、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病性动脉硬化疾病、高血压、动脉高血压、肾血管性高血压、昏厥、休克、心血管系统的梅毒、心脏衰竭、肺心病、原发性肺高血压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房颤动(持续或阵发性)、后灌注综合征、心肺旁路炎症反应、混乱性或多源性房性心动过速、规则窄QRS心动过速、特异性心律失常、心室颤动、希氏束心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性疾病、冠心病、心绞痛、心肌梗塞、心肌病、扩张型充血性心肌病、限制型心肌病、心脏瓣膜病、心内膜炎、心包疾病、心脏肿瘤、主动脉和外周动脉瘤、主动脉剥离、主动脉的炎症、腹主动脉及其分支的闭塞、周围血管疾病、动脉闭塞性疾病、外周动脉硬化性疾病、血栓闭塞性脉管炎、功能外周动脉疾病、雷诺氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓、静脉曲张、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定型心绞痛、再灌注损伤、后泵综合征、缺血再灌注损伤等。此类方法可任选地包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合或药物组合施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。

[0266] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种传染病的方法,所述传染病包括但不限于以下疾病中的至少一种:急性或慢性细菌感染,急性和慢性寄生或传染过程,包括细菌、病毒和真菌感染、HIV感染/HIV神经病、脑膜炎、肝炎(甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌0157:h7、溶血尿毒症综合征/溶解血栓性血小板减少性紫癜、疟疾、登革出血热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌性肌炎、气性坏疽、结核分枝杆菌、细胞内鸟分枝杆菌、卡氏肺囊虫性肺炎、骨

盆炎症性疾病、睾丸炎/附睾炎、军团杆菌、莱姆氏病、a型流行性感、EB病毒、病毒性脑炎/无菌性脑膜炎等。

[0267] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,这些恶性疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B-细胞、T细胞或FAB ALL、急性髓细胞样白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞性白血病、骨髓异常增生综合征(MDS)、淋巴瘤、何杰金病、恶性淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、Burkitt氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波西肉瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多症、恶性肿瘤的肿瘤相关综合征/高血钙综合征、实体瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑素瘤、血管瘤、转移性疾病、癌症相关的骨再吸收、癌症相关的骨痛等。

[0268] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法,所述神经疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:神经退行性疾病、多发性硬化症、偏头痛、艾滋病痴呆综合征、脱髓鞘疾病,诸如多发性硬化症和急性横贯性脊髓炎;锥体束外和小脑失调,诸如皮质脊髓系统病灶;基底神经节失调或小脑失调;多动性运动失调,诸如亨廷顿氏舞蹈症和老年性舞蹈症;药源性运动失调,诸如阻断CNS多巴胺受体的药物诱发的失调;运动减少性失调,诸如帕金森氏病;进行性核上性麻痹;小脑结构性病灶;脊髓小脑的退化,诸如脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia)、小脑皮层退化、多发性系统退化(Mencel症、Dejerine-Thomas症、Shi-Drager症和Machado-Joseph症);全身失调(雷弗素姆氏病、无β脂蛋白血症、共济失调、毛细管扩张和线粒体多系统失调);脱髓鞘核失调,诸如多发性硬化症、急性横向脊髓炎;以及运动单元的失调,诸如神经源性肌萎缩(前角细胞退化,诸如肌萎缩侧索硬化症、婴儿型骨髓性肌萎缩症和幼年型骨髓性肌萎缩症);阿尔茨海默病;中年唐氏综合症;弥漫性路易体病;老年痴呆路易体型;韦尼克-科尔萨科夫综合征;慢性酒精中毒;克雅二氏症;亚急性硬化性全脑炎、哈勒沃登-施帕茨病(Hallerrorden-Spatz disease);以及拳击员痴呆等。此类方法可以任选地包括将有效量的包含至少一种TNF抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。参见,例如Merck Manual,第16版,Merck&Company, Rahway, NJ (1992)

[0269] 本发明的任何方法都可包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病,其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿药(例如,甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如,阿法依伯汀)、非格司亭(例如,G-CSF、优

保津)、沙莫司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。合适的剂量是本领域熟知的。参见例如Wells等人编辑,Pharmacotherapy Handbook,第2版,Appleton and Lange,Stamford,CT(2000);PDR Pharmacopoeia,Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000,Deluxe编辑,Tarascon Publishing,Loma Linda,CA(2000),上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0270] 适用于本发明的组合物、联合疗法、共同施用、装置和/或方法的TNF拮抗剂(进一步包含本发明的至少一种抗体、其特定部分和变体)包括但不限于抗TNF抗体、其抗原结合片段和与TNF特异性结合的受体分子;预防和/或抑制TNF合成、TNF释放或其对靶细胞的作用的化合物,诸如沙利度胺、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(例如己酮可可碱和咯利普兰)、A2b腺苷受体激动剂和A2b腺苷受体增强剂;预防和/或抑制TNF受体信号传导的化合物,诸如有丝分裂原活化蛋白(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜TNF切割的化合物,诸如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制TNF活性的化合物,诸如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(例如,卡托普利);以及阻断和/或抑制TNF产生和/或合成的化合物,诸如MAP激酶抑制剂。

[0271] 如本文所用,“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF抗体”、“TNF α 抗体”或片段等可降低、阻断、抑制、消除或干扰体外、原位和/或优选地体内的TNF α 活性。例如,本发明的合适的TNF人抗体可结合TNF α 并且包括抗TNF抗体、其抗原结合片段以及其特异性结合TNF α 的特定突变体或结构域。合适的TNF抗体或片段也可以降低、阻断、消除、干扰、防止和/或抑制TNF RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。

[0272] 嵌合抗体cA2由高亲和力中和小鼠抗人TNF α IgG1抗体的抗原结合可变区(称作A2)和人IgG1 κ 免疫球蛋白的恒定区组成。人IgG1 Fc区域可改善同种异体抗体效应子功能,增加循环血清半衰期和减小抗体的免疫原性。嵌合抗体cA2的亲合力和表位特异性来源于鼠抗体A2的可变区。在一个具体实施方案中,编码鼠抗体A2的可变区的核酸的优选来源是A2杂交瘤细胞系。

[0273] 嵌合A2(cA2)以依赖剂量的方式中和天然的和重组的人TNF α 的细胞毒性效应。根据嵌合抗体cA2和重组人TNF α 的结合测定,计算出嵌合抗体cA2的亲合力常数为 $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的优选方法可见于Harlow等人,antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1988;Colligan等人编辑,Current Protocols in Immunology,Green Publishing Assoc.and Wiley Interscience,New York,(1992-2000);Kozbor等人,Immunol.Today,4:72-79(1983);Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York(1987-2000);以及Muller,Meth.Enzymol.,92:589-601(1983),这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0274] 在一个具体实施方案中,通过标号为c134A的细胞系产生鼠单克隆抗体A2。由标号为c168A的细胞系产生嵌合抗体cA2。

[0275] 可用于本发明的单克隆抗TNF抗体的附加示例描述于本领域中(参见,例如,美国

专利5,231,024; Möller, A. 等人, Cytokine 2(3):162-169(1990); 美国申请07/943,852(提交于1992年9月11日); Rathjen 等人, 国际公布W0 91/02078(公布于1991年2月21日); Rubin 等人, EP0 专利公布0 218 868(公布于1987年4月22日); Yone 等人, EP0 专利公布0 288 088(1988年10月26日); Liang 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854(1986); Meager 等人, Hybridoma 6:305-311(1987); Fendly 等人, Hybridoma 6:359-369(1987); Bringman 等人, Hybridoma 6:489-507(1987); 以及 Hirai 等人, J. Immunol. Meth. 96:57-62(1987), 这些参考文献以引用方式全文并入本文)。

[0276] TNF受体分子。可用于本发明的优选TNF受体分子是以高亲和力结合TNF α 的那些(参见例如 Feldmann 等人, 国际公布W0 92/07076(公布于1992年4月30日); Schall 等人, Cell 61:361-370(1990); 以及 Loetscher 等人, Cell 61:351-359(1990), 这些参考文献以引用方式全文并入本文), 并且任选地具有低免疫原性。具体地, 55kDa (p55 TNF-R) 和 75kDa (p75TNF-R) TNF细胞表面受体可用于本发明。这些受体的包含受体的细胞外结构域(ECD)或其功能部分的截短形式(参见, 例如 Corcoran 等人, Eur. J. Biochem. 223:831-840(1994))也可用于本发明。已在尿和血清中检测到TNF受体的含有ECD的截短形式为30kDa和40kDa的TNF α 抑制性结合蛋白质(Engelmann, H. 等人, J. Biol. Chem. 265:1531-1536(1990))。TNF受体多聚体分子和TNF免疫受体融合分子及其衍生物和片段或部分, 是可用于本发明的方法和组合物的TNF受体分子的附加示例。可用于本发明的TNF受体分子的特征在于它们能够长时间治疗患者, 能很好地或极好地减轻症状, 且毒性低。低免疫原性和/或高亲和力, 以及其他未确定的特性, 可有助于所实现的治疗结果。

[0277] 可用于本发明的TNF受体多聚体分子包含经由一种或多种多肽接头或其他非肽接头(诸如聚乙二醇(PEG))连接的两个或多个TNF受体的ECD的全部或功能部分。该多聚体分子还可包含分泌蛋白质的信号肽以引导该多聚体分子的表达。这些多聚体分子和它们的制备方法已经在美国专利申请08/437,533(提交于1995年5月9日)中有所描述, 其内容以引用方式全文并入本文。

[0278] 可用于本发明方法和组合物的TNF免疫受体融合分子包含一种或多种免疫球蛋白分子的至少一部分和一种或多种TNF受体的全部或功能部分。这些免疫受体融合分子可被装配为单体或异型多聚体或同型多聚体。免疫受体融合分子也可以是单价的或多价的。此类TNF免疫受体融合分子的示例是TNF受体/IgG融合蛋白质。TNF免疫受体融合分子及它们的制备方法已经在本领域有所描述(Lesslerauer 等人, Eur. J. Immunol. 21:2883-2886(1991); Ashkenazi 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991); Peppel 等人, J. Exp. Med. 174:1483-1489(1991); Kolls 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219(1994); Butler 等人, Cytokine 6(6):616-623(1994); Baker 等人, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048(1994); Beutler 等人, 美国专利5,447,851; 以及美国专利申请08/442,133(提交于1995年5月16日), 上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文)。用于制备免疫受体融合分子的方法也可见于 Capon 等人, 美国专利5,116,964; Capon 等人, 美国专利5,225,538; 以及 Capon 等人, Nature 337:525-531(1989), 这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0279] TNF受体分子的功能等价物、衍生物、片段或区域是指TNF受体分子的部分或编码TNF受体分子的TNF受体分子序列的部分, 其具有足够的尺寸和序列以在功能上类似于可用

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

[0280] 细胞因子包括任何已知的细胞因子。参见例如Cope with Cytokines.com。细胞因子拮抗剂包括但不限于任何抗体、片段或模拟物、任何可溶受体、片段或模拟物、任何小分子拮抗剂或它们的任何组合。

[0281] 医疗性治疗。本发明的任何方法可包括用于治疗TNF介导的障碍的方法,包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病,其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿药(例如,甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如,阿法依伯汀)、非格司亭(例如,G-CSF、优保津)、沙莫司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0282] 如本文所用,当涉及用本发明的抗TNF抗体(例如,抗TNF抗体戈利木单抗)的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时,术语“安全”是指与护理标准或另一种比较剂诸如其他抗TNF药剂相比,具有不良事件(AE)和严重不良事件(SAE)的可接受频率和/或可接受严重程度的有利风险:效益比。不良事件是在施用药品的患者中发生的不良医学事件。具体地,当涉及用本发明的抗TNF抗体的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时,安全是指不良事件的可接受频率和/或可接受严重程度,包括例如输注反应、肝胆实验室异常、包括TB在内的感染,以及恶性肿瘤。

[0283] 如本文所用,在组合物、剂量、给药方案、治疗或方法的上下文中使用的术语“疗效”和“有效”是指用本发明的抗TNF抗体(例如,抗TNF抗体戈利木单抗)的特定组合物、剂量、剂型、治疗或方法的效果。功效可基于病程响应于本发明药剂发生的变化进行测量。例如,将本发明的抗TNF抗体以足以诱导至少一种反映所治疗疾病严重程度的指标的改善,优

选地持续改善的量和时间施用至患者。可评估反映受试者的病、疾病或病症程度的各种指标,以确定治疗的量和时间是否足够。此类指标包括例如临床上公认的疾病严重程度、症状或所考虑病症的表现的指标。改善程度一般由医师或其他受过充分训练的个体确定,他们可基于体征、症状、活组织检查或指示临床症状改善的其他测试结果或任何其他疾病活动度量来确定。例如,可施用本发明的抗TNF抗体以实现患者与幼年特发性关节炎(JIA)并且特别是与多关节幼年特发性关节炎(pJIA)相关的病症的改善。用于治疗JIA和/或pJIA的疗效可例如通过以下确定:患者满足非活动性疾病标准;患者具有自基线的改善,对应于选自JIA ACR 30、JIA ACR50、JIA ACR 70和JIA ACR 90的JIA美国风湿病学会(JIA ACR)响应;以及/或者在幼年关节炎疾病活动评分(JADAS)中患者具有自基线的变化,该JADAS选自:JADAS 10、JADAS 27和JADAS 71。

[0284] 如本文所用,除非另外指明,否则术语“临床证实”(单独使用或用于修改术语“安全”和/或“有效”)可意味着临床试验已经证实其有效,其中临床试验已经符合美国食品与药品监督管理局、EMA或相应国家监管机构的批准标准。例如,临床研究可能是一项样本量充分、随机分配、双盲研究,用于临床证实药物的效果。

[0285] 通常,对病理状况的治疗是通过施用安全且有效量或剂量的至少一种抗TNF抗体组合物来实现,取决于组合物中具有的比例活性,这些组合物总计为平均每剂量每千克患者至少约0.01毫克至500毫克的至少一种抗TNF抗体,优选地至少约0.1毫克至100毫克抗体/千克患者/单次或多次施用。另选地,有效血清浓度可包括0.1-5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用。合适的剂量是医学从业者已知的,当然要取决于具体疾病状态、待施用组合物的比例活性,以及经历治疗的具体患者。在一些情况下,为了实现所需治疗量,可能有必要提供重复施用,即重复单独施用特定的监控剂量或计量剂量,其中单独施用可以重复直至实现所需日剂量或效果。

[0286] 优选剂量可任选地包括0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500mg/kg/施用,或其任何范围、数值或分数,或实现以下血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500和/或5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用,或其任何范围、数值或分数。

[0287] 另选地,施用的剂量可根据已知的因素而变化,诸如特定试剂的药效特性及其施用方式和途径;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度、同时治疗的种类、治疗的频率以及期望的效果。通常活性成分的剂量可以是约0.1至100毫克/千克体重。通常,一次施用或者以缓释形式施用0.1毫克/千克至50毫克/千克,优选地0.1毫克/千克至10毫克/千克,能有效地获得期望的结果。

[0288] 作为一个非限制性示例,人或动物的治疗可以在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52周中的至少一周,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20年中的至少一年,或它们的任何组合,使用单次、输注或重复给药,作为0.1mg/kg至100mg/kg的一次或定期给药的至少一种本发明抗体提供,诸如0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg。

[0289] 适合于内部施用的剂型(组合物)通常每单位或容器包含约0.1毫克至约500毫克的活性成分。在这些药物组合物中,基于组合物总重量,活性成分一般会以约0.5重量%至99.999重量%的量存在。

[0290] 对于肠胃外施用,抗体可以被配制成溶液剂、混悬剂、乳剂或冻干粉剂,它们与药用肠胃外介质联合或分开提供。此类介质的示例是水、盐水、林格溶液、葡萄糖溶液和1%-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性介质,诸如固定油。介质或冻干粉剂可含有维持等渗性(例如氯化钠、甘露糖醇)和化学稳定性(例如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。可通过已知的或合适的技术对制剂进行灭菌。

[0291] 合适的药用载体在Remington's Pharmaceutical Sciences, A.Osol的最近版本(该领域的标准参考文本)中有描述。

[0292] 另选的施用。可根据本发明使用许多已知的和开发的施用方式来施用药学有效量的至少一种根据本发明的抗TNF抗体。尽管在下文描述中使用的是经肺施用,但其他施用方式也可根据本发明使用,得到合适的结果。

[0293] 本发明的TNF抗体可使用适用于通过吸入方式或本文所述或本领域已知的其他方式施用的多种装置和方法中的任一种,在载体中作为溶液剂、乳剂、胶体或混悬剂递送或作为干粉剂递送。

[0294] 肠胃外用制剂及施用。用于肠胃外施用的制剂可含有作为普通赋形剂的无菌水或盐水、聚亚烷基二醇诸如聚乙二醇、植物来源的油、氢化萘等。注射用水性或油性混悬剂可通过使用适当的乳化剂或湿润剂和悬浮剂根据已知方法来制备。注射用药剂可以是无毒的、非经口施用的稀释剂,诸如溶于溶剂的水溶液剂或无菌注射液或混悬剂。作为可用的介质或溶剂,允许使用水、林格氏溶液、等渗盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌不挥发油。为了这些目的,可以使用任何种类的不挥发性油和脂肪酸,包括天然的或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然的或合成的或半合成的甘油单酯或甘油二酯或甘油三酯。胃肠外施用是本领域已知的,包括但不限于常规形式的注射、如美国专利5,851,198中所述的气压式无针注射装置和如美国专利5,839,446中所述的激光穿孔器装置,全文以引用方式并入本文。

[0295] 另选的递送方式。本发明还涉及通过胃肠外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱

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

[0296] 经肺/鼻施用。对于经肺施用,优选地至少一种抗TNF抗体组合物以可有效到达肺下部气道或窦的粒度递送。根据本发明,至少一种抗TNF抗体可通过本领域已知用于通过吸入施用治疗剂的多种吸入装置或鼻装置中的任一种来递送。这些能够在患者的鼻腔或肺泡中沉积气溶胶化制剂的装置包括定量吸入器、雾化器、干粉产生器、喷雾器等。其他适用于引导抗体的经肺或鼻施用的装置也是本领域已知的。所有此类装置都可以使用适合于以气溶胶形式分配抗体进行施用的制剂。此类气溶胶可由溶液(水性或非水性)或固体颗粒构成。定量吸入器如**VENTOLIN**[®]定量吸入器通常利用推进气体并且要求在吸气期间启动(参见例如WO 94/16970、WO98/35888)。干粉吸入器如Turbuhaler(Astra)、Rotahaler(Glaxo)、**DISKUS**[®](吸入器)(Glaxo)、**SPIROS**[®](吸入器)(Dura)、Inhale Therapeutics公司销售的装置以及Spinhaler粉末吸入器(Fisons),都采用呼吸来驱动混合粉末(US 4668218(Astra)、EP 237507(Astra)、WO97/25086(Glaxo)、WO 94/08552(Dura)、US 5458135(Inhale)、WO94/06498(Fisons),所有这些专利都以引用方式全文并入本文)。雾化器如**AERX**[®](雾化器)Aradigm、**ULTRAVENT**[®](雾化器)(Mallinckrodt)和Acorn II雾化器(Marquest Medical Products)(US 5404871 Aradigm、WO 97/22376)(以上参考文献都以引用方式全文并入本文)从溶液产生气溶胶,而计量剂量吸入器、干粉吸入器等则产生小颗粒气溶胶。可商购获得的吸入装置的这些具体示例旨在代表适用于实施本发明的具体装置,并且无意于限制本发明的范围。优选地,包含至少一种抗TNF抗体的组合物通过干粉吸入器或喷雾器递送。对于施用本发明的至少一种抗体,吸入装置需具有若干期望特征。例如,有利地,通过吸入装置进行的递送是可靠的、可再现的和准确的。吸入装置可任选地递送小的干燥颗粒,例如小于约10 μ m,优选地约1-5 μ m,以便容易呼吸。

[0297] TNF抗体组合物作为喷雾施用。通过施压使至少一种抗TNF抗体的悬浮液或溶液通过喷嘴,可以产生包含TNF抗体组合物蛋白质的喷雾。可以选择喷嘴尺寸和构型、所施加的压力和液体加料速率来实现所需的输出和粒度。例如,通过电场结合毛细管或喷嘴加料,可产生电喷雾。有利地,通过喷雾器递送的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μ m的粒度,优选地粒度在约1 μ m至约5 μ m的范围内,并且最优选地在约2 μ m至约3 μ m的范围内。

[0298] 适合与喷雾器一起使用的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的制剂通常包含以如下浓度存在于水性溶液中的抗体组合物：约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质/ml溶液或mg/gm，或其中的任何范围或数值，例如但不限于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/ml或mg/gm。该制剂可包含诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂，并且优选地包括锌。该制剂还可包含用于稳定抗体组合物蛋白质的赋形剂或试剂，诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质 (bulk protein) 或碳水化合物。可用于配制抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制抗体组合物蛋白质的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白质制剂还可包含表面活性剂，其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的抗体组合物蛋白质聚集。可以采用多种常规表面活性剂，诸如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。按制剂的重量计，用量将通常在介于0.001%和14%之间的范围内。对于本发明的目的而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。用于蛋白质，诸如TNF抗体，或特定部分或变体的配制的本领域已知的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0299] 通过雾化器施用TNF抗体组合物。抗体组合物蛋白质可通过雾化器，诸如喷射雾化器或超声雾化器施用。通常，在喷射雾化器中，用压缩空气源通过孔口产生高速喷气流。在气体通过喷嘴膨胀时，会产生低压区，其通过连接液体贮液器的毛细管吸取抗体组合物蛋白质溶液。来自毛细管的液体流在其离开管时被剪切成不稳定的细丝或小滴，从而产生气溶胶。可以采用一系列构型、流速和挡板类型从给定的喷射雾化器产生所需性能特征。在超声雾化器中，用高频率电能产生振动机械能量，通常使用压电转换器。该能量被直接地或通过耦合流体传递至抗体组合物蛋白质的制剂，从而产生包含该抗体组合物蛋白质的气溶胶。有利地，通过雾化器递送的抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μ m的粒度，优选地粒度在约1 μ m至约5 μ m的范围内，并且最优选地为约2 μ m至约3 μ m。

[0300] 适合与雾化器 (喷射雾化器或超声雾化器) 一起使用的至少一种抗TNF抗体的制剂通常包括约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体蛋白质/ml溶液的浓度。该制剂可包含诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂，并且优选地包括锌。该制剂还可包含用于使至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质稳定的赋形剂或试剂，诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质或碳水化合物。可用于配制至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制至少一种抗TNF抗体的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗TNF抗体制剂还可包含表面活性剂，其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的至少一种抗TNF抗体的聚集。可以采用多种常规表面活性剂，诸如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。按制剂的重量计，用量将通常在介于0.001%和4%之间的范围内。对于本发明而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。本领域已知的用于蛋白质诸如抗体蛋白质的配制的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0301] 通过定量吸入器施用TNF抗体组合物。在定量吸入器 (MDI) 中，推进剂、至少一种抗TNF抗体以及任何赋形剂或其他添加剂作为包括液化压缩气体的混合物容纳在罐中。计量阀的致动将混合物释放为气溶胶，优选地含有尺寸范围小于约10 μ m，优选地约1 μ m至约5 μ m，

最优选地约2 μ m至约3 μ m的颗粒。所需气溶胶粒度可通过采用通过本领域技术人员已知的各种方法(包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点冷凝等)制备的抗体组合物蛋白质的制剂来获得。优选的定量吸入器包括由3M或Glaxo生产并采用氢氟烃推进剂的那些吸入器。

[0302] 供用于定量吸入器装置的至少一种抗TNF抗体的制剂通常会包括含有至少一种抗TNF抗体的微细粉末在非水性介质中作为悬浮液,例如,在表面活性剂的帮助下悬浮在推进剂中。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料,诸如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a(氢氟烷烃-134a)、HFA-227(氢氟烷烃-227)在内的烃类。优选地,推进剂为氢氟烃。可选择表面活性剂来使所述至少一种抗TNF抗体在推进剂中作为悬浮液而得到稳定,保护活性剂免受化学降解等。合适的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情况下,使用诸如乙醇之类的溶剂的溶液气溶胶是优选的。本领域已知的用于配制蛋白质的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0303] 本领域普通技术人员会认识到,本发明的方法可通过经由本文中未描述的装置经肺施用至少一种抗TNF抗体组合物来实现。

[0304] 口服制剂及施用。口服制剂依赖于共同施用佐剂(例如,间苯二酚和非离子型表面活性剂诸如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚)以人工增加肠壁的渗透性,以及共同施用酶抑制剂(例如,胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸(DFF)和抑肽酶(trasylo1))以抑制酶促降解。可将供口服的固体剂型的活性组分化合物与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露糖醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、几丁质、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成的或半合成的聚合物和甘油酯。这些剂型还可含有其他类型的添加剂,例如无活性稀释剂、润滑剂诸如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂诸如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚、抗氧化剂诸如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、甜味剂、矫味剂、香味剂等。

[0305] 片剂和丸剂可进一步加工成肠溶衣包衣制剂。供口服的液体制剂包括可允许用于医学用途的乳剂、糖浆剂、酏剂、混悬剂和溶液制剂。这些制剂可以含有常用于所述领域的无活性稀释剂,例如水。脂质体作为胰岛素的药物递送系统已有描述(美国专利4,239,754)。最近,混合氨基酸的人工聚合物(类蛋白)的微球体已用于递送药物(美国专利4,925,673)。此外,美国专利5,879,681和美国专利5,587,753中描述的载体化合物用于经口递送生物活性剂是本领域已知的。

[0306] 粘膜用制剂及施用。为了透过粘膜表面吸收,施用至少一种抗TNF抗体的组合物和方法包括乳剂,其包含许多亚微米颗粒、粘膜粘附性大分子、生物活性肽和水性连续相,其通过实现乳剂颗粒的粘膜粘附来促进透过粘膜表面的吸收(美国专利5,514,670)。适于施用本发明的乳剂的粘膜表面可包括角膜、结膜、口腔、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠施途径。用于阴道和直肠施用的制剂,例如栓剂,可含有例如聚亚烷基二醇、凡士林、可可脂等作为赋形剂。鼻内施用制剂可以是固体并且含有例如乳糖作为赋形剂,或可以是鼻滴剂的水性或油性溶液。对于口腔施用,赋形剂包括糖类、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等(美国专利5,849,695)。

[0307] 透皮制剂及施用。对于透皮施用,将该至少一种抗TNF抗体包囊在递送装置诸如脂质体或聚合型纳米颗粒、微粒、微胶囊或微球体(统称为微粒,除非特别指出)中。有多种合

适的装置是已知的,包括由合成聚合物和天然聚合物制成的微颗粒,所述合成聚合物诸如聚羧基酸(诸如聚乳酸、聚乙醇酸以及它们的共聚物)、聚原酸酯、聚酸酐和聚磷腈,所述天然聚合物诸如胶原、聚氨基酸、白蛋白和其他蛋白质、海藻酸盐和其他多糖以及它们的组合(美国专利5,814,599)。

[0308] 长期施用及制剂。通过一次施用在长时间周期内,例如一周到一年内将本发明化合物递送给受试者,有时候可能是期望的。可以利用多种缓释剂型、储库(depot)剂型或植入剂型。例如,剂型可含有化合物的药学上可接受的无毒盐,该盐在体液中具有低溶解度,例如,(a)与多元酸诸如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、双羟萘酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘单磺酸或二磺酸、聚半乳酸等的酸加成盐;(b)具有多价金属阳离子诸如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等的盐,或者具有由例如N,N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的有机阳离子的盐;或(c)(a)和(b)的组合,例如鞣酸锌盐。另外,可将本发明的化合物或优选地相对难溶的盐诸如上面所述的那些盐在适于注射的凝胶中,例如,在具有例如芝麻油的单硬脂酸铝凝胶中配制。尤其优选的盐为锌盐、鞣酸锌盐、双羟萘酸盐等。用于注射的另一种类型的缓释储库型制剂含有经分散以在缓慢降解、无毒、非抗原性聚合物中包囊的化合物或盐,所述聚合物为诸如美国专利3,773,919中描述的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。还可将化合物或优选地相对难溶的盐诸如上面所述的那些盐配制成胆固醇基质硅橡胶丸,尤其为了用于在动物中使用。另外的缓释、储存或植入制剂,例如气体或液体脂质体在文献(美国专利5,770,222,以及“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,J.R.Robinson 编辑,Marcel Dekker,Inc.,N.Y.,1978年)中是已知的。

[0309] 已总体地描述了本发明,通过参考下面的实施例将更容易理解本发明,所述实施例仅以示例的方式给出并且无意于作为限制。

[0310] 实施例1:哺乳动物细胞中TNF抗体的克隆和表达。

[0311] 典型的哺乳动物表达载体含有至少一个启动子元件,其介导mRNA和抗体编码序列的转录起始,所述表达载体还含有转录物的转录终止和多腺苷酸化所需的信号。附加元件包括增强子、Kozak序列以及侧接有用于RNA剪接的供体和受体位点的间插序列。高效率的转录可以使用以下序列来实现:来自SV40的早期启动子和晚期启动子,来自逆转录病毒例如RSV、HTLVI、HIVI的长末端重复序列(LTRS),和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的合适表达载体包括例如诸如以下的载体:pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN或pLNCX(Clontech Labs,Palo Alto,CA)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen)、PSVL和PMSG(Pharmacia,Uppsala,Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)和pBC12MI(ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人Hela 293、H9和Jurkat细胞、小鼠NIH3T3和C127细胞、Cos 1、Cos 7和CV 1、quail QC1-3细胞、小鼠L细胞和中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)细胞。

[0312] 另选地,基因可以在含有整合进染色体内的所述基因的稳定细胞系中表达。与选择标记诸如dhfr、gpt、新霉素或潮霉素共转染可允许鉴定和分离转染的细胞。

[0313] 还可以扩增所转染的基因以大量表达所编码的抗体。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记可用于开发携带几百或甚至几千拷贝的感兴趣的基因的细胞系。另一种可用的选择标记是谷氨酰胺合酶(GS)(Murphy等人,Biochem.J.227:277-279(1991);Bebbington等人,Bio/

Technology 10:169-175 (1992))。使用这些标记,哺乳动物细胞在选择培养基中生长且选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合进染色体内的扩增基因。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和NSO细胞通常用于生产抗体。

[0314] 表达载体pC1和pC4含有Rous肉瘤病毒的强启动子(LTR)(Cullen等人, Molec.Cell.Biol.) 5:438-447 (1985))和CMV-增强子的片段(Boshart等人, Cell 41:521-530 (1985))。多克隆位点,例如,具有限制性内切酶切割位点BamHI、XbaI和Asp718的多克隆位点,有助于感兴趣的基因的克隆。载体另外含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子、多腺苷酸化和终止信号。

[0315] 在CHO细胞中的克隆和表达。载体pC4用于TNF抗体的表达。质粒pC4是质粒pSV2-dhfr(ATCC登记号37146)的衍生物。该质粒含有在SV40早期启动子控制下的小鼠DHFR基因。用这些质粒转染的缺乏二氢叶酸活性的中国仓鼠卵巢细胞或其他细胞,可通过使细胞在补充有化学治疗剂甲氨蝶呤的选择培养基(例如alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD)中生长进行选择。DHFR基因在对甲氨蝶呤(MTX)具有抗性的细胞中的扩增已得到充分记载(参见,例如, F.W.Alt等人, J.Biol.Chem. 253:1357-1370 (1978); J.L.Hamlin和C.Ma, Biochem.et Biophys.Acta 1097:107-143 (1990); 以及M.J.Page和M.A.Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991))。在浓度渐增的MTX中生长的细胞由于DHFR基因扩增造成超量产生靶酶DHFR而发展出对药物的抗性。如果第二基因与DHFR基因连接,那么它通常被共扩增和过表达。本领域已知的是,该方法可用于开发携带超过1,000个拷贝的扩增基因的细胞系。随后,当甲氨蝶呤被取出时,获得含有整合进宿主细胞的一个或多个染色体内的扩增基因的细胞系。

[0316] 为了表达感兴趣的基因,质粒pC4含有Rous肉瘤病毒长末端重复序列(LTR)的强启动子(Cullen等人, Molec.Cell.Biol.) 5:438-447 (1985))和从人巨细胞病毒(CMV)即刻早期基因的增强子分离的片段(Boshart等人, Cell 41:521-530 (1985))。启动子的下游是允许基因整合的BamHI、XbaI和Asp718限制性内切酶切割位点。在这些克隆位点之后,该质粒含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子和多腺苷酸化位点。其他高效率的启动子也可以用于表达,例如人 β -肌动蛋白启动子、SV40早期或晚期启动子或来自其他逆转录病毒例如HIV和HTLVI的长末端重复序列。Clontech的Tet-Off和Tet-On基因表达系统和类似系统可以用于在哺乳动物细胞中以受调控的方式表达TNF(M.Gossen和H.Bujard, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551 (1992))。对于mRNA的多腺苷酸化,也可以使用例如来自人生长激素或珠蛋白基因的其他信号。携带整合进染色体中的感兴趣的基因的的稳定细胞系也可以在与选择标记诸如gpt、G418或潮霉素共转染时进行选择。有利的是在开始时使用不止一种选择标记,例如,G418加上甲氨蝶呤。

[0317] 将质粒pC4用限制性内切酶消化,并且然后通过本领域已知的程序使用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从1%琼脂糖凝胶分离载体。

[0318] 然后将编码所述分离的可变区和恒定区的DNA与该去磷酸化的载体用T4 DNA连接酶连接。然后转化大肠杆菌HB101或XL-1Blue细胞,并使用例如限制性内切酶分析来鉴定含有插入到质粒pC4中的片段的细菌。

[0319] 将缺乏活性DHFR基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞用于转染。使用脂质体将5 μ g表达质粒pC4与0.5 μ g质粒pSV2-neo共转染。质粒pSV2-neo含有显性选择标记即来自Tn5的neo基

因,其编码赋予对包括G418在内的一组抗生素的抗性的酶。将细胞接种在补充有1 μ g/ml G418的alpha minus MEM中。2天后,将细胞用胰蛋白酶处理并接种在杂交瘤克隆板(Greiner, Germany)中的补充有10ng/ml、25ng/ml或50ng/ml甲氨蝶呤加1 μ g/ml G418的alpha minus MEM中。约10-14天后,将单一克隆使用胰蛋白酶处理并且然后接种在6孔培养皿或10ml瓶中,其中使用不同浓度的甲氨蝶呤(50nM、100nM、200nM、400nM、800nM)。然后将在最高浓度甲氨蝶呤下生长的克隆转移到容纳更高浓度甲氨蝶呤(1mM、2mM、5mM、10mM、20mM)的新的6孔板。重复相同的程序直到获得在100mM-200mM浓度下生长的克隆。例如,通过SDS-PAGE和蛋白质印迹或通过反相HPLC分析,可对所需基因产物的表达进行分析。

[0320] 实施例2:使用转基因小鼠产生与人TNF反应的高亲和力人IgG单克隆抗体。

[0321] 总结。已经使用了含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生高亲和力的、完全人的单克隆抗体,该抗体可在治疗上用于抑制TNF治疗一种或多种TNF介导的疾病的作用。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J x C57/BL6/J)F₂杂交小鼠用人重组TNF免疫(Taylor等人, Intl. Immunol. 6:579-591 (1993); Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996); Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996))。几次融合产生了一组或多组完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。所有都是IgG1 κ 。发现此类抗体具有介于1 $\times 10^9$ 和9 $\times 10^{12}$ 之间的亲和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们成为用于在TNF相关疾病、病理或失调中的治疗应用的合适候选物。

[0322] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹膜内;IV-静脉内;Mab或mAb-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0323] 材料和方法

[0324] 动物。可表达人抗体的转基因小鼠是本领域已知的(并且可商购获得(例如,来自GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Fremont, CA等),其表达人免疫球蛋白而不是小鼠IgM或Ig κ 。例如,此类转基因小鼠含有人序列转基因,该人序列转基因经历V(D)J连接、重链类转换和体细胞突变,以产生全套人序列免疫球蛋白(Lonberg等人, Nature 368:856--859 (1994))。轻链转基因可例如部分来自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 区。另外,重链转基因可编码人 μ 和人 $\gamma 1$ (Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845--851 (1996))和/或 $\gamma 3$ 恒定区两者。来源于适当基因型谱系的小鼠可用于免疫和融合过程以产生针对TNF的全人源单克隆抗体。

[0325] 免疫。一个或多个免疫程序可用于生成抗TNF人杂交瘤。前几次融合可在以下示例性免疫方案之后执行,但是也可使用其他类似的已知方案。用1 μ g-1000 μ g重组人TNF对几只14-20周龄雌性和/或手术阉割的转基因雄性小鼠IP和/或ID免疫,该重组人TNF用等体积的TITERMAX或完全弗氏佐剂乳化,最终体积为100 μ L-400 μ L(例如,200)。每只小鼠还可任选地在2个SQ位点中的每一个处接受溶于100 μ L生理盐水的1 μ g-10 μ g。然后可在1-7、5-12、10-18、17-25和/或21-34天后用TNF对小鼠进行IP(1 μ g-400 μ g)和SQ(1 μ g-400 μ g $\times 2$)免疫,TNF用等体积的TITERMAX或不完全弗氏佐剂乳化。小鼠可在12天至25天和25天至40天后通过眼

眶后穿刺进行放血而不采用抗凝血剂。然后允许血液在室温下凝结1小时,收集血清并根据已知方法使用TNF EIA测定法滴定。当重复注射不会导致滴度增加时,执行融合。此时,可给小鼠提供在100 μ L生理盐水中稀释的1 μ g-400 μ g TNF的最终IV加强注射。三天后,通过颈椎脱位对小鼠实施安乐死,将脾无菌取出并浸于含有100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和0.25 μ g/mL两性霉素B (PSA) 的10mL冷磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。通过用PSA-PBS无菌灌注脾脏来收获脾细胞。用冷PSA-PBS洗涤细胞一次,使用台盼蓝染料排除法计数细胞,并将细胞重悬于含有25mM Hepes的RPMI1640培养基中。

[0326] 细胞融合。根据已知方法,例如本领域已知的方法,可将小鼠骨髓瘤细胞与活脾细胞以1:1至1:10的比例进行融合。作为非限制性示例,可将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。然后经过30秒,将沉淀物于37 $^{\circ}$ C下缓慢重悬于1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液 (PEG分子量1,450, Sigma)。然后通过1分钟内缓慢添加10.5mL含有25mM Hepes (37 $^{\circ}$ C) 的RPMI 1640培养基来终止融合。将融合的细胞以500rpm-1500rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基 (含有25mM Hepes、10%胎儿克隆I血清 (Hyclone)、1mM丙酮酸钠、4mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL庆大霉素、2.5%Origen培养补充物 (Fisher) 的RPMI 1640培养基,10%653条件RPMI1640/Hepes培养基、50 μ M 2-巯基乙醇、100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤和16 μ M胸苷),并且然后以200 μ L/孔接种于15个96孔平底组织培养板中。然后将板置于容纳5% CO₂和95%空气的潮湿37 $^{\circ}$ C培养箱中7-10天。

[0327] 小鼠血清中人IgG抗TNF抗体的检测。固相EIA可用于筛选小鼠血清中对人TNF特异的人IgG抗体。简而言之,可在PBS中以2 μ g/mL的TNF包被板过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,可用PBS中的1% (w/v) BSA在室温下以200 μ L/孔封闭孔1小时。立即使用板或将其在-20 $^{\circ}$ C下冷冻以备将来使用。将小鼠血清稀释液在室温下以50L/孔在TNF包被板上温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1%BSA-PBS中的50 μ L/孔HRP标记的山羊抗人IgG (Fc特异性) 在室温下探测1小时。可再次洗涤板,并且在室温下添加100 μ L/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液 (0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠,0.01% H₂O₂和1mg/mL OPD) 15分钟。然后以25 μ L/孔添加终止液 (4N硫酸),并经由自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0328] 杂交瘤上清液中完全人免疫球蛋白的检测。可使用合适的EIA检测分泌完全人免疫球蛋白的生长阳性杂交瘤。简而言之,96孔弹出板 (VWR, 610744) 可在4 $^{\circ}$ C下在碳酸钠缓冲液中用10 μ g/mL山羊抗人IgG Fc包被过夜。将板洗涤并在37 $^{\circ}$ C下用1% BSA-PBS封闭一小时,然后立即使用或在-20 $^{\circ}$ C下冷冻。将未稀释的杂交瘤上清液在37 $^{\circ}$ C下在板上温育一小时。洗涤板,然后用以1:10,000稀释于1% BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人 κ 在37 $^{\circ}$ C下探测一小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。

[0329] 完全人抗TNF反应性的测定。如上所述,可使用合适的RIA或其他测定法同时测定杂交瘤对TNF的反应性。例如,如上所述将上清液在山羊抗人IgG Fc板上温育、洗涤,并且然后用放射性标记的TNF以适当计数/孔在室温下探测1小时。用PBS洗涤孔两次,并且使用合适的计数器定量结合的放射性标记的TNF。

[0330] 可在细胞培养物中扩增人IgG1 κ 抗TNF分泌杂交瘤,并通过有限稀释连续亚克隆。可将所得克隆群体扩增并在冷冻培养基 (95% FBS, 5% DMSO) 中冷冻保存并储存在液氮中。

[0331] 同种型。抗体的同种型测定可使用EIA以与用于筛选特定滴度的小鼠免疫血清相

似的形式完成。如上所述,可将TNF包被在96孔板上,并且可将 $2\mu\text{g/mL}$ 的纯化抗体在室温下在平板上温育一小时。将板洗涤并用以1:4000稀释于1% BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁或HRP标记的山羊抗人IgG₃在室温下探测一小时。再次洗涤该板,并且如上所述用底物溶液温育。

[0332] 人抗人TNF抗体与人TNF的结合动力学。例如,可使用TNF捕获EIA和BIAcore技术适当地评估抗体的结合特征。在如上所述的测定法中,可评估用于结合到包被有 $2\mu\text{g/mL}$ TNF的EIA板上的经纯化人TNF抗体的分级浓度。然后OD可表示为显示相对结合效率的半对数图。

[0333] 定量结合常数可例如如下获得,或通过任何其他已知的合适方法获得。将BIAcore CM-5(羧甲基)芯片置于BIAcore 2000单元中。将HBS缓冲液(0.01M HEPES,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005% v/v P20表面活性剂,pH 7.4)以 $5\mu\text{L/分钟}$ 流过芯片的流动池,直至获得稳定的基线。将溶于 $200\mu\text{L}$ 水中的15mg EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基-氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐)溶液($100\mu\text{L}$)添加到溶于 $200\mu\text{L}$ 水中的 $100\mu\text{L}$ 的2.3mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)溶液。将四十(40) μL 所得溶液注射到芯片上。将 $6\mu\text{L}$ 人TNF溶液($15\mu\text{g/mL}$,溶于10mM乙酸钠中,pH4.8)注射到芯片上,导致约500RU的增加。将缓冲液改变为TBS/Ca/Mg/BSA运行缓冲液(20mM Tris,0.15M氯化钠,2mM氯化钙,2mM乙酸镁,0.5% Triton X-100, $25\mu\text{g/mL}$ BSA,pH 7.4),并在芯片上流动过夜以使其平衡,并水解或封闭任何未反应的琥珀酰亚胺酯。

[0334] 抗体以33.33nM、16.67nM、8.33nM和4.17nM溶解于运行缓冲液中。将流量调节至 $30\mu\text{L/min}$,并且将仪器温度调节至 25°C 。两个流动池用于动力学运行,一个为固定了TNF的流动池(样本),另一个为未衍生化的流动池(空白)。将 $120\mu\text{L}$ 的每个抗体浓度以 $30\mu\text{L/min}$ 注射到流动池上(缔合阶段),随后是不间断的360秒缓冲液流(解离阶段)。通过两次连续注射 $30\mu\text{L}$ 的2M硫氰酸胍,再生芯片表面(组织坏死因子 α /抗体复合物解离)。

[0335] 如本领域已知的,使用BIA评价3.0或CLAMP 2.0进行数据分析。对于每个抗体浓度,从样本传感图中减去空白传感图。对解离(k_d, sec^{-1})和缔合($k_a, \text{mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$)两者进行全局拟合,并计算解离常数(K_d, mol) (k_d/k_a)。如果抗体亲和力足够高,使得所捕获的抗体的RU >100,则进行抗体的附加稀释。

[0336] 结果与讨论

[0337] 产生抗人TNF单克隆抗体。执行几次融合,并将每个融合体接种在15个板(1440孔/融合体)中,产生数十种对人TNF特异的抗体。其中一些被发现由人Ig链和小鼠Ig链的组合组成。剩余的杂交瘤分泌的抗TNF抗体仅由人重链和轻链组成。在人杂交瘤中,预计所有杂交瘤都是IgG1 κ 。

[0338] 人抗人TNF抗体的结合动力学。ELISA分析证实,来自大多数或所有这些杂交瘤的纯化抗体以浓度依赖性方式结合TNF。图1和图2A至图2B示出了这些抗体的相对结合效率的结果。在这种情况下,测量抗体对其关连抗原(表位)的亲合力。应当指出的是,将TNF直接结合到EIA板可引起蛋白质变性,并且表观结合亲和力不能反映与不可变性蛋白质的结合。在一定浓度范围内发现了50%的结合。

[0339] 定量结合常数是使用对该人抗体的BIAcore分析来获得,揭示出几种人单克隆抗体具有非常高的亲和力, K_d 在 1×10^{-9} 至 7×10^{-12} 的范围内。

[0340] 结论。

[0341] 利用来自含有用人TNF免疫的人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行几次融合。产生了一组IgG1 κ 同种型的几种完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。几种所产生的抗体具有介于 1×10^9 和 9×10^{12} 之间的亲和和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们适用于在TNF依赖性疾病、病理或相关病症中的治疗应用。

[0342] 实施例3：产生对人TNF α 具有反应性的人IgG单克隆抗体。

[0343] 总结。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J x C57BL/6J)F₂杂交小鼠(1--4)用重组人TNF α 免疫。一种被命名为GenTNV的融合体产生了八种完全人IgG1 κ 单克隆抗体,其结合到固定的重组人TNF α 。鉴定后不久,将八种细胞系移交至分子生物学研究所(Molecular Biology)进行进一步表征。因为这些Mab在序列上完全是人的,所以它们在人体内的免疫原性预计比cA2(类克)低。

[0344] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;H-重链;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹膜内;IV-静脉内;Mab-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;TNF α -肿瘤坏死因子 α ;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0345] 简介。含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠用于产生对重组人TNF α 特异的完全人单克隆抗体。希望可以使用这些独特的抗体,因为cA2(瑞米凯德)用于治疗性地抑制TNF α 介导的疾病中涉及的炎症过程,具有增加的血清半衰期和降低的与免疫原性相关的副作用的有益效果。

[0346] 如本文所定义,术语“半衰期”表示药物(例如治疗性抗TNF α 抗体)的血浆浓度在一个消除半衰期后减半。因此,在每个随后的半衰期中,消除较少的药物。一个半衰期后,药物在体内的残留量为50%,两个半衰期后为25%,依此类推。药物的半衰期取决于其清除率和分布体积。消除半衰期被认为与体内药物的量无关。

[0347] 材料和方法。

[0348] 动物。GenPharm International已经开发了表达人免疫球蛋白但不表达小鼠IgM或Ig κ 的转基因小鼠。这些小鼠含有功能性人抗体转基因,其经历V(D)J接合、重链类切换和体细胞突变,以产生抗原特异性人免疫球蛋白的全集(1)。轻链转基因部分源自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 基因座。除了几个VH基因之外,重链(HC)转基因编码人 μ 和人 γ 1(2)和/或 γ 3恒定区。源自HCo12/KCo5基因型谱系的小鼠用于免疫和融合过程,以产生本文所述的单克隆抗体。

[0349] 人TNF α 的纯化。使用填充有与Sepharose 4B(Pharmacia)偶联的TNF α 受体-Fc融合蛋白质(p55-sf2)(5)的柱,通过亲和层析从C237A细胞的组织培养上清液中纯化人TNF α 。将细胞上清液与其体积的九分之一的10 $\times$ 杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)混合,并在4 $^{\circ}$ C以4mL/min通过柱。然后用PBS洗涤柱,用0.1M柠檬酸钠、pH 3.5洗脱TNF α ,用2M Tris-HCl pH 8.5中和。将纯化的TNF α 缓冲液交换到10mM Tris、0.12M氯化钠pH 7.5中,并通过0.2 μ m注射器过滤器过滤。

[0350] 免疫。在第0天、第12天和第28天,将约16周龄的雌性GenPharm小鼠用IP(200 μ L)和ID(尾部底部100 μ L)进行免疫,总共100 μ g TNF α (批次JG102298或JG102098)用等体积的

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

[0351] 细胞系。非分泌性小鼠骨髓瘤融合伴侣653在Centocor的产品开发组中于5-14-97接收到细胞生物学技术服务 (CBS) 组。在补充有10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、1mM丙酮酸钠、0.1mM NEAA、2mM L-谷氨酰胺 (均来自JRH Biosciences) 的RPMI培养基 (JRH Biosciences) 中扩增细胞系,并在95% FBS和5% DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。将细胞维持在对数期培养物中直至融合。用PBS洗涤、计数,并在融合前经由台盼蓝染料排除法确定细胞活力 (>95%)。

[0352] 人TNF α 由重组细胞系产生,命名为C237A,在Centocor的Molecular Biology中产生。在补充有5% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、2mM L-谷氨酰胺 (均来自JRH Biosciences) 和0.5g/mL霉酚酸的IMDM培养基 (JRH Biosciences) 中扩增细胞系,并在95% FBS和5% DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中 (13)。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。

[0353] 细胞融合。使用1:1比例的653个鼠骨髓瘤细胞和活的鼠脾细胞进行细胞融合。简而言之,将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。在30℃下,将沉淀在1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液 (PEG分子量为1,450g/mol, Sigma) 中于37℃缓慢重悬浮。通过在1分钟内缓慢添加10.5mL RPMI培养基 (无添加剂) (JRH) (37℃) 来终止融合。将融合细胞以750rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基 (含有10%胎牛血清 (JRH)、1mM丙酮酸钠、2mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL庆大霉素、2.5% Origen培养补充剂 (Fisher)、50 μ M 2-巯基乙醇、1% 653条件反射RPMI媒介、100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤和16 μ M胸苷的RPMI/HEPES培养基中), 并且然后以200 μ L/孔在五个96孔平底组织培养板中铺板。然后将板置于容纳5% CO₂和95%空气的潮湿37℃培养箱中7-10天。

[0354] 检测小鼠血清中的人IgG抗TNF α 抗体。固相EIA用于筛选针对人TNF α 特异性的人IgG抗体的小鼠血清。简而言之,将板用PBS中1 μ g/mL的TNF α 包被过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,将孔用PBS中的1% (w/v) BSA、200 μ L/孔在室温下封闭1小时。立即使用板或在-20℃冷冻备用。将小鼠血清在人TNF α 包被的板上以50 μ L/孔在室温下以两倍连续稀释温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1% BSA-PBS中的50 μ L/孔HRP标记的山羊抗人IgG, Fc特异性 (准确) 在室温下探测1小时。再次洗涤板,并且在室温下添加100 μ L/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液 (0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠, 0.01% H₂O₂和1mg/mL OPD) 15分钟。然后以25 μ L/孔添加终止溶液 (4N硫酸), 并使用自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0355] 杂交瘤上清液中人全免疫球蛋白的检测。因为GenPharm小鼠能够产生小鼠和人免疫球蛋白链两者,所以使用两个单独的EIA测定来测试生长阳性杂交瘤克隆中是否存在人轻链和人重链。如上所述包被板,并将未稀释的杂交瘤上清液在板上于37℃温育一小时。洗涤板,并用以1:10,000稀释于1% BSA-HBSS中的HRP缀合的山羊抗人 κ (Southern Biotech) 抗体或在1% BSA-HBSS中在37℃下稀释至1:30,000的HRP缀合的山羊抗人IgG Fc特异性抗体探测1小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。丢弃在抗人 κ 和抗人IgG Fc EIA形式中均未给出阳性信号的杂交瘤克隆。

[0356] 同种型。使用EIA以与用于筛查小鼠免疫血清的特定滴度相似的形式完成抗体的同种型确定。将EIA板用10: g/mL的山羊抗人IgG (H+L) 在碳酸钠缓冲液中在4EC下包被过夜,并如上所述进行封闭。将来自24孔培养物的纯净上清液在板上在室温下温育一小时。将板洗涤并用以1:4000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ (结合位点) 在室温下探测一小时。再次洗涤板,并如上所述与底物溶液一起温育。

[0357] 结果与讨论。产生完全人抗人TNF α 单克隆抗体。从用重组人TNF α 蛋白质免疫的GenPharm小鼠中执行一次名为GenTNV的融合。通过该融合,筛选出196个生长阳性杂种。鉴定出八种杂交瘤细胞系,其分泌与人TNF α 反应的完全人IgG抗体。这八个细胞系各自分泌人IgG1 κ 同种型的免疫球蛋白,并通过有限稀释将其全部亚克隆两次以获得稳定的细胞系(>90%同质)。表1列出了细胞系名称和相应的C代码命名。将细胞系中的每一个在储存在液氮中的12小瓶研究细胞库中冷冻。

[0358] 从八孔细胞系中的每一个的24孔培养皿的孔中收集的亲本细胞在2-18-99移交给Molecular Biology组用于转染和进一步表征。

[0359] 表1:GenTNV细胞系命名

[0360]	名称	C 代码命名
	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

[0361] 结论。

[0362] 使用来自含有人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行GenTNV融合,这些转基因用在Centocor制备的重组人TNF α 免疫。产生了IgG1 κ 同种型的八种完全人TNF α 反应性IgG单克隆抗体。将亲本细胞系转移到Molecular Biology组以进一步表征和开发。与瑞米凯德相比,这些新的人抗体之一可证明在抗炎中有益,具有降低的免疫原性和过敏性并发症的潜在有益效果。

[0363] 参考文献:

[0364] Taylor等人,International Immunology 6:579-591(1993)。

[0365] Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994)。

[0366] Neuberger,M.Nature Biotechnology 14:826(1996)。

[0367] Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)。

[0368] Scallan等人, Cytokine 7:759-770 (1995)。

[0369] 实施例4:克隆和制备表达人抗TNF α 抗体的细胞系。

[0370] 总结。发现一组具有TNV命名的八种人单克隆抗体(mAb)以明显高的亲和力结合固定的人TNF α 。显示八种mAb中的七种,以有效阻断huTNF α 与重组TNF受体的结合。编码七种mAb的DNA的序列分析证实所有mAb都具有人V区。DNA序列还揭示三对mAb彼此相同,使得八组mAb的原始组仅含有四种不同的mAb,由TNV14、TNV15、TNV148和TNV196代表。基于对mAb的推导的氨基酸序列的分析和体外TNF α 中和数据的结果,选择mAb TNV148和TNV14用于进一步研究。

[0371] 因为在数据库搜索期间,在相同亚组的其他人抗体中的该位置未发现TNV148重链的第75位(框架3)的脯氨酸残基,所以执行定点DNA诱变以在该位置编码丝氨酸残基,以使其符合已知的种系框架e序列。将丝氨酸修饰的mAb命名为TNV148B。将编码TNV148B和TNV14的重链和轻链可变区的PCR扩增的DNA克隆到新制备的表达载体中,该载体基于最近克隆的另一种人mAb(12B75)的重链和轻链基因,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies, Compositions, Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公开为WO 02/12500,其以引用方式全文并入本文。

[0372] 用相应的重链和轻链表达质粒转染P3X63Ag8.653 (653) 细胞或Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) 小鼠骨髓瘤细胞,并通过两轮亚克隆筛选产生高水平重组TNV148B和TNV14 (rTNV148B和rTNV14) mAb的细胞系。生长曲线的评价和mAb产生随时间推移的稳定性表明,653-转染子克隆C466D和C466C在用过的培养物中稳定地产生约125: g/ml的rTNV148B mAb,而Sp2/0转染子1.73-12-122 (C467A) 在用过的培养物中稳定地产生约25: g/ml的rTNV148B mAb。类似的分析表明,Sp2/0-转染子克隆C476A在用过的培养物中产生18: g/ml的rTNV14。

[0373] 简介。先前显示来自人TNF α 免疫的GenPharm/Medarex小鼠 (HCo12/KCo5基因型) 的八个mAb组显示结合人TNF α 并具有完全人IgG1、 κ 同种型。使用简单的结合测定通过评价其阻断TNF α 与重组TNF受体结合的能力来确定本发明的示例性mAb是否可能具有TNF α 中和和活性。基于这些结果、DNA序列结果和几种mAb的体外表征,选择TNV148作为待进一步表征的mAb。

[0374] 克隆编码TNV148 mAb的DNA序列,进行修饰以适合编码合适恒定区的基因表达载体,引入经充分表征的653和Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞,筛选所得的转染细胞系,直至鉴定出亚克隆产生的mAb比原始杂交瘤细胞系多40倍。

[0375] 材料和方法。

[0376] 试剂和细胞。TRIZOL试剂购自Gibco BRL。蛋白酶K得自Sigma Chemical Company。逆转录酶得自Life Sciences, Inc., Taq DNA聚合酶得自Perkin Elmer Cetus或Gibco BRL。限制性酶购自New England Biolabs。QIAquick PCR纯化试剂盒来自Qiagen。QuikChange定点诱变试剂盒购自Stratagene。Wizard质粒小量制备物试剂盒和RNasin来自Promega。光学板得自Packard。¹²⁵碘购自Amersham。定制寡核苷酸购自Keystone/Biosource International。表2中示出了该工作中使用的寡核苷酸的名称、鉴定号和序列。

[0377] 表2:用于克隆、工程化或测序TNV mAb基因的寡核苷酸。

[0378] 寡核苷酸5'14s和HuH-J6编码的氨基酸显示在序列上方。'M'氨基酸残基代表翻译

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

[0379]

名称	I.D.	序列
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10)
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO:11)
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12)
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14)
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15)
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
BsiWI		M D W T W S I (SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID NO:18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21)
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3' (SEQ ID NO:22)
BstBI		T V T V S (SEQ ID NO:23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:24)
Sall		M D M R V (SEQ ID NO:25)
LK7s	362	5'-TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26)
LVgs	363	5'-TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27)
Afl2		T K V D I K (SEQ ID NO:28)
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAAGAATTCGGCGCCTTT (SEQ ID NO:29)
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATtCCAAGAACACGCTGTATC-3' (SEQ ID NO:30)
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5'
		(SEQ ID NO:31)

[0380]

[0381] 获得653个小鼠骨髓瘤细胞的单个冷冻小瓶。在当天将小瓶解冻,并在T烧瓶中在IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺(培养基)中扩增。将这些细胞维持在连续培养中,直到它们在2至3周后用本文所述的抗TNF DNA转染。在解冻日期后5天收获一些培养物,通过离心沉淀,并重悬于95% FBS、5% DMSO中,等分到30个小瓶中,冷冻,并储存以备将来使用。类似地,获得Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞的单个冷冻小瓶。将小瓶解冻,如上所述制备新的冻结,并将冷冻小瓶储存在CBC冷冻箱AA和AB中。将这些细胞解冻并用于本文所述的所有Sp2/0转染。

[0382] 抑制TNF与受体结合的测定。含有TNF mAb的杂交瘤细胞上清液用于测定mAb阻断¹²⁵I标记的TNFα与重组TNF受体融合蛋白质p55-sf2结合的能力(Scallion等人,(1995) Cytokine 7:759-770)。将50:1在PBS中0.5: g/ml的p55-sf2添加到光学板中以在37℃下温育一小时期间包被孔。使用PBS/0.1% BSA作为稀释剂,在96孔圆底板中制备八种TNF细胞上清液的系列稀释液。包含含有抗IL-18mAb的细胞上清液作为阴性对照,并且包含掺有cA2(抗TNF嵌合抗体,瑞米凯德,美国专利5,770,198,以引用方式全文并入本文)的相同抗IL-18上清液作为阳性对照。将¹²⁵I标记的TNFα(58: Ci/: g, D. Shealy)添加到100:1细胞上清液中,使最终TNFα浓度为5ng/ml。将混合物在室温下预温育一小时。洗涤包被的光学板以除去未结合的p55-sf2,并将50:1 ¹²⁵I-TNFα/细胞上清液混合物转移到光学板中。在室温下2小时后,用PBS-Tween洗涤光学板三次。添加100:1 Microscint-20并使用TopCount γ 计数器测定cpm结合。

[0383] V基因扩增和DNA序列分析。将杂交瘤细胞在PBS中洗涤一次,然后添加TRIZOL试剂用于RNA制备。将介于 7×10^6 和 1.7×10^7 个之间的细胞重悬于1ml TRIZOL中。添加200μl氯仿后剧烈摇动试管。将样本在4℃下离心10分钟。将水相转移到新的微量离心管中,并添加等体积的异丙醇。剧烈摇动试管并允许其在室温下温育10分钟。然后将样本在4℃下离心10分钟。将沉淀用1ml 70%乙醇洗涤一次,并在真空干燥器中短暂干燥。用40μl DEPC处理的水重悬RNA沉淀。通过在1%琼脂糖凝胶中分馏0.5μl来确定RNA制剂的质量。将RNA储存在-80℃冷冻机中直至使用。

[0384] 为了制备重链和轻链cDNA,制备包含3μl RNA和1μg寡核苷酸119(重链)或寡核苷酸117(轻链)(见表1)的混合物,体积为11.5μl。将混合物在70℃下在水浴中温育10分钟,并且然后在冰上冷却10分钟。制备单独的混合物,其由2.5μl 10X逆转录酶缓冲液、10μl 2.5mM dNTP、1μl逆转录酶(20单位)和0.4μl核糖核酸酶抑制剂RNasin(1单位)组成。将13.5μl该混合物添加到11.5μl冷却的RNA/寡核苷酸混合物中,并将反应在42℃下温育40分钟。然后将cDNA合成反应物储存在-20℃冷冻机中直至使用。

[0385] 未纯化的重链和轻链cDNA用作模板以PCR扩增可变区编码序列。同时测试五个寡核苷酸对(366/354、367/354、368/354、369/354和370/354,表1)其引发重链DNA扩增的能力。同时测试两个寡核苷酸对(362/208和363/208)其引发轻链DNA扩增的能力。使用2单位的PLATINUM™高保真度(HIFI) Taq DNA聚合酶进行PCR反应,总体积为50μl。每个反应包括2μl cDNA反应、10pmole的每种寡核苷酸、0.2mM dNTP、5μl 10×HIFI缓冲液和2mM硫酸镁。热循环仪程序为95℃持续5分钟,随后进行30个循环(94℃持续30秒,62℃持续30秒,68℃持续1.5分钟)。然后在68℃下最终温育10分钟。

[0386] 为了制备用于直接DNA测序的PCR产物,使用QIAquick™PCR纯化试剂盒根据制造商的方案纯化它们。使用50μl无菌水从旋转柱上洗脱DNA,并且然后使用真空干燥器将其干燥

至10 μ l的体积。然后用1 μ l纯化的PCR产物、10 μ M寡核苷酸引物、4 μ l BigDye TerminatorTM预备反应混合物和14 μ l无菌水建立DNA测序反应,总体积为20 μ l。用寡核苷酸对367/354制备的重链PCR产物用寡核苷酸引物159和360测序。用寡核苷酸对363/208制备的轻链PCR产物用寡核苷酸34和163测序。用于测序的热循环仪程序是25个循环(96 $^{\circ}$ C持续30秒,50 $^{\circ}$ C持续15秒,60 $^{\circ}$ C持续4分钟),随后在4 $^{\circ}$ C过夜。通过聚丙烯酰胺凝胶分离反应产物,并使用ABI377DNA测序仪检测。

[0387] 定点诱变以改变氨基酸。改变TNV148重链可变区DNA序列中的单个核苷酸,以用TNV148 mAb中的丝氨酸残基取代Pro⁷⁵。设计并订购互补寡核苷酸399和400(表1)以使用制造商描述的QuikChangeTM定点诱变方法进行这种改变。首先将两种寡核苷酸通过15%聚丙烯酰胺凝胶分馏,并纯化主要条带。使用10ng或50ng TNV148重链质粒模板(p1753)、5 μ l 10X反应缓冲液、1 μ l dNTP混合物、125ng引物399、125ng引物400和1 μ l Pfu DNA聚合酶制备诱变反应。添加无菌水使总体积达到50 μ l。然后将反应混合物在热循环仪中温育,该热循环仪被编程为在95 $^{\circ}$ C下温育30秒,并且然后循环14次,95 $^{\circ}$ C连续温育持续30秒、55 $^{\circ}$ C持续1分钟、64 $^{\circ}$ C持续1分钟、68 $^{\circ}$ C持续7分钟,随后30 $^{\circ}$ C持续2分钟(1个循环)。这些反应被设计成将诱变寡核苷酸并入其他相同的新合成的质粒中。为了除去原始TNV148质粒,在添加1 μ l DpnI内切核酸酶后,将样本在37 $^{\circ}$ C温育1小时,该核酸内切酶仅切割原始的甲基化质粒。然后将一 μ l反应物用于通过标准热激方法转化Epicurian Coli XL1-Blue supercompetent大肠杆菌,并在LB-氨苄青霉素琼脂板上铺板后鉴定转化的细菌。如制造商所述,使用WizardTM试剂盒制备质粒小量制备物。从WizardTM柱洗脱样本后,用乙醇沉淀质粒DNA以进一步纯化质粒DNA,并且然后重悬于20 μ l无菌水中。然后执行DNA序列分析,以鉴定具有所需碱基变化的质粒克隆,并确认没有其他碱基变化无意中引入TNV148编码序列。使用第4.3节中描述的相同参数,使一 μ l质粒经受循环测序反应,该循环测序反应用3 μ l BigDye混合物、1 μ l pUC19正向引物和10 μ l无菌水制备。

[0388] 来自12B75基因表达载体的构建。执行几个重组DNA步骤以分别从编码12B75的重链和轻链基因的先前克隆的基因组拷贝制备新的人IgG1表达载体和新的人 κ 表达载体,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies,Compositions,Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公布为W0 02/12500,其以引用方式全文并入本文。最终载体被设计成允许用任何适当设计的PCR扩增的可变区简单地一步替换现有的可变区序列。

[0389] 为了修饰质粒p1560中的12B75重链基因,将含有启动子和可变区的6.85kb BamHI/HindIII片段从p1560转移到pUC19以制备p1743。与p1560相比,该质粒的较小尺寸使得能够按照制造商的方案使用QuikChangeTM诱变(使用寡核苷酸BsiWI-1和BsiWI-2)在翻译起始位点的上游引入独特的BsiWI克隆位点。所得的质粒称为p1747。为了在可变区的3'末端引入BstBI位点,设计具有SalI和BstBI位点的5'寡核苷酸引物。该引物与pUC反向引物一起使用,以扩增来自p1747的2.75kb片段。然后将该片段克隆回12B75可变区和HindIII位点中的天然存在的SalI位点,从而引入独特的BstBI位点。所得的中间载体(命名为p1750)可以接受具有BsiWI和BstBI末端的可变区片段。为了制备其中恒定区也来源于12B75基因的重链载体形式,将p1750中的BamHI-HindIII插入物转移到pBR322,以在HindIII位点下游具有EcoRI位点。然后将所得的质粒p1768用HindIII和EcoRI消化,并连接到来自p1744的

5.7kb HindIII-EcoRI片段,该亚克隆是通过将p1560的大BamHI-BamHI片段克隆到pBC中而得到的。然后将所得的质粒p1784用作具有BsiWI和BstBI末端的TNV Ab cDNA片段的载体。完成了附加工作以制备表达载体p1788和p1798,其包括来自12B75基因的IgG1恒定区,并且它们彼此不同的是它们含有多少12B75重链J-C内含子。

[0390] 为了修饰质粒p1558中的12B75轻链基因,将含有12B75启动子和可变区的5.7kb SalI/AflIII片段从p1558转移到质粒L28的XhoI/AflIII位点。该新质粒p1745为诱变步骤提供了较小的模板。使用寡核苷酸(C340sal1和C340sal2)通过QuikChange™诱变在可变区的5'末端引入独特的SalI限制性位点。所得的中间载体p1746具有独特的SalI和AflIII限制性位点,可以克隆可变区片段。克隆到p1746中的任何可变区片段优选地与轻链基因的3'半部分接合。为了从可用于此目的的12B75轻链基因的3'半部分制备限制性片段,将寡核苷酸BAHN-1和BAHN-2彼此退火,以形成含有限制性位点BsiWI、AflIII、HindIII和NotI的双链接头,并且其含有可连接到KpnI和SacI位点的末端。将该接头克隆到pBC的KpnI与SacI位点之间,得到质粒p1757。通过用AflIII消化p1558,然后用HindIII部分消化产生的含有12B75轻链恒定区的7.1kb片段克隆到p1757的AflIII与HindIII位点之间,得到p1762。该新质粒含有BsiWI和AflIII的独特位点,其中含有启动子和可变区的BsiWI/AflIII片段可以转移,结合基因的两个半部分。

[0391] 表达质粒的cDNA克隆和装配。用Klenow酶处理所有RT-PCR反应(参见上文)以进一步填充DNA末端。用限制性酶BsiWI和BstBI消化重链PCR片段,并且然后克隆到质粒L28的BsiWI与BstBI位点之间(使用L28,因为尚未制备基于12B75的中间载体p1750)。克隆插入物的DNA序列分析显示所得构建体是正确的,并且在PCR扩增期间没有引入错误。这些L28质粒构建体(TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV196)的指定鉴定号如表3所示。

[0392] 将TNV14、TNV148和TNV148B重链的BsiWI/BstBI插入物从L28载体转移到新制备的中间载体p1750。这些中间质粒的指定鉴定号如表2所示。对于TNV15和TNV196,没有完成该克隆步骤和后续步骤。然后将可变区转移到两种不同的人IgG1表达载体中。限制性酶EcoRI和HindIII用于将可变区转移到Centocor先前使用的IgG1载体p104中。所得的编码Gm(f+)同种型IgG1的表达质粒命名为p1781(TNV14)、p1782(TNV148)和p1783(TNV148B)(参见表2)。还将可变区克隆到来源于12B75(GenPharm)基因的IgG1恒定区的上游。那些编码G1m(z)同种异型的IgG1的表达质粒也列于表3中。

[0393] 表3. 各种重链和轻链质粒的质粒鉴定号。

[0394] L28载体或pBC载体代表最初的Ab cDNA克隆。将那些质粒中的插入物转移到不完全的基于12B75的载体中以制备中间质粒。一个附加转移步骤产生最终表达质粒,其在线性化后引入细胞中或用于在细胞转染之前纯化mAb基因插入物。(ND) = 未进行测试。

[0395]

Mab	Gm(f+)		G1m(z)	
	128 载体 质粒 ID	中间 质粒 ID	表达 质粒 ID	表达 质粒 ID
重链				
TNV14	p1751	p1777	p1781	p1786
TNV15	p1752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148	p1753	p1778	p1782	p1787
TNV148B	p1760	p1779	p1783	p1788
TNV196	p1754	(ND)	(ND)	(ND)
		pBC 载体 质粒 ID	中间 质粒 ID	表达 质粒 ID
轻链				
TNV14		p1748	p1755	p1775
TNV15		p1748	p1755	p1775
TNV148		p1749	p1756	p1776
TNV196		p1749	p1756	p1776

[0396] 用限制性酶SalI和SacII消化轻链PCR产物,并且然后克隆到质粒pBC的SalI与SacII位点之间。将两种不同的轻链形式(差异为一个氨基酸)命名为p1748和p1749(表2)。DNA序列分析证实这些构建体具有正确的序列。然后将p1748和p1749中的SalI/AflIII片段克隆到中间载体p1746的SalI与AflIII位点之间,分别制备p1755和p1756。然后通过将来自p1755和p1756的BsiWI/AflIII片段转移到新制备的构建体p1762,将这些轻链基因的5'半部分接合到基因的3'半部分,以分别制备最终表达质粒p1775和p1776(表2)。

[0397] 细胞转染、筛查和亚克隆。用各种TNV表达质粒执行总共15次小鼠骨髓瘤细胞转染(参见表3)。这些转染的区别在于(1)宿主细胞是Sp2/0还是653;(2)重链恒定区由Centocor先前的IgG1载体或12B75重链恒定区编码;(3)mAb是TNV148B、TNV148、TNV14或新的HC/LC组合;(4)DNA是线性化质粒还是纯化的Ab基因插入物;以及(5)重链基因中是否存在完整的J-C内含子序列。另外,重复几次转染以增加筛查大量克隆的可能性。

[0398] 在如前所述的标准条件下,通过电穿孔将Sp2/0细胞和653细胞各自用重链和轻链DNA的混合物(各8-12:g)转染(Knight DM等人,(1993)Molecular Immunology 30:1443-1453)。对于转染编号1、2、3和16,在转染之前通过用限制性酶消化使适当的表达质粒线性化。例如,SaI和NotI限制性酶分别用于线性化TNV148B重链质粒p1783和轻链质粒p1776。对于其余转染,通过用BamHI消化重链质粒以及用BsiWI和NotI消化轻链质粒,从质粒载体中分离出仅含有mAb基因的DNA插入物。然后通过琼脂糖凝胶电泳和Qiex纯化树脂纯化mAb基因插入物。用纯化的基因插入物转染的细胞同时用3-5:g的PstI-线性化的pSV2gpt质粒(p13)转染,作为选择标记的来源。在电穿孔后,将细胞接种于96孔组织培养皿中的IMDM、15% FBS、2mM谷氨酰胺中,并在37℃、5% CO₂培养箱中温育。两天后,添加等体积的IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺的2×MHX选择(1×MHX=0.5:g/ml霉酚酸、2.5:g/ml次黄嘌呤、50:g/ml黄嘌呤),并将该板温育附加2至3周,同时形成菌落。

[0399] 如所述,通过ELISA测定从具有菌落的孔处收集的细胞上清液的人IgG。简而言之,将不同稀释度的细胞上清液在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc片段的96孔EIA板中温育,并且然后使用碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)和适当的彩色底物检测结合的人IgG。在每

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

[0400] 对产量最高的亲本克隆进行亚克隆,以鉴定产量较高的亚克隆并制备更均质的细胞系。将96孔组织培养板接种于每孔一个细胞或每孔四个细胞的IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺的1×MHX,并在37℃、5% CO₂培养箱中温育12至20天,直至菌落明显。从每孔容纳一个菌落的孔中收集细胞上清液,并如上所述通过ELISA分析。将所选择的菌落传代到24孔板,并通过定量其上清液中的人IgG水平,在鉴定产量最高的亚克隆之前允许培养物耗尽。当选择的第一轮亚克隆经受第二轮亚克隆时,重复该过程。选择最佳的第二轮亚克隆作为细胞系开发。

[0401] 细胞亚克隆的特征。选择最佳的第二轮亚克隆并执行生长曲线以评价mAb生产水平和细胞生长特征。将T75烧瓶用 1×10^5 个细胞/ml接种于30ml IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺和1X MHX(或无血清培养基)中。以24小时的间隔取出300μl的等分试样并测定活细胞密度。继续分析直至活细胞数小于 1×10^5 个细胞/ml。测定所收集的细胞上清液等分试样中存在的抗体浓度。使用标准rTNV148B或rTNV14 JG92399执行ELISA测定。将样本在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc的ELISA板上温育1小时,并用1:1000稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)检测结合的mAb。

[0402] 为了在存在不同量的MHX选择的情况下比较生长速率,还对两种细胞系进行了不同的生长曲线分析。将细胞系C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺)中并再培养两天。然后将两种细胞培养物分成三种培养物,其中不含MHX、0.2X MHX或1X MHX(1X MHX=0.5:g/ml 霉酚酸、2.5:g/ml 次黄嘌呤、50:g/ml 黄嘌呤)。一天后,用培养物以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。未收集用于mAb生产的等分试样。使用SOP PD32.025中提供的公式计算这些样本的倍增时间。

[0403] 执行附加研究以评价mAb生产随时间推移的稳定性。培养物在含有或不含有MHX选择的IMDM、5% FBS、2mM谷氨酰胺的24孔板中生长。当培养物变得融合时,培养物就分裂成新鲜的培养物,然后允许老的培养物消失。此时,取出等分试样的上清液并在4℃下储存。在55-78天的时间内取出等分试样。在此期间结束时,测试上清液中如上所述的抗人IgG Fc ELISA存在的抗体量。

[0404] 结果与讨论。

[0405] 抑制TNF与重组受体的结合。

[0406] 进行简单的结合测定,以确定杂交瘤细胞上清液中含有的八种TNV mAb是否能够阻断TNFα与受体的结合。首先通过人IgG的标准ELISA分析确定各自细胞上清液中TNV mAb的浓度。然后将重组p55 TNF受体/IgG融合蛋白质p55-sf2包被在EIA板上,并允许¹²⁵I标记的TNFα在不同量的TNV mAb存在下与p55受体结合。如图1所示,除了八种TNV mAb中的一种TNV mAb(TNV122)之外的所有mAb均有效阻断了TNFα与p55受体的结合。事实上,TNV mAb在抑制TNFα结合方面似乎比掺入阴性对照杂交瘤上清液中的cA2阳性对照mAb更有效。这些结果被解释为表明TNV mAb极有可能在基于细胞的测定和体内阻断TNFα生物活性,因此需要进行附加分析。

[0407] DNA序列分析。

[0408] 确认RNA编码人mAb。

[0409] 作为表征在受体结合测定中显示TNF α 阻断活性的七种TNV mAb (TNV14、TNV15、TNV32、TNV86、TNV118、TNV148和TNV196) 的第一步,从生产这些mAb的七种杂交瘤细胞系中分离总RNA。然后将每个RNA样本用于制备人抗体重链或轻链cDNA,其包括每个mAb的完整信号序列、完整可变区序列和部分恒定区序列。然后在PCR反应中扩增这些cDNA产物,直接测序PCR扩增的DNA,而不首先克隆片段。测序的重链cDNA与小鼠DP-46中存在的五种人种系基因之一>90%相同(图2A至图2B)。类似地,测序的轻链cDNA与小鼠中存在的人种系基因之一100%或98%相同(图3)。这些序列结果证实,转录成cDNA并测序的RNA分子编码人抗体重链和人抗体轻链。应当指出的是,因为使用映射到信号序列编码序列的5'末端的寡核苷酸对可变区进行PCR扩增,所以信号序列的前几个氨基酸可能不是原始TNV翻译产物的实际序列,但它们确实代表重组TNV mAb的实际序列。

[0410] 独特的中和mAb。

[0411] 对每种mAb的重链和轻链两者的整个可变区的cDNA序列的分析显示TNV32与TNV15相同,TNV118与TNV14相同,并且TNV86与TNV148相同。受体结合测定的结果与DNA序列分析一致,即TNV86和TNV148两者在阻断TNF结合时比TNV118和TNV14两者好约4倍。因此,后续工作仅针对四种独特的TNV mAb,TNV14、TNV15、TNV148和TNV196。

[0412] 四种mAb的相关性

[0413] DNA序列结果显示,编码四种TNV mAb重链的基因彼此高度同源,并且似乎都来源于相同的种系基因DP-46(图2A至图2B)。另外,因为重链CDR3序列中的每一个都是如此相似且长度相同,并且因为它们都使用J6外显子,所以它们显然是由单个VDJ基因重排事件引起的,随后是体细胞变化,使每个mAb独特。DNA序列分析显示,四种mAb中只有两种不同的轻链基因(图3)。TNV14和TNV15中的轻链可变区编码序列彼此相同并且与人 κ 链的Vg/38K家族的代表性种系序列相同。TNV148和TNV196轻链编码序列彼此相同但不同于两个核苷酸位置的种系序列(图3)。

[0414] 推断的四种mAb的氨基酸序列揭示了实际mAb的相关性。四种mAb含有四条不同的重链(图4),但只有两条不同的轻链(图5)。TNV mAb序列与种系序列之间的差异主要限于CDR结构域,但三个mAb重链也不同于框架区中的种系序列(图4)。与DP-46种系编码的Ab框架区相比,TNV14相同,TNV15相差一个氨基酸,TNV148相差两个氨基酸,并且TNV196相差三个氨基酸。

[0415] cDNA的克隆、位点特异性诱变和最终表达质粒的装配。cDNA的克隆。基于PCR扩增的可变区的DNA序列,命令新的寡核苷酸执行另一轮PCR扩增,目的是使待克隆的编码序列适应克隆到表达载体中。在重链的情况下,用限制性酶BsiWI和BstBI消化该第二轮PCR的产物,并克隆到质粒载体L28中(质粒鉴定号显示在表2中)。在轻链的情况下,第二轮PCR产物用SalI和AflIII消化并克隆到质粒载体pBC中。然后对单个克隆进行测序以确认它们的序列与从PCR产物的直接测序获得的先前序列相同,这揭示了潜在异质分子群中每个位置处最丰富的核苷酸。

[0416] 改变TNV148的位点特异性诱变。在中和TNF α 生物活性时,一致地观察到mAb TNV148和TNV196比下一个最佳mAb (TNV14)强四倍。然而,如上所述,TNV148和TNV196重链框架序列不同于种系框架序列。TNV148重链序列与其他人抗体的比较表明,许多其他人类mAb

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

[0417] TNV196重链的类似比较表明,与框架3中的种系序列不同的三种氨基酸在人mAb中可能是罕见的。如果施用给人,这些差异可能使TNV148和TNV196具有免疫原性。因为TNV148只有一个关注的氨基酸残基,这个残基被认为对TNF α 结合不重要,所以使用位点特异性诱变技术来改变TNV148重链编码序列中的单个核苷酸(在质粒p1753中),从而编码种系Ser残基以代替75位的Pro残基。所得的质粒称为p1760(参见表2)。将所得的基因和mAb称为TNV148B,以将其与原始TNV148基因和mAb区分开(参见图5)。

[0418] 最终表达质粒的装配。制备新的抗体表达载体,其基于先前克隆为基因组片段的12B75重链和轻链基因。尽管制备了不同的TNV表达质粒(参见表2),但在每种情况下,5'侧翼序列、启动子和内含子增强子来源于相应的12B75基因。对于轻链表达质粒,完整的J-C内含子、恒定区编码序列和3'侧翼序列也来源于12B75轻链基因。对于导致最终生产细胞系的重链表达质粒(p1781和p1783,参见下文),人IgG1恒定区编码序列来源于Centocor先前使用的表达载体(p104)。重要的是,此处报道的最终生产细胞系表达TNV mAb的不同同种异型(Gm(f+)),而不是原始的杂交瘤衍生的TNV mAb(G1m(z))。这是因为来源于GenPharm小鼠的12B75重链基因编码CH1结构域C末端的Arg残基,而Centocor的IgG1表达载体p104编码该位置的Lys残基。制备其他重链表达质粒(例如p1786和p1788),其中J-C内含子、完整恒定区编码序列和3'侧翼序列来源于12B75重链基因,但是没有选择用这些基因转染的细胞系作为生产细胞系。仔细设计载体以允许一步克隆未来PCR扩增的V区,这将导致最终表达质粒。

[0419] 将PCR扩增的可变区cDNA从L28或pBC载体转移到中间阶段,基于12B75的载体,其提供启动子区和部分J-C内含子(质粒鉴定号参见表2)。然后将含有抗体基因的5'半部分的限制性片段从这些中间阶段载体转移到最终表达载体,其提供相应基因的3'半部分以形成最终表达质粒(质粒鉴定号参见表2)。

[0420] 细胞转染和亚克隆。通过限制性消化将表达质粒线性化,或者从质粒主链中纯化每个质粒中的抗体基因插入物。通过电穿孔用重链和轻链DNA转染Sp2/0和653小鼠骨髓瘤细胞。完成了十五次不同的转染,其中大多数是Ab所定义的独特的、Ab基因的特定特征,基因是否在线性化的完整质粒或纯化的基因插入物上,以及宿主细胞系(汇总在表4中)。通过ELISA测定来自对霉酚酸具有抗性的克隆的细胞上清液中人IgG的存在,并使用纯化的rTNV148B作为参考标准曲线进行定量。

[0421] 产量最高的rTNV148B细胞系

[0422] 将来自rTNV148B转染2的产量最佳的653个亲本系(在用过的24孔培养物中产生5-10:g/ml)亚克隆,以筛查产量较高的细胞系并制备更均一的细胞群。亲本系2.320、2.320--17和2.320--20的两个亚克隆在用过的24孔培养物中产生约50:g/ml,比其亲本系增加5倍。第二轮亚克隆系2.320-17和2.320-20的克隆亚领先

[0423] 显示了编码每种mAb的重链和轻链质粒的鉴定号。在用纯化的mAb基因插入物进行转染的情况下,包括质粒p13(pSV2gpt)作为gpt选择标记的来源。重链恒定区由用于编码瑞米凯德('旧')的相同人IgG1表达载体或通过12B75(GenPharm/Medarex)重链基因('新')内包括的恒定区编码。H1/L2是指由TNV14重链和TNV148轻链组成的“新型”mAb。质粒p1783和p1801的区别仅在于它们的重链基因含有多少J-C内含子。右侧显示了转染数字,它定义了

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

[0424] 表4:细胞转染汇总。

转染编号	质粒	HC		DNA	
		载体	形式	Sp2/0	653
mAb	HC/LC/gpt				
rTNV148B	1783/1776	旧	直链	1	2
rTNV14	1781/1775	旧	直链	3	-
[0425] rTNV148B	1788/1776/13	新	插入物	4,6	5,7
rTNV14	1786/1775/13	新	插入物	8,10	9,11
rTNV148	1787/1776/13	新	插入物	12	17
rH1/L2	1786/1776/13	新	插入物	13	14
rTNV148B	1801/1776	旧	直链	16	

[0426] 用过的24孔培养上层清液的ELISA测定表明,这些第二轮亚克隆均生产介于98和124:g/ml之间,这比第一轮亚克隆增加至少2倍。向这些653个细胞系分配C代码命名,如表5所示。

[0427] 将来自rTNV148B转染1的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆。亲本系1.73的两轮亚克隆导致鉴定在用过的24孔培养物中生产25:g/ml的克隆。将该Sp2/0细胞系命名为C467A(表5)。

[0428] 产量最高的rTNV14细胞系

[0429] 将来自rTNV14转染3的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆一次。据发现,亚克隆3.27-1是用过的24孔培养物的最高产量,产量为19:g/ml。将该细胞系命名为C476A(表5)。

[0430] 表5:所选择的生产细胞系及其C代码的汇总。

[0431] 原始克隆名称的第一个数字表示细胞系来源的转染。此处报道的所有C-编码细胞系均来源于用限制性酶线性化的重链和轻链完整质粒的转染。

原先的	用过的 24 孔			
	克隆名称	C 代码	宿主细胞	产量
mAb				
rTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103:g/ml
[0432]	2.320-20-111	C466B	653	102:g/ml
	2.320-17-4	C466C	653	98:g/ml
	2.320-20-99	C466D	653	124:g/ml
	1.73-12-122	C476A	Sp2/0	25:g/ml
rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19:g/ml

[0433] 亚克隆细胞系的特征

[0434] 为了更仔细地表征细胞系生长特征并在更大规模上确定mAb生产水平,使用T75培养物执行生长曲线分析。结果显示四个C466系列细胞系中的每个C466系列细胞系达到介于 1.0×10^6 和 1.25×10^6 个细胞/ml之间的峰值细胞密度,并且最大mAb积累水平介于110和140:g/ml之间(图7)。相比之下,产量最佳的Sp2/0亚克隆C467A达到 2.0×10^6 个细胞/ml的峰值细胞密度和25:g/ml的最大mAb积累水平(图7)。未对生产rTNV14的细胞系C476A进行生长曲线分析。

[0435] 进行附加生长曲线分析以比较不同浓度的MHX选择的生长速率。最近的观察结果

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

[0436] 为了评价在约60天的时间内从各种细胞系生产mAb,对含有或不含有MHX选择的培养物执行稳定性测试。并非所有细胞系都保持高mAb产量。在培养仅两周后,克隆C466A的产量比研究开始时少约45%。克隆C466B的产量似乎也显著下降。然而,克隆C466C和C466D保持相当稳定的产量,C466D显示出最高的绝对产量水平(图9)。

[0437] 结论

[0438] 从最初的八种针对人TNF α 的人mAb组中,基于包括蛋白质序列和TNF中和效能的几种标准以及TNV14,选择TNV148B作为优选的。制备生产大于100:g/ml rTNV148B和19:g/ml rTNV14的细胞系。

[0439] 实施例5:使用单次推注注射使用抗TNF抗体和对照的关节炎小鼠研究

[0440] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。

[0441] 结果:当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。(参见图10)。

[0442] 图11A至图11C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周依然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0443] 实施例6:使用抗TNF抗体和对照作为多次推注剂量的关节炎小鼠研究

[0444] 在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2、3和4周

时对从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的免疫应答诱导和药代动力学清除率。

[0445] 结果:当分析体重作为从给药前的变化时,未发现显著差异。用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。(参见图12)。

[0446] 图13A至图13C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差异。

[0447] 实施例7:使用抗TNF抗体和对照作为单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0448] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0449] 当将体重分析为来自给药前的变化时,所有治疗均获得相似的体重增加。用3mg/kg或5mg/kg TNV148或5mg/kg cA2处理的动物在研究早期(在第2周和第3周时)获得了显著量的体重。只有用TNV148处理的动物在较晚的时间点维持显著的体重增加。3mg/kg和5mg/kg TNV148两者治疗的动物均在7周时显示显著性,并且3mg/kg TNV148的动物在注射后8周仍显著升高。(参见图14)。

[0450] 图15示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0451] 实施例8:使用抗TNF抗体和对照作为抗TNF抗体与修饰的抗TNF抗体之间的单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0452] 比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0453] 当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第1周和第3至第8周时显著增加。用1mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第5周、第6周和第8周时也获得显著的体重增加。(参见图16)。

[0454] 图17示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第8周)。TNV148治疗组和1mg/kg的cA2治疗组均在第4周时显示出AI的显著降低。尽管先前的研究(P-099-017)显示,在单次1mg/kg腹腔内推注后,TNV148在降低关节炎指数方面略有效,但本研究显示两种版本的TNV抗体治疗组的AI均略高。虽然(第6周除外)1mg/kg的cA2治疗组当与10mg/kg cA2组相比时没有显著增加,并且TNV148治疗组在第7周和第8周时显著较高,但在研究中的任何时间点,1mg/kg cA2、1mg/kg TNV148和1mg/kg TNV148B之间不存在AI的显著差异。

[0455] 实施例9:G0-VIVA—戈利木单抗(人抗TNF α 抗体)静脉内治疗已接受甲氨蝶呤治疗的活动性多关节病程幼年特发性关节炎的儿科受试者的多中心开放标签试验

[0456] 概要

[0457] 戈利木单抗是全人单克隆抗体(mAb),其以高亲和力和特异性结合人肿瘤坏死因子 α (TNF α)并中和TNF α 生物活性。TNF α 是关键炎症介质,其中高水平的TNF α 涉及疾病诸如类风湿性关节炎(RA)和幼年特发性关节炎(JIA)的病理生理学。用于静脉内(IV)用途的**SIMPONI[®]**(戈利木单抗)正在由申办方开发,以向患有多关节JIA(pJIA)的患者提供另选的施用途径(与其他可用的抗TNF α 试剂相比)和方便的剂量方案(即,每8周[q8w]施用一次)。

[0458] 目标和假说

[0459] 主要目标

[0460] 该研究的主要目的是评估已接受甲氨蝶呤(MTX)治疗 ≥ 2 个月但pJIA表现为 ≥ 5 个关节为活动性关节炎的受试者(年龄为2岁至小于18岁)接受静脉内施用戈利木单抗后的药代动力学(PK)。

[0461] 次要目标

[0462] 本研究的次要目的是评价患有pJIA的受试者中IV戈利木单抗的PK、疗效(体征和症状的减轻、身体机能和生活质量)、安全性(不良事件[AE]、严重AE[SAE]和实验室参数的评估)和免疫原性(抗戈利木单抗的抗体)。

[0463] 假说

[0464] 在本研究中没有计划正式的假设测试。

[0465] 研究设计概况

[0466] 这是一项评价IV戈利木单抗治疗目前已接受MTX治疗但仍患有活动性pJIA的受试者的PK、安全性和疗效的3期、开放标签、单臂、多中心研究。研究群体将包括接受MTX的pJIA的受试者,年龄为2岁至小于18岁,具有至少3个月的pJIA病史,并且 ≥ 5 个关节为活动性关节炎。在第0周大约招募120名受试者,以确保大约有100名受试者在第52周继续参与研究。招募模式预期产生大约10%的年龄为2岁至6岁、大约20%的年龄为6岁至12岁、以及大约70%的年龄为12岁至小于18岁的受试者群体。

[0467] 在第0天、第4天和q8w(± 3 天)到第28周和此后q8w(± 1 周)(最大单剂量240mg[最大体表面积(BSA) $3.0\text{m}^2 \times 80\text{mg}/\text{m}^2$]),所有受试者将接受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 戈利木单抗的IV输注(经过30分钟 ± 10 分钟)。商业MTX将以 $10\text{--}30\text{mg}/\text{m}^2/\text{周}$ 的稳定剂量施用于BSA $<1.67\text{m}^2$ 的受试者,或者以 $15\text{mg}/\text{周}$ 的稳定最少剂量施用于BSA $\geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者,直到第28周(除非出于有文件证明的安全性原因施用较低剂量的MTX,或者除非有文件证明的国家/地区或站点法规禁止

BSA $\geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者施用15mg/周或以上的剂量)。在第52周完成研究的受试者将具有进入研究的长期扩展 (LTE) 阶段的选择。在LTE期间,所有受试者将继续接受80mg/m² IV戈利木单抗q8w (± 1 周;最大单剂量240mg) 到第244周。完成第244周访视的所有受试者预期参与第252周的安全性随访。在第252周之后,将提供戈利木单抗(对于在pJIA适应症药物商业化之前已完成完整252周研究的受试者),直到该药物在受试者所在的国家/地区批准并上市用于pJIA,或只要证明对小孩有益(在受试者无法获得商业药物的情况下)。

[0468] 由于这是所有受试者接受相同的基于BSA的IV戈利木单抗剂量的开放标签研究,因此将不建立外部数据监测委员会。

[0469] 研究结束被限定为对LTE中的最后一个受试者的最后随访评估。

[0470] 受试者群体

[0471] 研究对象的年龄必须是2岁至小于18岁,在招募时体重 $>15\text{kg}$ 。

[0472] 疾病的发作必须在受试者的16岁生日之前,必须持续至少3个月,并且必须是以下亚型之一的活动性pJIA: 类风湿因子阳性或阴性pJIA; ≥ 3 个月无全身性症状但 ≥ 3 个月具有多发性关节炎的全身性JIA;扩展的寡关节JIA;与附着点炎相关的关节炎或多关节幼年银屑病性关节炎 (PsA)。

[0473] 受试者必须具有 ≥ 5 个关节为活动性关节炎,如由美国风湿病学会 (ACR) 筛选和招募标准所定义。受试者目前须以 $\geq 10\text{mg}/\text{m}^2$ 的每周剂量使用口服、肌内或皮下MTX (在筛选之前 ≥ 2 个月),但仍患有活动性pJIA。

[0474] 剂量和施用

[0475] 戈利木单抗

[0476] 该研究将具有1个活动性治疗组,并且所有受试者将在第0周、第4周和q8w (± 3 天) 到第28周和此后q8w (± 1 周) 到第244周接受80mg/m²戈利木单抗IV输注。在每次访视时将计算BSA,并且将根据需要调节戈利木单抗的剂量以将剂量保持在80mg/m²。将使用Mosteller方程计算BSA: $\text{BSA} (\text{m}^2) = ([\text{高度} (\text{cm}) \times \text{重量} (\text{kg})] / 3600)^{1/2}$ 。最大单剂量将为戈利木单抗240mg。

[0477] 甲氨蝶呤

[0478] 受试者将至少在到第28周以与研究入选时相同的基于BSA的剂量(对于BSA $< 1.67\text{m}^2$ 的受试者,每周10至30mg/m²;或者对于BSA $\geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者,为至少15mg/周) 接受商业MTX。应尽每一项努力确保受试者在到第28周访视期间保持相同剂量和施用MTX的途径,除非发生由MTX引起的耐受不良或AE。

[0479] 受试者还将接受每周 $\geq 5\text{mg}$ 的商业叶酸或在每周MTX剂量后的第二天给予亚叶酸(MTX剂量的一半)。在小于12岁的儿童中,叶酸或亚叶酸的施用将由医师自行决定。

[0480] 疗效评价和终点

[0481] 疗效评价包括如下:

[0482] • 关节评价(活动性关节数和运动范围有限的关节数)

[0483] • 医师对疾病活动的全局评估

[0484] • 儿童健康评估问卷 (CHAQ; 包括父母/受试者对总体健康状况的评估和父母/受试者对疼痛的评估)

[0485] • CRP

[0486] 没有计划的主要疗效终点或重要次要终点。其他疗效终点包括：

[0487] • 随时间推移JIA ACR 30、50、70和90响应者的受试者比例

[0488] • 随时间推移CHAQ相对于基线的变化

[0489] • 随时间推移CRP浓度的变化

[0490] • 随时间推移具有非活动性疾病的受试者比例

[0491] • 随时间推移接受pJIA药物治疗临床缓解的受试者比例

[0492] • 每次访视时pJIA评分组相对于基线的改善

[0493] • 随时间推移到第52周，按疾病亚型和/或年龄划分的JIA ACR30、JIA ACR 50、JIA ACR 70和JIA ACR 90响应者的受试者比例

[0494] • 随时间推移幼年关节炎疾病活动评分 (JADAS) 10、27和71评分相对于基线的变化

[0495] • 随时间推移实现JADAS 10、27和71最小疾病活动的受试者比例

[0496] 药代动力学评价和终点

[0497] 血清戈利木单抗浓度将在第0周、第4周、第8周、第12周、第20周、第28周、第52周、第100周、第148周、第196周和第244周进行评价并随时间推移进行汇总。将利用到第28周的数据进行群体PK分析，以表征戈利木单抗的PK以及鉴定患有pJIA的儿科群体中PK的重要协变量。

[0498] 将汇总戈利木单抗浓度，并且将评价到第52周和到LTE的PK暴露。

[0499] 本研究的主要终点是第28周的PK暴露 (第28周的谷浓度) 和8周的一个给药间隔内的贝叶斯稳态曲线下面积[AUC_{ss}] (来自群体PK建模和模拟)。

[0500] 重要次要PK终点包括：

[0501] • 第52周的PK暴露 (第52周的谷浓度) 和第52周的贝叶斯AUC_{ss} (来自群体PK建模和模拟)。

[0502] 安全性评价

[0503] 安全性评价包括以下评估：AE；输注反应；变应性反应；临床实验室测试 (血液学、化学和妊娠测试)；生命体征；体检；高度和体重；葡萄膜炎；和结核的早期检测。

[0504] 免疫原性评价

[0505] 抗戈利木单抗的抗体将在第0周、第4周、第8周、第12周、第28周、第52周、第100周、第148周、第196中和第244周时从所有受试者收集的血清样本中进行评价。

[0506] 统计方法

[0507] 受试者信息

[0508] 无论受试者是否接受研究试剂使用，将汇总招募到本研究的所有受试者的人口统计和基线疾病特征和先前的药物数据。将汇总已接受至少1次研究试剂施用的所有受试者的药代动力学数据。将汇总招募到本研究的所有受试者的疗效分析。将汇总所有接受过治疗的受试者的安全性评估。

[0509] 样本量

[0510] 样本量确定并非基于统计学考虑。目标是具有将足以建立群体PK模型和暴露响应模型 (如果可行的话) 的样本量。另外，还考虑了将提供合理安全性评估的样本量。基于这些考虑，选择了大约120名受试者的样本量，假设如果20名受试者退出或如果他们无法提供PK

样本,则在第52周,大约100名受试者的样本量将继续参与研究。考虑到PK时间点的稀疏采样,该样本量被认为足以建立群体PK模型,以及提供来自大约100名受试者的1年安全性数据。

[0511] 疗效分析

[0512] 未计划主要疗效终点分析和重要次要疗效终点分析。

[0513] 对于招募到本研究的所有受试者将汇总以下内容:

[0514] • 随时间推移JIA ACR 30、50、70和90响应者的受试者比例

[0515] • 随时间推移CHAQ相对于基线的变化

[0516] • 随时间推移CRP浓度的变化

[0517] • 随时间推移具有非活动性疾病的受试者比例

[0518] • 随时间推移接受pJIA药物治疗临床缓解 (ACR标准) 的受试者比例

[0519] • 随时间推移pJIA评分组相对于基线的改善

[0520] • 随时间推移到第52周,按疾病亚型和/或年龄划分的JIA ACR30、50、70和90响应者的受试者比例

[0521] • 随时间推移JADAS 10、27和71评分相对于基线的变化

[0522] • 随时间推移实现JADAS 10、27和71最小疾病活动的受试者比例

[0523] 药代动力学分析

[0524] 该研究的主要目的是表征JIA群体中戈利木单抗的PK暴露 (第28周的谷浓度和来自群体PK建模和模拟的8周的剂量间隔内的贝叶斯AUC_{ss})。

[0525] 血清戈利木单抗浓度将随时间推移进行汇总。另外,将对到第28周的数据进行群体PK分析,以表征戈利木单抗的PK以及鉴定和定量患有JIA的儿科群体中PK的重要协变量。将使用非线性混合效应建模 (NONMEM) 方法来估计清除率和分布体积。

[0526] 安全性分析

[0527] 将通过评价到第252周的AE、临床实验室测试和生命体征发现的汇总来评估安全性。

[0528] 免疫原性分析

[0529] 在研究期间抗戈利木单抗抗体的出现和滴度将针对接受戈利木单抗的施用并且收集有适当样本以用于检测抗戈利木单抗的抗体的所有受试者 (即,具有在其第一次戈利木单抗施用之后获得的至少1个样本的受试者) 随时间推移进行汇总。

[0530] 药代动力学/药效动力学分析

[0531] 将探索血清戈利木单抗浓度与疗效之间的关系。将探索和开发合适的PK/药效动力学 (PD) 模型以描述暴露-响应关系。

[0532] 时间和事件计划表

表 6: 到第 52 周的筛选													
	筛选期 (前 6 周)	第 0 周 ^a	第 4 周 ^a	第 8 周 ^a	第 12 周 ^a	第 16 周 ^a	第 20 周 ^a	第 24 周 ^a	第 28 周 ^a	第 36 周 ^a	第 44 周 ^a	第 52 周 ^a	最终的安全随访访视 ^b
程序和评价													
管理													
知情同意/同意	X												
病史/人口统计数据	X												
伴随药物收集	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
纳入/排除标准	X	X											
研究试剂													
IV 施用研究试剂		X	X		X		X		X	X	X	X	
安全性													
系统审查	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
体格检查 ^c	X			X			X			X			
体重测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
高度测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
生命体征	X	X ^d	X ^d	X	X ^d	X	X ^d	X	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X
常规实验室分析	X	X	X		X		X		X	X	X	X	X
乙型肝炎病毒筛选	X												
丙型肝炎病毒筛选	X												
QuantiFERON [®] -TB Gold 测试 ^e	X											X ^f	
TB 评价 (问卷)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
胸部 x 射线 ^g	X												
葡萄膜炎评价 ^h	X						X				X		X
类风湿因子	X												
ANA/抗 dsDNA 抗	X							X				X	X

[0533]

表 6: 到第 52 周的筛选

体													
妊娠试验 (血清) ⁱ	X												
妊娠试验 (尿液) ⁱ		X	X		X		X		X	X	X	X	
输注反应评价 ^j		X	X		X		X		X	X	X	X	
不良事件	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
疗效													
关节评估	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
JIA 评估 ^{k,l}		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
药代动力学													
戈利木单抗 浓度 ^{m,n}		2X	2X	X	2X		X		X			X	X
群体 PK ^o		← X ^o →											
免疫原性													
抗戈利木单抗 抗体 ⁿ		X	X	X	X				X			X	X
a. 所有计划的访视应在第 28 周的预期访视的±3 天内和第 28 周到第 52 周之后的±1 周内发生。 b. 在第 52 周之前中止研究试剂施用但未撤销同意的所有受试者必须在最后一次输注之后大约 8 周返回研究站点进行最终的安全性访视 (第 10.2 节)。 c. 包括在每次体检时的皮肤检查和大约每 6 个月的 Tanner 分期。 d. 应在输注前采集生命体征; 在 15 分钟和 30 分钟时 (输注期间的 15 分钟间隔); 以及在 60 分钟和 90 分钟时 (在输注后 1 小时的观察期期间)。 e. 在 QuantiFERON®-TB Gold 测试未在该国家/地区获得批准/注册或者结核菌素皮肤测试是由当地卫生部门强制执行的国家/地区, 也应进行结核菌素皮肤测试。 f. 具有潜伏性 TB 病史和潜伏性 TB 持续治疗或已完成充分治疗的记录的受试者不需要测试。 g. 根据当地和国家/地区法规对处于 TB 风险的患有 JIA 的儿童发起免疫抑制剂的胸部 x 射线筛选。 h. 研究者应至少每 6 个月对所有受试者进行一次评价 (基于体检和面谈)。另外, 所有受试者均被要求在研究期间以指定的间隔 (基于 JIA 亚型、ANA 测试结果、JIA 开始时的年龄和 JIA 持续时间) 由眼科医生/验光师执行裂隙灯评价。 i. 所有具有育龄可能性 (即, 初潮后) 的女性受试者必须在筛选期间以及在研究药物施用之前的所有访视时测试妊娠阴性。 j. 在施用研究试剂之后, 将观察受试者的输注反应症状至少 60 分钟。 k. JIA 评估包括以下评估: 医师对疾病活动的全局评估、儿童健康评估问卷 (CHAQ) 和晨僵持续时间。CHAQ 应在该访视的任何测试、程序或其他咨询之前完成, 以防止影响受试者的感知。 l. 由父母或护理人员完成的 CHAQ; 优选地, 应在每次访视时由同一父母或护理人员完成。在研究条目中 15 岁至小于 18 岁的受试者可与父母/护理人员联合完成评估。 m. 在第 0 周、第 4 周和第 12 周访视时, 将收集血清戈利木单抗浓度的 2 个样本 (由上文计划表中的“2X”指示): 1 个样本将在输注之前立即收集, 并且另一个样本将在输注结束之后大约 1 小时 (例如, ±10 分钟) 收集。对于其余访视中的每一次访视, 将仅收集 1 个血清戈利木单抗样本, 如果在该次访视时输注研究试剂, 则应在输注前收集。应从与 IV 输注管线不													

[0534]

[0535]

表 6: 到第 52 周的筛选														
同的臂抽取输注后样本，或者如果使用与用于药物施用相同的进入管线，则必须冲洗 IV 输注管线并清除可能剩余的任何残留药物，并且应在获取样本之前抽取和丢弃 1mL 血液。 n. 相同的血清样本可用于测量戈利木单抗浓度和检测抗戈利木单抗的抗体。对于研究试剂施用的访视，必须在施用研究试剂之前收集用于评估戈利木单抗浓度和抗戈利木单抗抗体的所有血样。 o. 将在第 0 周和第 8 周之间的除第 0 周、第 4 周和第 8 周访视之外的任何时间从所有受试者收集团体 PK 的血清戈利木单抗浓度的另外一个样本；该样本必须在研究试剂施用之前或之后至少 24 小时收集，并且不得在定期计划访视（例如，第 8 周）时收集。 缩写：ANA=抗核抗体；CHAQ=儿童健康评估问卷；CRP=C 反应蛋白质；dsDNA=双链脱氧核糖核酸；IV=静脉内；PK=药代动力学；TB=结核病。														

[0536]

表 7: 从第 60 周到第 156 周（长期扩展）														
	第 60 周 ^a	第 68 周 ^a	第 76 周 ^a	第 84 周 ^a	第 92 周 ^a	第 100 周 ^a	第 108 周 ^a	第 116 周 ^a	第 124 周 ^a	第 132 周 ^a	第 140 周 ^a	第 148 周 ^a	第 156 周 ^a	最终的安全随访访视 ^b
程序和管理														
伴随药物收集	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
研究试剂														
IV 施用研究试剂	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
安全性														
系统审查	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
体格检查 ^c	X			X			X			X			X	
体重测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
高度测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
生命体征	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X
常规实验室分析			X			X			X			X		X
ANA/抗 dsDNA 抗体			X			X			X			X		X
QuantiFERON [®] -TB Gold 测试 ^e						X ^f						X ^f		
TB 评价（问卷）	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

表 7: 从第 60 周到第 156 周 (长期扩展)

	第 60 周 ^a	第 68 周 ^a	第 76 周 ^a	第 84 周 ^a	第 92 周 ^a	第 10 0 周 ^a	第 10 8 周 ^a	第 11 6 周 ^a	第 12 4 周 ^a	第 13 2 周 ^a	第 14 0 周 ^a	第 14 8 周 ^a	第 15 6 周 ^a	最 终 的 安 全 随 访 访 视 ^b
胸部 x 射线 ^g	X													
葡萄膜炎评价 ^h		X			X			X			X			X
妊娠试验 (尿 液) ⁱ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
输液反应评价 ^j	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
不良事件	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
疗效														
关节评估		X		X		X		X		X		X		X
JIA 评估 ^{k,l}		X		X		X		X		X		X		X
CRP		X		X		X		X		X		X		X
药代动力学														
戈利木单抗浓 度 ^m						X						X		X
免疫原性														
抗戈利木单抗 抗体 ^m						X						X		X
a. 所有计划访视应在预期访视的±1 周内发生。 b. 在第 156 周之前中止研究试剂施用但未撤销同意的所有受试者必须在最后一次输注之后大约 8 周返回研究站点进行最终的安全性访视 (第 10.2 节)。 c. 包括在每次体检时的皮肤检查和大约每 6 个月的 Tanner 分期。 d. 应在输注前采集生命体征; 在 15 分钟和 30 分钟时 (输注期间的 15 分钟间隔); 以及在 60 分钟和 90 分钟时 (在输注后 1 小时的观察期期间)。 e. 在 QuantiFERON®-TB Gold 测试未获得批准/注册或者结核菌素皮肤测试是由当地卫生部门强制执行的国家/地区, 也应进行结核菌素皮肤测试。 f. 具有潜伏性 TB 病史和潜伏性 TB 持续治疗或已完成充分治疗的记录的受试者不需要测试。 g. 根据当地和国家/地区法规对处于 TB 风险的患有 JIA 的儿童发起免疫抑制剂的胸部 x 射线筛选。 h. 研究者应至少每 6 个月对所有受试者进行一次评价 (基于体检和面谈)。另外, 所有受试者均被要求在研究期间以指定的间隔 (基于 JIA 亚型、ANA 测试结果、JIA 开始时的年龄和 JIA 持续时间) 由眼科医生/验光师执行裂隙灯评价。 i. 所有具有育龄可能性 (即, 初潮后) 的女性受试者必须在研究药物施用之前的所有访														

[0537]

表 7: 从第 60 周到第 156 周 (长期扩展)

	第 60 周 a	第 68 周 a	第 76 周 a	第 84 周 a	第 92 周 a	第 10 0 周 a	第 10 8 周 a	第 11 6 周 a	第 12 4 周 a	第 13 2 周 a	第 14 0 周 a	第 14 8 周 a	第 15 6 周 a	最 终 的 安 全 随 访 访 视 b
[0538]	视时测试妊娠阴性。 j. 在施用研究试剂之后, 将观察受试者的输注反应症状至少 60 分钟。 k. JIA 评估包括以下评估: 医师对疾病活动的全局评估、儿童健康评估问卷 (CHAQ) 和晨僵持续时间。CHAQ 应在该访视的任何测试、程序或其他咨询之前完成, 以防止影响受试者的感知。 l. 由父母或护理人员完成的 CHAQ; 优选地, 应在每次访视时由同一父母或护理人员完成。在研究条目中 15 岁至小于 18 岁的受试者可与父母/护理人员联合完成评估。 m. 相同的血清样本可用于测量戈利木单抗浓度和检测抗戈利木单抗的抗体。对于研究试剂施用的访视, 必须在施用研究试剂之前收集用于评估戈利木单抗浓度和抗戈利木单抗抗体的所有血样。 缩写: ANA=抗核抗体; CHAQ=儿童健康评估问卷; CRP=C 反应蛋白质; dsDNA=双链脱氧核糖核酸; IV=静脉内; TB=结核病。													

表 8: 从第 164 周到第 252 周 (长期扩展的延续)

	第 16 4 周 a	第 17 2 周 a	第 18 0 周 a	第 18 8 周 a	第 19 6 周 a	第 20 4 周 a	第 21 2 周 a	第 22 0 周 a	第 22 8 周 a	第 23 6 周 a	第 24 4 周 a	第 25 2 周 a	最 终 的 安 全 随 访 访 视 b
[0539]	程序和评价 管理 伴随药物收集 研究试剂 IV 施用研究试剂 安全性 系统审查 体格检查^c												
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			X			X			X			X	

表 8: 从第 164 周到第 252 周 (长期扩展的延续)

	第 16 4 周 ^a	第 17 2 周 ^a	第 18 0 周 ^a	第 18 8 周 ^a	第 19 6 周 ^a	第 20 4 周 ^a	第 21 2 周 ^a	第 22 0 周 ^a	第 22 8 周 ^a	第 23 6 周 ^a	第 24 4 周 ^a	第 25 2 周 ^a	最终的安全随访访视 ^b
体重测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
高度测量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
生命体征	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X	X
常规实验室分析		X			X			X			X		X
ANA/抗 dsDNA 抗体		X			X			X			X		
QuantiFERON [®] -TB Gold 测试 ^e					X ^f						X ^f		
TB 评价 (问卷)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
胸部 x 射线 ^g	X												
葡萄膜炎评价 ^h	X			X			X			X		X	X
妊娠试验 (尿液) ⁱ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
输液反应评价 ^j	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
不良事件	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
疗效													
关节评估	X		X		X		X		X		X		X
JIA 评估 ^{k,l}	X		X		X		X		X		X		X
CRP	X		X		X		X		X		X		X
药代动力学													
戈利木单抗浓度 ^m					X						X		X
免疫原性													
抗戈利木单抗抗体 ^m					X						X		X
a. 所有计划访视应在预期访视的±1 周内发生。 b. 在第 244 周之前中止研究试剂施用但未撤销同意的所有受试者必须在最后一次输注之后大约 8 周返回研究站点进行最终的安全性访视 (第 10.2 节)。 c. 包括皮肤检查和 Tanner 分期。 d. 应在输注前采集生命体征; 在 15 分钟和 30 分钟时 (输注期间的 15 分钟间隔); 以及在 60 分钟和 90 分钟时 (在输注后 1 小时的观察期期间)。 e. 在 QuantiFERON [®] -TB Gold 测试未获得批准/注册或者结核菌素皮肤测试是由当地卫生部门强制执行的国家/地区, 也应进行结核菌素皮肤测试。 f. 具有潜伏性 TB 病史和潜伏性 TB 持续治疗或已完成充分治疗的记录的受试者不需要													

[0540]

表 8: 从第 164 周到第 252 周 (长期扩展的延续)

	第 16 4 周 a	第 17 2 周 a	第 18 0 周 a	第 18 8 周 a	第 19 6 周 a	第 20 4 周 a	第 21 2 周 a	第 22 0 周 a	第 22 8 周 a	第 23 6 周 a	第 24 4 周 a	第 25 2 周 a	最终 的 安全 随 访 访 视 b
[0541]	测试。 g. 根据当地和国家/地区法规对处于 TB 风险的患有 JIA 的儿童发起免疫抑制剂的胸部 x 射线筛选。 h. 研究者应至少每 6 个月对所有受试者进行一次评价 (基于体检和面谈)。另外, 所有受试者均被要求在研究期间以指定的间隔 (基于 JIA 亚型、ANA 测试结果、JIA 开始时的年龄和 JIA 持续时间) 由眼科医生/验光师执行裂隙灯评价。 i. 所有具有育龄可能性 (即, 初潮后) 的女性受试者必须在研究药物施用之前的所有访视时测试妊娠阴性。 j. 在施用研究试剂之后, 将观察受试者的输注反应症状至少 60 分钟。 k. JIA 评估包括以下评估: 医师对疾病活动的全局评估、儿童健康评估问卷 (CHAQ) 和晨僵持续时间。CHAQ 应在该访视的任何测试、程序或其他咨询之前完成, 以防止影响受试者的感知。 l. 由父母或护理人员完成的 CHAQ; 优选地, 应在每次访视时由同一父母或护理人员完成。在研究条目中 15 岁至小于 18 岁的受试者可与父母/护理人员联合完成评估。 m. 相同的血清样本可用于测量戈利木单抗浓度和检测抗戈利木单抗的抗体。对于研究试剂施用的访视, 必须在施用研究试剂之前收集用于评估戈利木单抗浓度和抗戈利木单抗抗体的所有血样。 缩写: ANA=抗核抗体; CHAQ=儿童健康评估问卷; CRP=C 反应蛋白质; dsDNA=双链脱氧核糖核酸; IV=静脉内; TB=结核病。												

[0542] 缩写

[0543]	ACR	美国风湿病学会
[0544]	AE	不良事件
[0545]	ALT	丙氨酸转氨酶
[0546]	ANA	抗核抗体
[0547]	ARC	预期事件审查委员会
[0548]	AS	强直性脊柱炎
[0549]	AST	天冬氨酸转氨酶
[0550]	BCG	卡介苗
[0551]	β -hCG	β -人绒毛膜促性腺激素
[0552]	BSA	体表面积
[0553]	CHAQ	儿童健康评估问卷
[0554]	CL/BSA	体表面积归一化的药物清除率
[0555]	CL/F	表观全身清除率
[0556]	CRF	病例报告表

[0557]	CRP	C反应蛋白
[0558]	DAS	疾病活动指数评分
[0559]	DMARD	改善疾病的抗风湿药物
[0560]	DNA	脱氧核糖核酸
[0561]	DRC	数据审查委员会
[0562]	dsDNA	双链脱氧核糖核酸
[0563]	eDC	电子数据捕集
[0564]	FDA	美国食品与药品监督管理局
[0565]	GCP	良好的临床实践
[0566]	HAQ	健康评估问卷
[0567]	HAQ-DI	健康评估问卷残疾指数；
[0568]	HBsAg	HBV表面抗原
[0569]	乙肝病毒	乙型肝炎病毒
[0570]	HBV	
[0571]	HIV	人免疫缺陷病毒
[0572]	HLA-B27	人白细胞抗原B27
[0573]	HLA-DR4	人白细胞抗原DR4
[0574]	HLA-DR5	人白细胞抗原DR5
[0575]	HLA-DR8	人白细胞抗原DR8
[0576]	ICH	国际协调会议
[0577]	IEC	独立伦理委员会
[0578]	IL-1 β	白介素-1 β
[0579]	IL-6	白介素-6
[0580]	IRB	机构审查委员会
[0581]	JADAS	幼年关节炎疾病活动评分
[0582]	JIA	幼年特发性关节炎
[0583]	LFT	肝功能测试
[0584]	LTE	长期扩展
[0585]	mAb	单克隆抗体
[0586]	MedDRA	监管活动医学词典
[0587]	MTX	甲氨蝶呤
[0588]	NSAID	非甾体抗炎药物
[0589]	PD	药效动力学
[0590]	PED	儿科
[0591]	pJIA	多关节幼年特发性关节炎
[0592]	PK	药代动力学
[0593]	PQC	投诉产品质量
[0594]	PPD	纯化的蛋白质衍生物
[0595]	PRCSG	儿科风湿病学协作研究组

[0596]	PRINTO	儿科风湿病学国家试验组织
[0597]	PRO	患者报告的结果
[0598]	PsA	银屑病性关节炎
[0599]	q4w	每4周
[0600]	q8w	每8周
[0601]	RA	类风湿性关节炎
[0602]	RBC	红细胞
[0603]	RF	类风湿因子
[0604]	SAE	严重不良事件
[0605]	SC	皮下
[0606]	SF-36	36项短期健康调查
[0607]	SI	国际单位制
[0608]	SOC	系统器官类别
[0609]	TB	结核
[0610]	TNF α	肿瘤坏死因子 α
[0611]	URTI	上呼吸道感染
[0612]	美国	美国
[0613]	VAS	视觉模拟量表
[0614]	vdH-S	修正的van der Heijde Sharp
[0615]	V/F	分布的表观体积
[0616]	Vss	稳态下的分布体积
[0617]	WBC	白细胞
[0618]	1. 引言	

[0619] **SIMPONI[®]** (戈利木单抗)是具有免疫球蛋白G1重链同种型 (G1m[z]同种异型) 和 κ 轻链同种型的完全人单克隆抗体 (mAb)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。戈利木单抗具有包含SEQ ID NO:36的重链 (HC) 和包含SEQ ID NO:37的轻链 (LC)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。

[0620] 戈利木单抗与具有高亲和力和特异性的人肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的可溶性和跨膜生物活性形式形成高亲和力、稳定的复合物,这防止TNF α 与其受体结合并中和TNF α 生物活性。未观察到与其他TNF α 超家族配体的结合;具体地,戈利木单抗不结合或中和人淋巴毒素。TNF α 主要由活化的单核细胞、巨噬细胞和T细胞合成,作为跨膜蛋白质,其自缔合以形成生物活性的同源三聚体并通过蛋白水解从细胞表面快速释放。TNF α 与p55或p75 TNF受体的结合导致受体胞质结构域的聚集并引发信号传导。肿瘤坏死因子已被鉴定为响应各种刺激而产生的关键前哨细胞因子,并且随后通过激活半胱天冬酶依赖的凋亡途径和转录因子核因子 (NF) - κ B和激活蛋白质-1 (AP-1) 促进炎症反应。肿瘤坏死因子 α 还通过其在生发中心的免疫细胞组织中的作用来调节免疫应答。TNF α 的升高表达已经与慢性炎性疾病诸如类风湿性关节炎 (RA) 以及脊柱状关节病诸如银屑病关节炎 (PsA) 和强直性脊柱炎 (AS) 有关。TNF α 是这些疾病特有的关节炎和结构损伤的重要媒介。

[0621] 如抗TNF α 试剂的临床研究中所证实的那样,阻断TNF α 活性可防止由过量TNF α 引起

的有害作用。用于静脉内 (IV) 用途的 **SIMPONI[®]** (戈利木单抗) 正在开发, 以向患有多关节 JIA (pJIA) 的患者提供另选的施用途 (与其他可用的抗 TNF α 试剂相比) 和方便的剂量方案 (即, 每 8 周 [q8w] 施用一次)。

[0622] 1.1. 背景技术

[0623] 1.1.1. 幼年特发性关节炎

[0624] 幼年特发性关节炎是一种排除诊断, 其涵盖在 16 岁之前开始、持续超过 6 周并且原因未知的所有形式的关节炎¹⁸。它是儿童中最常见的慢性风湿性疾病, 并且根据国际风湿病学协会联盟 (ILAR) 分类为特征在于不同的临床表现和特征的 7 种亚型 (全身性关节炎、寡关节炎、类风湿因子 [RF]-阴性多关节炎、RF-阳性多关节炎、附着点炎相关性关节炎、银屑病关节炎、未分化的关节炎)¹⁶。

[0625] JIA 的异质性表明多种因素导致疾病的病因和发病机制, 并且遗传因素和环境因素均已被牵连。这些包括隐含感染作为触发机制, 人白细胞抗原 (HLA) 和非 HLA 分子之间的联系以及疾病发展, 以及导致组织炎症和关节破坏的免疫异常。感染在疾病发展中的作用仍然是未知的¹⁸。然而, 在 JIA 中, HLA-DR5 和 HLA-DR8 基因座抗原已被认为是患有寡关节炎的年幼女孩的相关贡献因素, 而 HLA-DR4 已被认为是患有 RF 阳性多关节炎的大龄儿童的相关贡献因素, 并且 HLA-B27 已被认为是患有寡关节疾病的大龄男孩的相关贡献因素^{15,17}。

[0626] 尽管 JIA 的病因学和发病机制尚不清楚, 但可能涵盖在成人 RA 的进展中起作用的相同细胞类型和根本机制¹⁵。所涉及的细胞实体包括巨噬细胞, 该巨噬细胞会产生多种炎性细胞因子和炎症介质。巨噬细胞来源的细胞因子 (诸如 TNF α) 似乎在 RA 患者关节慢性炎症过程的诱导和持续以及该疾病的全身表现中起关键作用⁶, 尽管 TNF α 在全身 JIA 中的作用不太令人信服³。

[0627] 一些研究表明, 在患有 RA 的成人中升高的炎性细胞因子 (例如白介素-1 β [IL-1 β , 白介素-6 [IL-6] 和 TNF α) 的水平在患有 JIA 的患者的滑液和血清中也升高^{9,19,12,3,20}。这些研究还发现在患有各种 JIA 亚组的患者中具有不同的细胞因子谱。

[0628] 幼年特发性关节炎是儿童短期和长期残疾的重要原因¹⁴, 但治疗的新进展已证明临床上重要的进步。在过去的 10 年中, 研究表明, 40% 至 60% 的患者在随访接受 JIA 药物治疗时具有非活动性疾病或临床缓解。过去十年来, 功能结果有所改善, 2.5% 至 10% 的患者具有严重的功能失能¹⁸。然而, JIA 的特别严重的并发症包括线性生长抑制、骨质疏松症、局部生长障碍、巨噬细胞活化综合征和虹膜睫状体炎¹⁸。

[0629] JIA 治疗的目的是获得对疾病的完全控制, 保持小孩的身体和心理完整性, 并防止与疾病或其治疗相关的任何长期后果。对 JIA 的大部分治疗是 NSAID、关节内和全身性皮质类固醇、甲氨蝶呤 (MTX) 和其他 DMARD。生物药物的引入为对常规抗风湿剂有抗性的 JIA 患者的治疗提供了重要的新治疗选择¹⁸。目前批准的用于治疗 pJIA 的生物疗法包括依那西普、阿达木单抗、阿巴西普和托珠单抗; 卡那单抗和托珠单抗已被批准用于全身性 JIA。

[0630] 1.1.2. 类风湿性关节炎和幼年特发性关节炎的戈利木单抗临床研究

[0631] 已证实作为 SC 注射给药的戈利木单抗对于患有 RA、PsA、强直性脊柱炎 (AS) 和溃疡性结肠炎的成人是有效的。静脉内施用戈利木单抗也已证明在患有 RA 的成人中有效。其他抗 TNF α 试剂在患有 JIA 的受试者的治疗中有效。申办方进行了基于 BSA 的 SC 戈利木单抗

(CNT0148JIA3001)剂量的研究,以评估与使用SC戈利木单抗治疗多种JIA亚型(包括幼年PsA)相关联的益处和风险。

[0632] 以下描述了IV戈利木单抗在成人中的CNT0148ART3001研究的结果以及SC戈利木单抗在患有JIA的受试者中的CNT0148JIA3001研究的结果。

[0633] 1.1.2.1.成人类风湿性关节炎中的戈利木单抗静脉内

[0634] CNT0148ART3001(随机、安慰剂对照、多中心、双盲研究)的主要目的是评估已接受MTX治疗但仍患有活动性RA的成年受试者中,与单独的MTX相比,IV施用戈利木单抗2mg/kg+MTX的临床疗效。计划了大约564名受试者,并将592名受试者随机化。

[0635] 受试者是在筛选之前至少3个月诊断为RA的18岁或以上的男性或女性,在筛选时和基线时具有活动性RA(定义为 ≥ 6 个压痛关节和 ≥ 6 个肿胀关节),且已接受MTX治疗。在筛选时,受试者必须具有 $\geq 1.0\text{mg/dL}$ (正常上限= 1.0mg/dL)的C反应蛋白(CRP)测量值并且为RF阳性。

[0636] 在30分钟 $\pm$ 10分钟的输注时间内,随机分配到戈利木单抗的受试者接受2mg/kg的戈利木单抗静脉内。另外,在整个研究期间,受试者维持其稳定剂量的商业MTX(介于15mg/周和25mg/周之间)。

[0637] 基于 $<1.5\text{mg/dL}$ 或 $\geq 1.5\text{mg/dL}$ 的筛选CRP对随机化进行分层。在第0周、第4周和此后每8周(q8w)将受试者随机化2:1到戈利木单抗+MTX或安慰剂+MTX。整个研究的治疗持续时间为100周,并具有12周的安全性随访期。

[0638] 总共592名受试者中的570名(96%)完成了24周的研究。其余22名(4%)受试者是在第24周之前中止研究。大多数中止是由于AE:戈利木单抗+MTX组中的9名[2.3%]受试者和安慰剂+MTX组中的2名[1.0%]受试者)。

[0639] 与安慰剂+MTX组中的受试者相比,戈利木单抗+MTX组中显著更大比例的受试者(58.5%)实现主要终点,即第14周的ACR 20响应(24.9%, $P<0.001$)。在筛选时CRP $\geq 1.5\text{mg/dL}$ 或 $<1.5\text{mg/dL}$ 的受试者中,治疗效果是一致的。早在第2周,在戈利木单抗+MTX和安慰剂+MTX之间观察到ACR 20响应者比例的显著差异。还实现了重要次要疗效终点。与安慰剂+MTX组中的受试者相比,戈利木单抗+MTX组中显著更大比例的受试者是在第14周具有良好或中度的疾病活动指数评分(DAS)28响应(使用CRP)(81.3%)(40.1%, $P<0.001$)。

[0640] 与安慰剂+MTX组中的受试者相比,戈利木单抗+MTX组中的受试者(0.500)在第14周时健康评估问卷残疾指数(HAQ-DI)残疾评分具有显著更大的改善(0.125, $P<0.001$)。在第14周(分别为68.4%与43.1%, $P<0.001$)和第24周(分别为67.6%与45.2%, $P<0.001$),与安慰剂+MTX组相比,戈利木单抗+MTX组的HAQ-DI(≥ 0.25)也存在临床相关改善的显著差异。与接受安慰剂+MTX的受试者相比,接受戈利木单抗+MTX的受试者是在第24周表现出显著更大的ACR 50响应率(34.9%)(13.2%, $P<0.001$)。

[0641] 除了小群体量的亚组(即, <15 名受试者)之外,在人口统计、基线临床特征和之前暴露于RA的药物的亚组内观察到一致的治疗益处。

[0642] 在第12周,相对于安慰剂+MTX治疗,在戈利木单抗+MTX治疗中观察到36项短期健康调查(SF-36)的精神和身体成分汇总评分以及SF-36仪器的所有8个量表在统计意义上显著更大的改善(对于所有比较, $P<0.001$)。在到第24周保持这些改善。

[0643] 到CNT0148ART3001的第16周(早期脱离前的安慰剂对照周期),安慰剂组中43.7%

的受试者和戈利木单抗组中47.3%的受试者具有AE;AE的最高发生率在感染和侵染系统器官类别(SOC)中,安慰剂组和戈利木单抗组分别为20.8%和24.3%,上呼吸道感染(URTI)是最常报告的AE(安慰剂组和戈利木单抗组分别为5.6%和5.1%)。到第112周,79.1%的接受金黄色葡萄球菌治疗的受试者具有AE;AE的最高发病率在感染和侵染SOC中(50.5%),并且URTI是最常报告的AE(11.5%)。

[0644] 到CNT0148ART3001的第16周,安慰剂组中1.0%的受试者和戈利木单抗组中3.8%的受试者具有SAE。每个SOC内SAE的发生率为<1.0%,并且在不止1个受试者中未出现SAE。到第112周,18.2%的接受金黄色葡萄球菌治疗的受试者具有SAE;SAE的最高发生率发生在感染和侵染SOC(5.5%)以及肌肉骨骼和结缔组织疾病SOC(3.4%)中,并且最常报告的SAE为RA(2.1%)。

[0645] 到第24周,在CNT0148ART3001研究中1名患者死亡;该受试者随机接受安慰剂+MTX治疗,从未接受戈利木单抗,并且死于推测的脑血管意外(中风)。到第112周,在CNT0148ART3001研究中另外5名受试者死亡。在切换到戈利木单抗2mg/kg+MTX之后,随机化用安慰剂+MTX治疗的两名受试者死亡;死亡原因为猝死(n=1)以及严重脱水、艰难梭菌结肠炎和心房纤颤的并发症(n=1)。在本研究中,随机化用2mg/kg戈利木单抗+MTX治疗的三名受试者死亡;报告的死亡原因为急性腹部综合征(后来被诊断为腹膜结核[TB],n=1)、推测的心肌梗塞(MI,n=1)和继发于由鲍氏不动杆菌引起的脓性肺脓肿的脓毒性休克(n=1)。

[0646] 在研究CNT0148ART3001中,到第16周末报告恶性肿瘤。在接受研究试剂之前,安慰剂+MTX组中报告了1例未治疗期肺腺癌。到安慰剂对照周期(第24周),在戈利木单抗组中报告了1例恶性肿瘤(乳腺癌)。到第112周,报告了另外5例恶性肿瘤,包括基底细胞癌、具有慢性淋巴细胞白血病家族病史的受试者中的慢性淋巴细胞白血病、原位子宫癌、鲍恩氏病和基底细胞癌。到第112周末报告淋巴瘤。

[0647] 到CNT0148ART3001的第16周,戈利木单抗组中0.8%的受试者具有严重的感染,包括阑尾炎、菌血症和间质性肺疾病(并发症)。安慰剂组中没有受试者具有严重的感染。到第112周,6.2%的接受金黄色葡萄球菌治疗的受试者具有严重感染。在不止一名受试者中发生的严重感染是肺炎(n=5)、UTI(n=4)和丹毒(n=2)。

[0648] 到CNT0148ART3001的第16周,安慰剂组中0.5%的受试者和戈利木单抗组中2.5%的受试者具有输注反应。到第112周,3.9%的接受金黄色葡萄球菌治疗的受试者具有输注反应,并且0.4%的输注因输注反应而变得复杂。应该指出的是,所有安慰剂输注仅由0.9%生理盐水组成,而不是由真正匹配的安慰剂组成。没有注意到需要中止研究试剂的严重输注反应。存在与研究药物不相关的过敏反应的情况。

[0649] 在第0周、第4周,在IV施用2mg/kg戈利木单抗后第4周观察到41.56μg/mL的中值峰值血清戈利木单抗浓度(即,输注后戈利木单抗浓度),然后进行q8w(±1周)施用。该峰值高于报告的SC戈利木单抗每4周施用一次50mg(q4w)。接受2mg/kg q8w IV戈利木单抗和MTX的受试者的中值谷血清戈利木单抗浓度在第12周为0.28μg/mL,并且在第20周为0.22μg/mL;这些水平类似于SC戈利木单抗50mg报告的那些水平。在类似的暴露周期内,对戈利木单抗的总体暴露是对SC戈利木单抗50mg暴露的大约3倍。

[0650] 来自IV戈利木单抗程序的数据表明,与接受安慰剂的受试者相比,用戈利木单抗

治疗的受试者放射学进展较少。在第24周时,在戈利木单抗+MTX治疗组和安慰剂+MTX之间的总修正的van der Heijde Sharp (vdH-S) 评分中自基线存在显著差异(安慰剂+MTX: 1.09 ± 3.194 、戈利木单抗2mg/kg+MTX: 0.03 ± 1.899 [$p < 0.001$])。在糜烂和关节间隙变窄评分自基线的变化中,还观察到有利于IV戈利木单抗的显著差异。当与安慰剂+MTX相比时,具有基于最小可检测变化的放射学进展的受试者比例对于用戈利木单抗+MTX治疗的受试者的总vdH-S评分 ($P < 0.001$) 以及糜烂 ($P = 0.001$) 和关节间隙变窄测量 ($P = 0.01$) 两者而言显著较低。

[0651] 1.1.2.2. 幼年特发性关节炎的皮下戈利木单抗

[0652] CNT0148JIA3001是目前已接受MTX治疗但在具有活动性pJIA的儿科受试者中每4周(q4w) 给药一次基于BSA的 $30\text{mg}/\text{m}^2$ (最高50mg/剂) SC戈利木单抗的随机退出、双盲、安慰剂对照、平行组、多中心研究。研究群体包括接受MTX的pJIA的受试者,年龄为2岁至小于18岁,具有至少6个月的pJIA病史,并且 ≥ 5 个关节为活动性关节炎。所有受试者从第0周到第16周在研究的活动性治疗部分接受SC戈利木单抗。在第16周,将JIA ACR 30响应者随机化以接受安慰剂或戈利木单抗32周;在该32周周期期间出现红肿的随机化接受安慰剂的受试者重新开始戈利木单抗治疗。安慰剂对照周期到第48周,并且从第48周到第248周计划长期扩展。

[0653] 计划了大约170名受试者,并且173名受试者被招募到本研究。在第48周疗效和安全性分析中包括所有173名受试者。173名受试者中的十九个到第16周中止了研究试剂(由于:没有疗效 [$n = 14$]; AE [$n = 4$]; 撤销同意 [$n = 1$]), 并且154名受试者进入随机退出(76名受试者接受安慰剂,并且78名受试者继续施用戈利木单抗)。

[0654] 除了CNT0148JIA3001中数值较低的平均CRP/ESR水平和中值CRP/ESR水平之外,173名招募的受试者的基线疾病特征构成了与pJIA中抗TNF α 试剂的其他临床研究相当的具有中等至严重JIA的群体。

[0655] 在第16周,JIA ACR 30响应的受试者比例为87.3%。另外,在第16周,JIA ACR 50、JIA ACR 70和JIA ACR 90响应者的比例分别为79.2%、65.9%和36.4%。

[0656] 该研究不满足其主要次要终点和重要次要终点,因为在第16周时为JIA ACR 30响应者并且在第16周和第48周之间未经历红肿疾病的受试者比例在第16周和第48周之间随机化以继续接受戈利木单抗治疗的受试者与在第16周和第48周之间随机化以接受安慰剂的受试者相比没有显著差异(59%相对于52.6%, $p = 0.41$)。所有敏感性分析和重要次要终点表明在治疗组之间没有统计意义上的显著差异。当未满足预先指定的疗效终点时,申办方提前终止研究。

[0657] 基于0.1-1.0mg/dL范围内的第0周CRP水平评价红肿率的事后分析表明,一般来讲,在具有较高基线CRP水平的受试者中,接受持续戈利木单抗治疗的受试者具有比在第16周随机化接受安慰剂的受试者显著更少的红肿发作。

[0658] 当基于到第48周观察到的数据(使用第0周作为基线并比较到第48周的每次访视的药物/安慰剂效应)分析JIA ACR响应率时,在第48周实现了89%至95.9%的JIA ACR 30响应率和53.4%至56.2%的JIA ACR 90响应率。与在第16周随机化接受安慰剂的受试者相比,在第16周随机化接受戈利木单抗的受试者中,在所有访视中核心集的改善到第48周都是类似的,并且全部表示在疾病方面的临床上有意义的改善,例如,在医师对疾病活动的全

局评估中,中值百分比改善为94.6%和95.1%,并且在活动性关节数中,中值百分比改善为90.9%和100%。

[0659] 到CNT0148JIA3001的第48周收集药代动力学(PK)和免疫原性数据。在接受戈利木单抗30mg/m² SC并随机化以保持活动性治疗的患有pJIA的受试者中,在第12周、第24周和第48周的中值谷戈利木单抗浓度分别为1.16μg/mL、1.12μg/mL和0.95μg/mL,表明稳态水平到第48周保持不变。此外,在患有pJIA的受试者中,不同年龄组、体重四分位数、体重指数四分位数和体重类别中的稳态谷戈利木单抗浓度是相似的。总体而言,这些浓度类似于在用SC戈利木单抗治疗的C0524T06中在成人活动性RA群体(已接受MTX)中观察到的PK暴露,并且因此支持以下假设:30mg/m² SC q4w的基于BSA的戈利木单抗方案足以产生与在接受戈利木单抗50mg SC q4w的成人RA群体中观察到的浓度相当的浓度。此外,PK和疗效分析示出,在患有pJIA的受试者中,在4个稳态谷戈利木单抗浓度四分位数中观察到类似的疗效(如通过JIA ACR 30响应和红肿率所测量的)。另外,在有红肿和没有红肿的受试者之间没有观察到明显的PK差异。

[0660] 就免疫原性而言,40.1%的受试者使用最近开发的耐药免疫测定分析产生了抗戈利木单抗抗体。新耐药免疫测定与先前用于成人戈利木单抗RA研究的测定法相比更灵敏,并且尽管存在可检测的血清戈利木单抗水平,但允许检测抗戈利木单抗抗体。在随机化并保留在戈利木单抗30mg/m²SC+MTX的受试者中,30.8%产生了抗戈利木单抗抗体;抗体滴度往往较低。当评价免疫原性对PK、疗效和安全性的影响时,发现当滴度水平>1:100时,阳性抗戈利木单抗抗体状态降低了稳态谷戈利木单抗浓度。然而,抗体对疗效的影响不太敏感,需要更高的滴度>1:1000,以便与疗效的明显降低相关联。由于仅大约5%的患有JIA的受试者产生了滴度>1:1000的抗戈利木单抗抗体,因此确定免疫原性不是CNT0148JIA3001主要终点未实现的贡献因素。另外,阳性抗戈利木单抗抗体状态似乎不与注射部位反应的较高发生率相关。

[0661] 到第48周报告AE的受试者比例为87.9%。最常见的报告的系统器官类别的AE是感染和侵染(67.1%),并且主要是上呼吸道感染和鼻咽炎。对于随机化接受安慰剂的受试者(82.9%)和随机化继续接受戈利木单抗治疗的受试者(78.2%),在第16周和第48周之间报告的AE无显著差异;然而,需要注意的是,在重新随机化之前,将研究的随机退出部分中的所有受试者暴露于戈利木单抗16周。13.3%的受试者报告了严重的不良事件。最常报告的SAE是JIA的恶化(6.4%)。2.9%的受试者报告具有严重感染(肺炎、尿道感染、带状疱疹、上呼吸道感染和肾盂肾炎),并且到第48周没有死亡、恶性肿瘤或脱髓鞘事件。没有活动性TB的报告,并且也没有严重的机会性感染。到第48周,具有异常丙氨酸转氨酶(ALT)测量(并且对潜伏性TB无伴随治疗,这可影响肝功能测试[LFT])的受试者数为29.5%(51/167),51名受试者中的39名具有升高<3X ULN。

[0662] 存在2名ALT升高到>8X ULN的受试者,但没有一名受试者满足符合肝毒性的Hy定律的标准。受试者未接受TB预防;受试者之一具有已经异常的基线ALT。所有具有LFT异常的受试者均接受保守管理,改变MTX给药,但一名受试者因升高的LFT中止研究。

[0663] 到第48周注射部位反应的注射发生率为0.8%;在随机化接受安慰剂的恢复戈利木单抗治疗的受试者中,存在血清疾病样反应的一个SAE报告。

[0664] 尽管CNT0148JIA3001研究不满足其终点,但当分析JIA ACR响应率作为到第48周

观察到的数据时(使用第0周作为基线并比较到第48周的每次访视的药物/安慰剂效应),该研究显示了在患有pJIA的儿童中使用SC戈利木单抗可实现疗效的潜力。因此,这为患有pJIA的受试者的IV戈利木单抗研究提供了支持,这些受试者对MTX具有不充分的响应。

[0665] 1.2.研究的总体理论基础

[0666] 静脉内戈利木单抗已被证明在治疗患有RA的成人中是有效的(第1.1.2.1节)。包括抗TNF α 试剂的其他生物制剂已显示可有效用于治疗患有pJIA的受试者。虽然生物输注疗法可用于治疗pJIA,但目前尚未批准对该病症静脉内施用抗TNF α 试剂。在本研究中针对儿童提出并在患有RA的成人中研究的每8周一次30分钟输注方式可适用于可能需要或要求对药物治疗进行更大医师审查的患者群体。特别是在儿科群体中,与其他生物试剂相比,药物施用次数的减少(即,减少到每8周一次的维持计划表)可提供更大的便利性和更少的疼痛(由于较少的IV施用)。另外,在先前抗TNF α 剂无效的患者中转换成不同的抗TNF α 试剂可进一步减轻疾病的症状。

[0667] 该研究的主要目的是表征IV戈利木单抗在pJIA中的PK,以及IV戈利木单抗在这些受试者中的安全性和疗效的评价。该研究还将包括患有多种JIA亚型(包括幼年PsA)的受试者,以及具有先前抗TNF α 经验的受试者(最多占研究群体的30%)。

[0668] 该研究被设计成对于对MTX治疗以及先前用非甾体抗炎剂治疗、皮质类固醇和/或抗TNF α 试剂具有不充分响应的患有pJIA的受试者,获得响应于基于BSA(80mg/m²,预期相当于体重为70kg的成人RA患者中的2mg/kg剂量)IV戈利木单抗的PK数据,目的是证明其与在对MTX治疗反应不充分的成人RA受试者中基于体重(2mg/kg)剂量的IV戈利木单抗所见的响应相似。患有pJIA的受试者的80mg/m²剂量基于成人RA群体中CNT0148ART3001中研究的2mg/kg剂量。

[0669] 2.目标和假说

[0670] 2.1.目标

[0671] 主要目标

[0672] 该研究的主要目的是评估在已接受MTX治疗 ≥ 2 个月但pJIA表现为 ≥ 5 个关节为活动性关节炎的受试者(年龄为2岁至小于18岁)接受静脉内施用戈利木单抗后的PK。

[0673] 次要目标

[0674] 本研究的次要目的是评价患有pJIA的受试者中IV戈利木单抗的PK、疗效(体征和症状的减轻、身体机能和生活质量)、安全性(AE、SAE和实验室参数的评估)和免疫原性(抗戈利木单抗的抗体)。

[0675] 2.2.假说

[0676] 在本研究中没有计划正式的假设测试。

[0677] 3.研究设计和基本原理

[0678] 3.1.研究设计概况

[0679] 这是一项评价IV戈利木单抗治疗目前已接受MTX治疗但仍患有活动性pJIA的受试者的PK、安全性和疗效的3期、开放标签、单臂、多中心研究。研究群体将包括接受MTX的pJIA的受试者,年龄为2岁至小于18岁,具有至少3个月的pJIA病史,并且 ≥ 5 个关节为活动性关节炎。在第0周大约招募120名受试者,以确保大约有100名受试者在第52周继续参与研究。招募模式预期产生大约10%的年龄为2岁至6岁、大约20%的年龄为6岁至12岁、以及大约

70%的年龄为12岁至小于18岁的受试者群体。

[0680] 所有受试者将在第0周、第4周和每8周(q8w; ± 3 天)到第28周接受80mg/m²戈利木单抗(最大单剂量240mg) IV输注,经过30分钟 $\pm$ 10分钟,并且然后在此后q8w(± 1 周)到第244周。体表面积将基于在每次访视时测量的受试者的身高和体重来计算,并且将根据需要调节基于BSA的戈利木单抗的剂量以将剂量保持在80mg/m²。受试者也将以与第6.2节所概述的研究条目时相同的基于BSA的剂量(对于BSA<1.67m²的受试者,每周10至30mg/m²的MTX;或者对于BSA $\geq$ 1.67m²的受试者,为最少15mg/周)每周接受商业MTX到第28周。

[0681] 应付出的每份努力将受试者维持在基于BSA的80mg/m²的戈利木单抗剂量,并且在任何访视时将不允许降低至低于或增加至高于80mg/m²或缩短给药间隔(例如,从8周至6周)。

[0682] 这是一项开放标签研究,其中所有受试者接受相同的基于BSA的IV戈利木单抗剂量。安全性数据将由本研究的医学监查员常规地评价。因此,将不建立外部数据监测委员会。

[0683] 图18中提供了本研究设计的图表。

[0684] 3.1.1. 第0周到第28周

[0685] 到第28周,将监测受试者,并且将每4周在调查站点评估疾病活动 and 安全性。

[0686] 如果<50%的研究群体在第28周实现对治疗的足够响应(美国风湿病学会30% [JIA ACR 30]响应),则将中止研究。

[0687] 在所有受试者完成第28周访视之后,数据库将被锁定以评估PK、安全性和疗效。当前为第52周计划另外的安全性、疗效和PK数据库锁定。最终数据库锁定将在第252周执行。

[0688] 不应在超过第8节的参数的剂量增加或减少(例如,不超过10mg/天的泼尼松或不超过0.20mg/kg/天的泼尼松,以较低者为准)和/或第0周和第28周之间的给药途径方面对背景药物(即MTX、其他DMARD、皮质类固醇和NSAID)进行改变,除非存在需要改变背景药物的安全问题(例如,肝功能测试升高)。

[0689] 如果受试者失去随访,则研究站点人员必须做出一切可能的努力来联系受试者并确定中止/退出的原因。必须记录对随访采取的措施。

[0690] 当受试者在完成研究之前退出时,退出的原因应记录在CRF和源文档中。分配给被退出受试者的研究药物可能不会被分配给另一个受试者。退出的受试者不会被替换。

[0691] 3.1.2. 第28周到第52周

[0692] 从第28周到第52周,每8周(± 1 周)继续进行输注一次;然而,受试者将在调查站点主动进行监测,并且在调查站点每8周而不是每4周(在第0周和第28周之间)评估疾病活动 and 安全性。如上所述,第28周之后,将允许受试者改变/添加MTX、其他DMARD、皮质类固醇和NSAID,如第8节所概述。

[0693] 3.1.3. 第52周到第252周(长期扩展)

[0694] 在第52周完成研究的受试者将具有进入研究的长期扩展(LTE)阶段的选择。在最后施用研究试剂之后,将鼓励选择不进入长期扩展的受试者完成另外的8周安全性随访。

[0695] 在长期扩展期间,所有受试者将继续接受戈利木单抗q8w(± 1 周)到第244周。对于已完成252周的整个试验周期并且药物被证明是有益的但不可商购获得的pJIA适应症(或患者不符合为药物支付保险的资格)的儿童,IV戈利木单抗将继续由申办方提供。在第52周

和第252周之间,将监测并评估疾病活动,并且每16周一次记录在CRF中;输注和安全性测量将在调查站点每8周进行一次。

[0696] 如上所述,在第28周之后,将允许受试者改变/添加MTX、其他DMARD、皮质类固醇和NSAID,包括如第8节所概述的这些类别的试剂的基于BSA的给药(在适当的情况下)的增加或减少。

[0697] 完成第244周访视的所有受试者预期参与第252周的安全性随访。在第244周之前的任何时间中止研究试剂的那些受试者也预期在最后施用研究试剂之后大约8周返回安全性随访。

[0698] 最终数据库锁定将在第252周。

[0699] 3.1.4. 研究结束的定义

[0700] 研究结束被定义为对长期扩展中的最后受试者的最后随访评估。

[0701] 3.2. 研究设计基本原理

[0702] 3.2.1. 盲法、对照、研究阶段/期、治疗组

[0703] 这是评价IV戈利木单抗在患有pJIA的受试者中的PK的单臂、开放标签研究,其中所有受试者到第52周接受相同的基于BSA的剂量的IV戈利木单抗。在第52周完成研究的受试者将具有进入该研究到第252周的长期扩展阶段的选择。

[0704] 3.2.2. 剂量选择

[0705] 与成人药物剂量不同,儿科药物剂量(肠胃外)通常单独计算为基于重量的(mg/kg)或基于BSA的(mg/m^2)剂量,以管理在不同年龄的儿童在其成熟器官系统中发生变化时观察到的PK变化^{10,22}。通过对其他批准的抗TNF α 试剂(例如阿达木单抗和依那西普)进行基于体重或基于BSA的剂量标准化,将成人剂量外推至儿科受试者的成功结果支持以下假设:成人和儿童对类风湿疾病中抗TNF α 试剂的临床反应相似。即,在考虑成人和儿童之间固有的PK差异之后,在成人和儿童两者中类似的药物暴露的情况下,将预期类似的药物反应。

[0706] 来自对患有RA的成人(CNT0148ART3001)到24周的3期IV研究的数据已表明,在第0周、第4周和此后q8w(± 1 周),戈利木单抗2mg/kg是大多数成人中治疗RA的最佳剂量方案。对于小孩,戈利木单抗 $80\text{mg}/\text{m}^2$ ($2\text{mg}/\text{kg}/1.73\text{m}^2$)将大约等于体重为70kg (BSA为 1.73m^2)的成人受试者的2mg/kg。因此,在当前研究(CNT0148JIA3003)中,已选择戈利木单抗 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量来评价戈利木单抗在pJIA群体中的安全性和疗效。

[0707] 3.2.3. 基本原理

[0708] pJIA群体中IV戈利木单抗的开放标签研究设计基于来自成人RA和pJIA中其他抗TNF α 剂研究的数据、来自申办方对成人RA中IV戈利木单抗研究(CNT0148ART3001)的PK和疗效数据、申办方在pJIA中用SC戈利木单抗(CNT0148JIA3001)的经验,以及来自儿科风湿病学国家试验组织(PRINTO)和儿科风湿病学协作研究组(PRCSG)的反馈。

[0709] 申办方将利用从所提议的开放标签CNT0148JIA3003研究生成的PK数据外推到来自RA中的CNT0148ART3001研究的成人PK数据,这是用作患有RA的成人患者的IV戈利木单抗(用于静脉内使用的SIMPONI ARIA/SIMPONI)批准的基础的关键研究。另外,将收集疗效(PD)数据以探索对支持性暴露响应的评估。

[0710] 4. 受试者群体

[0711] 有资格的受试者的筛查将在施用研究药物之前的6周内执行。

[0712] 在本研究中招募受试者的纳入和排除标准在以下2个小节中描述。如果对下面的纳入或排除标准存在疑问,研究者应在本研究对象招募之前咨询适当的赞助人代表。

[0713] 对于受试者选择的统计考虑因素的讨论,参见第11.2节样本量确定。

[0714] 不允许偏离纳入和排除标准,因为它们可能潜在地危害研究的科学完整性、监管可接受性或受试者安全性。因此,遵守方案中指定的标准是必不可少的。

[0715] 本研究将招募大约120名受试者。中止研究治疗或退出研究参与的招募的受试者将不被新受试者替换。

[0716] 在筛选期间,仅允许使用一次计划外访视对导致排除的异常筛选值进行重新测试,以重新评估资格。仅当预期对受试者安全性没有影响时才应考虑这一点。

[0717] 4.1. 纳入标准

[0718] 每个潜在受试者必须满足以下所有将参加研究的标准。

[0719] 1. 受试者年龄必须为2岁至小于18岁,在筛选时和在第0周时体重 $>15\text{kg}$ 。

[0720] 2. 必须按照JIA ILAR诊断标准进行诊断,并且疾病的发作必须在受试者的16岁生日之前发生。

[0721] 3. 下列亚型之一的活动性JIA:

[0722] a. 在筛选前 ≥ 3 个月,类风湿性因子阳性或阴性pJIA,或者

[0723] b. 无全身性症状 ≥ 3 个月但在筛选前有多发性关节炎 ≥ 3 个月的全身性JIA,或者

[0724] c. 在筛选之前 ≥ 3 个月的扩展的寡关节JIA,或者

[0725] d. 在筛选之前 ≥ 3 个月的多关节幼年银屑病性关节炎,或者

[0726] e. 在筛选之前 ≥ 3 个月的与附着点炎相关的关节炎。

[0727] 4. 筛选前对至少2个月病程的MTX的响应不合格或不充分。

[0728] 5. 受试者必须在筛选时并在第0周时具有 ≥ 5 个关节为活动性关节炎,如ACR标准所定义(即,具有肿胀或在不存在肿胀的情况下,与运动或压痛相关联的有限运动范围)。

[0729] 6. 除了大约30%的研究群体之外,受试者必须具有 $\geq 0.1\text{mg/dL}$ 的筛选CRP。

[0730] 7. 受试者目前须使用口服、肌内或皮下MTX(在筛选之前 ≥ 2 个月),但仍患有活动性pJIA。对于 $\text{BSA} < 1.67\text{m}^2$ 的受试者,MTX剂量必须介于每周10至 30mg/m^2 之间,并且在筛选前稳定 ≥ 4 周。对于 $\text{BSA} \geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者,MTX剂量必须为最少 15mg/周 并且在筛选前必须稳定 ≥ 4 周。在记录的不耐受剂量 $\geq 10\text{mg/m}^2$ 每周(对于 $\text{BSA} < 1.67\text{m}^2$ 的受试者)或 $\geq 15\text{mg/周}$ (对于 $\text{BSA} \geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者)的情况下;或者在记录的国家/地区或站点法规禁止在 $\text{BSA} \geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者中使用 $\geq 15\text{mg/周}$ MTX的情况下,受试者可在较低剂量的MTX上进入试验。

[0731] 8. 如果使用皮质类固醇,则必须在首次施用研究试剂之前具有 $\leq 10\text{mg/天}$ 泼尼松当量或 0.20mg/kg/天 (以较低者为准)的稳定剂量 ≥ 2 周。如果目前不使用皮质类固醇,则受试者必须在第一剂量施用前至少2周不接受皮质类固醇。在筛选前,患有全身性发作JIA但无全身性症状的受试者必须服用稳定剂量的皮质类固醇至少3天。

[0732] 9. 如果使用NSAID,则在筛选前必须在 ≥ 2 周内处于稳定剂量上。如果目前未使用NSAID,则在筛查前至少2周内不得服用。

[0733] 10. 根据以下TB筛选标准,受试者被视为有资格:

[0734] a. 筛选前没有潜伏或活动性结核病史。目前接受潜伏性TB治疗的受试者、没有活动性TB的证据,或者有潜伏性TB病史,并且在首次施用研究试剂之前的3年内完成了对潜伏

性TB的适当治疗的记录例外。研究者有责任核实先前抗结核治疗的充分性并提供适当的文件。

[0735] b. 在病史和/或体格检查时没有任何迹象或症状提示活动性TB。

[0736] c. 最近没有与活动性TB患者密切接触,或者如果存在此类接触,将转介给专门接受TB治疗的医生经历附加评价,并且如果有必要,在首次服用研究试剂之前接受适当的潜伏性TB治疗。

[0737] d. 在首次使用研究试剂前6周内,测定结果为QuantiFERON®-TBGold或者新确定的QuantiFERON®-TBGold测试结果为阳性,其中排除了活动性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗(第9.1.2节)。在首次施用研究试剂之前的6周内,如果QuantiFERON® (TB Gold测试)未在该国家/地区获得批准/注册,或者结核菌素皮肤测试是由当地卫生部门强制执行的,则另外需要结核菌素皮肤试验阴性,或新确定的阳性结核菌素皮肤测试,其中排除了活性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗。

[0738] e. 不确定的结果应如第9.1.2节所概述进行处理。如果排除活动性TB,他们的胸片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的另外风险因素,则具有持续不确定的QuantiFERON® (TB Gold测试)结果的受试者可以在不接受潜伏性TB治疗的情况下登记。必须立即向赞助人的医疗监督员报告此决定,并将其记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[0739] f. 对于有潜伏性TB病史和潜伏性TB持续治疗的受试者或已完成如上所述的充分治疗的记录,筛选时不需要QuantiFERON® (TB Gold测试)和结核菌素皮肤测试;具有如上所述完成适当治疗的记录的受试者不需要对潜伏性TB进行附加治疗。

[0740] g. 除非国家/地区或当地指南不推荐胸片作为抗TNF α 疗法开始之前的必要筛选过程,否则胸片(后视图或前视图)必须在首次施用研究试剂之前3个月内拍摄,并且由合格的放射学家读取,而没有目前活动性TB或旧的、非活动性TB的证据。在TB的结核菌素皮肤测试和/或QuantiFERON® (TB Gold测试)为阳性的所有情况下,胸片(后视图-前视图和侧视图)必须作为筛选过程的一部分来执行。

[0741] 11. 受试者必须在体检、病史、筛选时执行的生命体征的基础上保持医学稳定。如果存在异常,则它们必须与研究群体中潜在的疾病一致。

[0742] 12. 女孩必须是:

[0743] • 不具有生育潜力:初经前期;永久不育(例如,输卵管阻塞、子宫切除术、双侧输卵管切除术);或以其他方式不能怀孕,

[0744] 或者

[0745] • 具有生育潜力并且如果性行为活跃,则按照当地关于参与临床研究的受试者使用节育方法的规定,实施高效的节育方法:例如,确定使用口服、注射或植入的激素避孕方法;放置宫内避孕器(IUD)或宫内节育器(IUS);阻隔方法:含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套或含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽);男性伴侣绝育(输精管结扎的伴侣应是唯一适于该受试者的伴侣);完全禁欲(当这种情况与受试者的一般优选生活方式一致时,并且由研究者自行决定/根据当地法规时)。具有生育潜力

的女孩必须同意在研究期间以及在接受最后一剂研究药物后6个月内,不得为辅助生殖的目的捐卵(卵子、卵母细胞)。

[0746] 注意:如果生育潜力在研究开始之后发生改变(例如,异性性行为不活跃的女孩变得活跃,初经前期的女孩经历初潮),则女孩必须开始高效的节育方法,如上所述。

[0747] 13.具有生育潜力的女孩必须在筛选时血清 β -人绒毛膜促性腺激素(β -hCG)测试呈阴性,并且在每次进行戈利木单抗输注的研究随访时尿液妊娠测试呈阴性。

[0748] 14.在研究期间和接受最后一剂研究药物后6个月内,男孩必须实施节欲,或者如果与具有生育潜力的女孩的性行为活跃且未接受输精管结扎术必须同意使用阻隔避孕方法,例如,含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套,或者伴侣使用含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽),并且所有男孩也不得捐精。

[0749] 15.受试者的筛选实验室测试必须满足以下标准:

[0750] a.血红蛋白: $\geq 8.0\text{g/dL}$ (SI: $\geq 80\text{g/L}$;女孩和男孩,年龄为2岁至11岁) $\geq 8.5\text{g/dL}$ (SI: $\geq 85\text{g/L}$;女孩,年龄为12岁至18岁) $\geq 9.0\text{g/dL}$ (SI: $\geq 90\text{g/L}$;男孩,年龄为12岁至18岁)

[0751] b.白血细胞(WBC) $\geq 3.0 \times 10^3$ 个细胞/ μL (SI: $\geq 3.0 \times 10^9$ 个细胞/L)

[0752] c.中性粒细胞 $\geq 1.5 \times 10^3$ 个细胞/ μL (SI: $\geq 1.5 \times 10^9$ 个细胞/L)

[0753] d.血小板 $\geq 140 \times 10^3$ 个细胞/ μL (SI: $\geq 140 \times 10^9$ 个细胞/L)

[0754] e.血清转氨酶水平不超过中心实验室的正常上限的1.2倍:

[0755] -天冬氨酸转氨酶(AST)

[0756] $\leq 67\text{IU/L}$ (女孩,年龄为2岁至小于4岁)

[0757] $\leq 58\text{IU/L}$ (女孩,年龄为4岁至小于7岁)

[0758] $\leq 48\text{IU/L}$ (女孩,年龄为7岁至18岁)

[0759] $\leq 83\text{IU/L}$ (男孩,年龄为2岁至小于4岁)

[0760] $\leq 71\text{IU/L}$ (男孩,年龄为4岁至小于7岁)

[0761] $\leq 48\text{IU/L}$ (男孩,年龄为7岁至18岁)

[0762] -丙氨酸转氨酶(ALT)

[0763] $\leq 41\text{IU/L}$ (女孩,年龄为2岁至18岁)

[0764] $\leq 41\text{IU/L}$ (男孩,年龄为2岁至小于10岁)

[0765] $\leq 52\text{IU/L}$ (男孩,年龄为10岁至18岁)

[0766] f.血清肌酸酐不超过:

[0767] 0.5mg/dL (SI: $44\mu\text{mol/L}$;年龄为2岁至5岁)

[0768] 0.7mg/dL (SI: $62\mu\text{mol/L}$;年龄为6岁至10岁)

[0769] 1.0mg/dL (SI: $88\mu\text{mol/L}$;年龄为11岁至12岁)

[0770] 1.2mg/dL (SI: $106\mu\text{mol/L}$;年龄 ≥ 13 岁)

[0771] 16.受试者必须在第0周之前接受所有符合当前免疫抑制受试者当地免疫指南的最新免疫接种。

[0772] 17.父母或监护人应伴随受试者每次研究访视,直到受试者达到18岁为止。

[0773] 18.受试者和他/她的父母(如果适用)必须能够遵守研究访视计划表,并且了解并遵守其他方案要求。

[0774] 19.受试者必须愿意并且能够遵守该方案中规定的禁止事项和限制条款。

[0775] 20. 每个受试者(或其法定代理人)必须签署ICF,表明他或她了解研究的目的和所需程序并且愿意参与该研究。能够了解研究性质(通常为7岁及以上,并且符合当地法规)的儿童也需要同意,如第16.2.3节知情同意所述。

[0776] 4.2. 排除标准

[0777] 任何符合以下标准中的任一者的潜在受试者将被排除在参与本研究之外。

[0778] 接受的伴随或既往医学疗法:

[0779] 1. 在首次研究试剂施用前4周内,受试者已开始DMARD和/或免疫抑制疗法。

[0780] 2. 在首次研究试剂施用前4周内,受试者已用关节内皮质类固醇、肌内皮质类固醇或静脉内皮质类固醇(包括促肾上腺皮质激素)治疗。

[0781] 3. 在首次研究试剂施用前3个月内,受试者已用靶向减少IL-12或IL-23的任何治疗剂(包括但不限于优特克单抗和ABT-874)治疗。

[0782] 4. 在首次研究试剂施用前12个月内,受试者已用那他珠单抗、依法珠单抗或耗尽B细胞或T细胞的治疗剂(例如利妥昔单抗、阿仑单抗或visilizumab)治疗,或者在筛选接受任何这些试剂之后靶向淋巴细胞的持续耗尽方面具有证据。

[0783] 5. 在首次研究试剂施用前3个月内,受试者已用阿法西普治疗。

[0784] 6. 在首次研究试剂施用前8周内,受试者已用阿巴西普治疗。

[0785] 7. 在首次研究试剂施用前4周内,受试者已用来氟米特治疗(不考虑进行药物消除过程),或已在首次研究试剂施用前4周至12周接受来氟米特,并且未进行药物消除程序。

[0786] 8. 受试者已用细胞毒素剂治疗,包括环磷酰胺、氮芥、苯丁酸氮芥或其他烷基化剂。

[0787] 9. 从首次研究试剂施用前3个月直到最后一次研究试剂施用后3个月,受试者已接受或预期接受任何活病毒或活细菌疫苗接种。

[0788] 10. 在筛选的12个月内,受试者有过BCG疫苗接种,或者计划在最后一次研究药物施用后12个月内接受BCG疫苗接种。

[0789] 11. 在首次研究试剂施用后1周内,受试者接受了IL-1RA(阿那白滞素)。

[0790] 12. 先前已使用多于2种靶向降低TNF α 的治疗剂(包括但不限于英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗或赛妥珠单抗)治疗受试者。

[0791] 13. 如果受试者先前已用抗TNF α 试剂治疗,则中止抗TNF α 试剂的原因不能成为与抗TNF α 试剂类别一致的严重或严重不良事件。

[0792] 14. 在第一剂量的研究试剂的6周内,受试者已接受阿达木单抗或赛妥珠单抗,或在4周内已接受依那西普。

[0793] 15. 在首次施用研究试剂后8周内,受试者已接受英夫利昔单抗或托珠单抗。

[0794] 16. 受试者从未接受IV或SC戈利木单抗。

[0795] 17. 在第一剂量的研究试剂的2周内,受试者已接受Janus激酶(JAK)抑制剂,包括但不限于托法替尼。

[0796] 18. 在第一研究剂量施用前4个月内,受试者已接受卡那单抗。

[0797] 19. 受试者目前具有与MTX或将排除用MTX治疗的病症相关的副作用,这些病症包括但不限于肝硬化、肝纤维化、ALT和AST的持续升高(在6个月周期内5次测试中超过3次升高),MTX肺炎、严重粘膜溃疡、顽固性呃逆、呕吐/腹泻、临床上显著的骨髓抑制的证据、剧烈

头痛、严重的骨痛或创伤性骨折。

[0798] 20. 在计划的第一剂量的研究药物之前的3个月或5个半衰期(以较长者为准)内或目前招募到调查研究之前,受试者已接受调查药物(包括调查疫苗)或使用侵入式调查医疗装置。

[0799] 感染或易感染:

[0800] 21. 在筛选前,受试者有活动性肉芽肿感染史,包括组织胞浆菌病或球孢子菌病。有关潜伏性TB病史资格的信息,请参阅纳入标准(第4.1节)。

[0801] 22. 受试者乙肝病毒检测呈阳性。

[0802] 23. 受试者丙型肝炎病毒(HCV)抗体血清呈阳性。

[0803] 24. 受试者具有已知的人类免疫缺陷病毒(HIV)感染病史。

[0804] 25. 在筛选前6个月内,受试者有过非结核分枝杆菌感染或机会性感染(例如,细胞巨化病毒、肺孢子虫病或曲霉病)。

[0805] 26. 除非假体已被移除或更换,则受试者有感染关节假体的病史,或曾因关节假体的感染而接受抗生素治疗。

[0806] 27. 受试者已患有或有过严重感染(包括但不限于肝炎、肺炎或肾盂肾炎),或者在首次研究试剂施用前2个月期间已住院或接受IV抗生素用于感染。

[0807] 28. 受试者有慢性或复发性感染病的病史或持续存在,包括但不限于慢性肾脏感染、慢性胸部感染(例如,支气管扩张)、鼻窦炎、复发性尿道感染(例如,复发性肾盂肾炎)、开放性、排泄性或感染性皮肤创伤或溃疡。

[0808] 29. 受试者在首次施用研究试剂之前3个月内的胸片显示异常提示恶性肿瘤或当前活动性感染,包括TB(如果适用)。恶性肿瘤或增加恶性肿瘤的可能性:

[0809] 30. 受试者患有已知的恶性肿瘤或恶性肿瘤史。

[0810] 31. 受试者具有淋巴细胞增生性疾病的病史,包括淋巴瘤、或暗示可能的淋巴细胞增生性疾病的体征,诸如异常尺寸或位置的淋巴结病、或临床上显著的与pJIA或系统发病JIA不一致而无全身性症状的脾肿大。

[0811] 并存医学病症或既往病史:

[0812] 32. 受试者患有严重进行性或不受控的肝脏或肾功能不全的病史;或显著的心脏、血管、肺部、胃肠、内分泌、神经学、血液、精神或代谢紊乱。

[0813] 33. 受试者对戈利木单抗或其赋形剂具有已知的变态反应、超敏反应或耐受不良,或者受试者对免疫球蛋白具有已知的变态反应、超敏反应或耐受不良。

[0814] 34. 受试者具有或有过物质滥用(药物或酒精)问题。

[0815] 35. 受试者具有巨噬细胞活化综合征的病史。

[0816] 36. 受试者患有另一种炎症性疾病,可能会混淆戈利木单抗治疗有益效果的评价,包括但不限于系统性红斑狼疮或莱姆病。

[0817] 37. 受试者丧失行为能力,很大程度上或完全是卧床的,或局限于轮椅,或几乎没有或没有年龄适当的自理能力。

[0818] 38. 受试者具有脱髓鞘疾病诸如多发性硬化症的已知病史。

[0819] 39. 受试者有充血性心力衰竭的病史或伴随诊断。

[0820] 其他:

[0821] 40. 受试者具有任何条件, 在研究者认为参与不符合受试者的最佳利益 (例如, 损害健康) 或可能阻止、限制或混淆方案指定的评估。

[0822] 41. 受试者是孕期或哺乳期女孩, 或计划在参与本研究期间或在最后一剂研究药物后6个月内怀孕的女孩。

[0823] 42. 受试者是计划在招募到本研究期间或在最后一剂研究药物后6个月内生育小男孩的男孩。

[0824] 43. 受试者由于耐受性差或不易进入而无法或不愿意经历多次静脉穿刺。

[0825] 44. 受试者是研究者或研究站点的雇员, 在该研究者或研究站点的指导下直接参与拟议的研究或其他研究, 以及雇员或研究者的家庭成员。

[0826] 45. 在筛选前3个月内, 受试者患有活动性葡萄膜炎。

[0827] 46. $BSA > 3.0 m^2$ 的受试者。

[0828] 注意: 研究者应确保在筛选时已满足所有研究招募标准。如果受试者的状态在筛选之后但在给予第一剂量的研究药物之前发生变化 (包括实验室结果或接收到另外的医疗记录), 使得他或她不再满足所有合格标准, 则受试者应被排除在参与本研究之外。第17.4节, 源文档, 描述了支持满足招募标准期望的文档。

[0829] 4.3. 禁止和限制

[0830] 潜在受试者必须愿意并且能够在研究过程期间遵守以下禁止和限制条件才有资格参加:

[0831] 1. 受试者不得在筛选前3个月、在研究期间或在最后施用研究试剂后3个月内接受活病毒或活细菌接种疫苗。

[0832] 2. 受试者不得在筛选前12个月、在研究期间或在最后施用研究试剂后12个月内接受BCG疫苗接种。

[0833] 3. 如果性行为活跃且具有生育潜力, 女孩必须在研究期间以及在最后一次施用研究试剂 (包括研究的LTE阶段) 后6个月内保持高效的节育方法。女孩不得在研究期间以及在接受最后一剂研究试剂 (包括研究的LTE阶段) 后6个月内为辅助生殖的目的捐卵 (卵子、卵母细胞)。

[0834] 4. 如果与具有生育潜力的女孩性行为活跃且未接受输精管结扎术, 则男孩必须在研究期间以及在接受最后一次施用的研究试剂 (包括研究的LTE阶段) 后6个月内使用双重屏障的节育方法。男孩不得捐精, 并且不得在研究期间和最后施用研究试剂 (包括研究的LTE阶段) 后6个月内计划妊娠或生育小孩。

[0835] 5. 在研究期间, 不允许肌肉给药皮质类固醇来治疗pJIA。在整个研究过程中, 可根据需要通过支气管或鼻吸入给予皮质类固醇, 用于治疗除pJIA以外的疾病。有关附加详细信息, 参见第8节。

[0836] 6. 在研究期间, 受试者不得接受用于pJIA的调查药物、其他免疫抑制剂 (诸如但不限于环磷酰胺) 或其他生物制剂。

[0837] 5. 治疗分配和盲法

[0838] 这是开放标签研究。所有受试者将在第0周、第4周和q8w (± 3 天) 到第28周和q8w (± 1 周) 直至第244周接受 $80 mg/m^2$ 戈利木单抗。

[0839] 因为这是开放标签研究, 所以盲化程序不适用。

[0840] 6. 剂量和施用

[0841] 6.1. 戈利木单抗

[0842] 该研究将具有1个活动性治疗组,并且所有受试者将在第0周、第4周和q8w(±3天)到第28周和此后q8w(±1周)到第244周接受80mg/m²戈利木单抗(最大单剂量240mg) IV输注。戈利木单抗输注将由药剂师在无菌条件下使用小瓶中的戈利木单抗50mg/4mL液体和0.9%盐水的100mL输注袋制备。受试者将在经过30分钟±10分钟内接受80mg/m²戈利木单抗IV输注。研究者认为合适时,可根据输注反应的证据减慢输注,并且输注速率的所有变化应记录在CRF中。在每次访视时将计算体表面积,并且将根据需要调节戈利木单抗的剂量以将剂量保持在80mg/m²。将使用Mosteller方程计算体表面积:BSA(m²) = ([高度(cm) × 重量(kg)]/3600)^{1/2}。有关附加详细信息,参见站点IP手册。

[0843] 6.2. 甲氨蝶呤

[0844] 受试者将在到第28周以与研究入选时相同的基于BSA的剂量(对于BSA<1.67m²的受试者,每周10至30mg/m²;或者对于BSA≥1.67m²的受试者,为至少15mg/周)接受商业MTX。绝对剂量应自基线到第28周保持稳定。

[0845] 应尽每一项努力确保受试者在到第28周访视期间保持相同剂量和施用MTX的途径,除非发生由MTX引起的耐受不良或AE(第8节)。在MTX毒性事件中调整MTX剂量的指南在试验中心文件中提供。

[0846] 受试者还将接受每周≥5mg的商业叶酸总剂量或在每周MTX剂量后的第二天给予亚叶酸(MTX剂量的一半)。在小于12岁的儿童中,叶酸或亚叶酸的施用将由医师自行决定。

[0847] 在第28周之后,允许MTX施用的改变(例如,剂量的增加或减少、施用途径的改变或中止)。

[0848] 7. 治疗依从性

[0849] 研究站点人员将确保对治疗分配的依从性。站点人员将在每次访视时施用研究输注并记录给定的输注量。

[0850] 所有受试者的CRF将由申办方指定的站点监查员监测。在这些监测访视期间,将评价所有程序是否符合方案。在计划的窗口之外施用的治疗以及未访视将记录在CRF上。将审查受试者图表并将其与CRF上的数据条目进行比较以确保准确性。

[0851] 8. 研究前和伴随疗法

[0852] 在筛选时必须记录在第一剂量的研究试剂之前施用的预研究JIA药物。所有伴随疗法必须在整个研究期间记录,从施用第一剂量的研究药物开始。

[0853] 记录不同于研究药物的所有疗法(处方或非处方药物,包括疫苗、维生素、草药补充剂;非药物治疗,诸如电刺激和穿刺)必须记录在CRF中。记录的信息将包括药物类型的描述、治疗周期、给药方案、施用途径及其指示。不应出于将受试者进入研究的明确目的修改有效的预先存在的疗法。

[0854] 如果使用皮质类固醇或NSAIDs,则在按照纳入标准8和9(第4.1节)进行研究之前,受试者必须接受稳定剂量的这些药物。在按照排除标准12(第4.2节)进行研究之前,受试者可能已经预先用不超过2种靶向减少TNFα的治疗剂进行了治疗。受试者不得按照排除标准1至20(第4.2节)所述的禁止治疗剂开始或治疗。

[0855] 受试者必须在筛选前接受MTX≥2个月。对于BSA<1.67m²的受试者,MTX剂量必须介

于每周10至30mg/m²之间,并且在筛选前稳定 ≥ 4 周。对于BSA $\geq 1.67\text{m}^2$ 的受试者,MTX剂量必须为最少15mg/周的MTX并且在筛选前必须稳定 ≥ 4 周。关于该规则的例外情况,参见纳入标准7。在研究入选时接受皮质类固醇的受试者(除患有sJIA之外)必须在筛选前接受 ≥ 2 周的稳定剂量,并且该剂量必须为 $\leq 10\text{mg/天}$ 的泼尼松或泼尼松当量或 0.20mg/kg/天 (以较低者为准)。具有全身性发作JIA但不具有 ≥ 3 个月的全身性症状的受试者在筛选前必须接受稳定的皮质类固醇3天,并且不表现出全身性症状。如果接受NSAID疗法,则在筛选前剂量必须稳定 ≥ 2 周。

[0856] 不应在剂量增加或减少(例如,不超过10mg/天的泼尼松或不超过0.20mg/kg/天的泼尼松,以较低者为准)和/或第0周和第28周之间的给药途径方面对背景药物(即MTX、其他DMARD、皮质类固醇和NSAID)进行改变,除非存在需要改变背景药物的安全问题(例如,肝功能测试升高)。在第28周之后,将允许受试者改变/添加MTX、其他DMARD、皮质类固醇和NSAID,包括剂量的增加或减少、施用途径的改变或这类试剂的中止。

[0857] 在研究期间,不允许肌肉内给药皮质类固醇来治疗pJIA。在整个研究过程中,可根据需要通过支气管或鼻吸入给予皮质类固醇,用于治疗除pJIA以外的疾病。

[0858] 应进行每一次尝试,以避免使用IV皮质类固醇。对于需要短期(2周或更短)口服或IV皮质类固醇的受试者,出于诸如手术前预防性疗法(应激剂量皮质类固醇)或有限感染、哮喘恶化的疗法的原因,或者对于除pJIA之外的任何病症,皮质类固醇治疗应限于这样的情况:根据治疗医师的意见不存在足够的替代方案,并且应在CRF中记录。

[0859] 如果临床需要,受试者可在研究直到第52周期间接受皮质类固醇的关节内注射。然而,关节内注射的次数在任何24周的周期内应限于2次。即,如果受试者已接受2次关节内注射并且已过去24周以上,则受试者可在另一个24周的时间周期内接受最多2次另外的关节内注射。

[0860] 在第52周之后,注射的关节数不再限于每24周2次注射。必须提前(或在此后尽快)通知申办方任何实施禁用疗法的情况(第4.3节)。

[0861] 9. 研究评价

[0862] 9.1. 研究程序

[0863] 9.1.1. 概述

[0864] 时间和事件计划表汇总了适用于该研究的疗效、PK、免疫原性和安全性测量的频率和时间(表6、表7和表8)。所有计划的研究访视应在第28周的预期访视的 ± 3 天内和第28周到第244周的 ± 1 周内发生。如果无法观察到推荐的可接受窗口,则在计划访视之前必须联系赞助人。

[0865] 儿童健康评估问卷(CHAQ)应在该访视的任何测试、程序或其他咨询之前进行,以防止影响受试者的感知。有关附加详细信息,请参阅PRO用户手册。

[0866] 在每次不定期访视时,研究者将执行以下评价:

[0867] • 系统审查

[0868] • 生命体征

[0869] • TB问卷

[0870] • 不良事件

[0871] • 伴随用药审查

[0872] • 安全性实验室评价

[0873] 可根据研究者需要确定或当地法规要求执行另外的血清或尿液妊娠测试,以确定在受试者参与本研究期间的任何时间没有怀孕。

[0874] 从每个受试者收集的用于研究的总血液体积为大约149.4mL(表1)。出于安全原因或样本的技术问题,可能会采取重复或非计划的样本。

[0875] 表1:到第252周从每个受试者收集的大致血液体积

[0876]	样本类型	每个样本的大致体积 (mL)	每个受试者的样本数	血液的大致总体积 (mL) a,b
	安全性 (包括筛选和治疗后评估)			
	-血液学	1.2	17	20.4
	-血清化学	1.1	17	18.7
	血清学 (乙型肝炎和丙型肝炎)	2.0	1	2.0
	血清 β -hCG 妊娠试验	1.1	1	1.1
	- QuantiFERON® (TB Gold 测试)	3.0	6	18.0
	-类风湿因子	1.1	1	1.1
	-抗 dsDNA 抗体	1.1	11	12.1
[0877]	-ANA 抗体	1.1	11	12.1
	疗效 (CRP)	1.1	24	26.4
	PK 和免疫原性 (抗戈利木单抗抗体)	2.5	15	37.5
	大约总计			149.4
	a. 计算为样本数乘以每个样本的血液量。			
	b. 出于安全原因或样本的技术问题,可能会采取重复或非计划的样本。			
	注意: 留置的静脉内插管可用于血液样本收集。			
	缩写: ANA=抗核抗体; β -hCG= β -人绒毛膜促性腺激素; CRP=C 反应蛋白质; dsDNA=双链脱氧核糖核酸; PK=药代动力学; TB=结核病。			

[0878] 9.1.2. 筛选阶段

[0879] 在获得书面知情同意/同意之后,在第0周之前的6周内,将进行所有确定受试者资格的筛选评价。符合所有纳入标准且没有排除标准的受试者将参加本研究。应尽一切努力遵守每个受试者的研究时间和事件时间表(表)。

[0880] 具有生育潜力的女孩必须在筛选时血清 β -hCG妊娠测试呈阴性,并在每次施用研究试剂前尿液妊娠测试呈阴性。性行为活跃的受试者必须同意使用高效的避孕方法,并在本研究期间和接受最后一剂研究试剂后6个月内继续使用避孕措施。必须记录每个受试者使用的避孕方法。

[0881] 受试者必须在筛选时经历TB测试,并且其病史评估必须包括有关TB病史或已知个人暴露于活动性TB人员的具体问题。应询问受试者过去的TB测试,包括胸片结果和对结核菌素皮肤测试或其他TB测试的响应(第4.1节)。

[0882] 具有阴性 QuantiFERON® (TB Gold测试) 结果的受试者 (以及在未批准/注册 QuantiFERON® (TB Gold测试) 或结核菌素皮肤测试由当地卫生部门强制执行的国家/地区中的结核菌素皮肤测试结果呈阴性) 有资格继续进行筛选程序。具有新鉴定的阳性 QuantiFERON®-TB Gold测试 (和/或结核菌素皮肤测试) 结果的受试者必须经历评价,

以排除活动性TB,并开始对潜伏性TB的适当治疗。根据当地国家对免疫功能低下患者的指南,对潜伏性TB进行适当治疗。如果不存在针对免疫功能低下患者的当地国家/地区指南,则必须遵循美国指南或将受试者排除在研究之外。

[0883] 首次Quantiferon® (TB Gold测试) 结果不确定的受试者必须重复测试。如果排除活动性TB,他们的胸部X光片显示没有提示TB (活动性或旧的,非活动性TB) 的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的另外风险因素,则在第二次Quantiferon® (TB Gold测试) 结果也不确定的情况下,可以在未接受潜伏性TB治疗的情况下登记受试者。必须立即向赞助人的医疗监督员报告此决定,并将其记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[0884] 在筛选期间,仅允许使用一次计划外访视对导致排除的异常筛选值进行重新测试,以重新评估资格。仅当预期对受试者安全性没有影响时才应考虑这一点。

[0885] 9.1.3. 治疗阶段:第0周到第28周

[0886] 从第0周开始,有资格的受试者将在第0周、第4周和q8w (± 3 天) 到第28周接受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 戈利木单抗IV输注经过30分钟 ± 10 分钟(第6.1节)。受试者还将至少到第28周以与研究入选时相同的基于BSA的剂量每周接收商业MTX,并且接收每周 $\geq 5\text{mg}$ 的商业叶酸或在MTX剂量后的第二天给予亚叶酸(MTX剂量的一半)(第6.2节)。在小于12岁的儿童中,叶酸或亚叶酸的施用将由医师自行决定。

[0887] 受试者将具有根据时间和事件计划表(表)进行的安全性、疗效、PK和免疫原性评价。将在第0周和第8周之间的除第0周、第4周和第8周访视之外的任何时间从所有受试者收集群体PK的血清戈利木单抗浓度的另外一个样本;该样本必须在研究试剂施用之前或之后至少24小时收集,并且不得在定期计划访视(例如,第8周)时收集。

[0888] 9.1.4. 治疗阶段:在第28周到第52周之后

[0889] 在第28周之后,受试者将q8w (± 1 周) 到第52周继续接受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 戈利木单抗IV输注经过30分钟 ± 10 分钟(第6.1节)。受试者还以与研究入选时相同的基于BSA的剂量每周接收商业MTX,并且接收每周 $\geq 5\text{mg}$ 的商业叶酸或如果施用则在MTX剂量后的第二天给予亚叶酸(MTX剂量的一半;第6.2节);然而,在第28周之后允许MTX、其他DMARD、皮质类固醇和/或NSAID的增加、减少或中止。这些药物的所有改变和改变的原因需要记录在eCRF中。

[0890] 受试者将具有根据时间和事件计划表(表)进行的安全性、疗效、PK和免疫原性评价。

[0891] 治疗结束/早期退出

[0892] 如果受试者在第52周之前中止研究试剂,则受试者应在最后施用研究试剂之后大约8周返回以进行最终安全性随访(第10.2节)。如果受试者在第52周之前退出研究参与,则应尽每一项努力在受试者退出同意之前获得治疗结束评估。

[0893] 9.1.5. 长期扩展阶段:在第52周到第252周之后

[0894] 在第52周访视之后进入长期扩展的受试者将q8w (± 1 周) 到第244周继续接受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 戈利木单抗IV输注经过30分钟 ± 10 分钟。

[0895] 受试者将具有根据时间和事件计划表(表7和表)进行的安全性、疗效、PK和免疫原性评价。在第244周之前中止研究试剂施用而未撤销同意的受试者应在其上一次研究试剂输注之后大约8周返回进行最终安全性随访(第10.2节)。

[0896] 应当继续评价受试者TB的体征和症状(第9.4节)。

[0897] 9.2.疗效

[0898] 9.2.1.评价

[0899] 时间和事件计划表汇总了适用于该研究的疗效测量的频率和时间(表、表7和表)。

[0900] 9.2.1.1.关节评价

[0901] 将根据标准PRINTO/PRCSG关节评价来评价75个关节中的每个关节的压痛,并且将评价68个关节的肿胀和疼痛以及对运动的限制。每个研究中心将指定在执行关节评估方面具有至少1年经验的一致性关节评估员,以执行所有关节评估。

[0902] 在开始受试者招募之前,将从每个站点向一个一致性关节评估员提供训练;训练是强制性的,除非站点的关节评估员已进行由PRINTO或PRCSG提供的认证训练。如果在先前的临床研究中,申办方对一致性关节评估员进行了训练,则他或她可放弃该训练。申办方或PRINTO/PRCSG训练的文档将保存在试验中心档案中。如果可能的话,在研究期间不应改变用于该研究的一致性关节评估员。然而,参加由申办方提供的一致性关节评估员训练的每个站点的评估员可以在他们缺席期间在该站点另外训练1名评估员。

[0903] 预期被训练的任何另外的一致性关节评估员也将具有作为关节评估员的一年或多年的经验或得到申办方批准。如果来自该站点的指定的一致性关节评估员对该站点处的任何另外的评估员进行训练,则记录训练的信函应存档在该站点的试验中心档案中。另外,如果在研究期间在站点处多于1个的一致性关节评估员执行关节评估,则在每次访视的站点处执行关节评价的所有一致性关节评估员的姓名必须在试验中心档案中列出并记录在源文档中。

[0904] 优选的是,对受试者执行基线关节评估的一致性关节评估员还对该受试者进行所有后续访视的关节评估到第244周的最终疗效评估。

[0905] 无法评价的关节

[0906] 虽然在临床实践中将过去或研究参与期间已通过外科手术改变(即假体放置)或通过医学治疗(即关节内注射)的任何关节识别为“无法评价的”可能是合理的,但出于该研究的目的,“无法评价的”的名称略有不同。如果在身体上不能评估关节(即,由于石膏导致关节不可接近,由于截肢导致关节不存在,关节变形导致无法评估),则一致性关节评估员才应在ePRO装置中将该关节指定为“无法评价的”。

[0907] 9.2.1.2.美国风湿病学会响应

[0908] JIA ACR 30响应标准⁵被定义为在以下6个组成中的至少3个组成中自基线改善30%(即,评分降低),在以下组成中的不超过1个组成中恶化30%或更多:

[0909] • 医师对疾病活动的全局评估

[0910] • 父母/受试者对总体健康状况的评估

[0911] • 活动性关节数(定义为肿胀或没有肿胀,与运动疼痛或压痛相关联的运动范围有限)

[0912] • 运动范围有限的关节数

[0913] • 按CHAQ划分的身体机能

[0914] • CRP

[0915] JIA ACR 50响应、JIA ACR 70响应和JIA ACR 90响应被定义为在上述6个组成中

的至少3个组成中分别自基线改善50%、改善70%和改善90%，在以上组成中的不超过1个组成中恶化30%或更多。

[0916] 非活动性疾病

[0917] 非活动性疾病由以下所有疾病的存在指示：

[0918] • 无关节具有活动性关节炎

[0919] • 无因JIA引起的发热、皮疹、浆膜炎、脾肿大、肝肿大或全身淋巴结病

[0920] • 无活动性葡萄膜炎

[0921] • 正常CRP (对于无基础炎性疾病受试者 $\leq \pm 0.287\text{mg/dL}$)

[0922] • 指示无活动性疾病(<5mm)的医师对疾病活动的全局评估

[0923] • 晨僵持续时间<15分钟

[0924] 在接受JIA药物治疗时的临床缓解

[0925] 在接受JIA药物治疗时的临床缓解被定义为在接受药物治疗时每次访视 ≥ 6 个月的周期内无活动性疾病。

[0926] 9.2.1.3. 医师对疾病活动的全局评估

[0927] 医师对疾病活动的全局评估是100mm VAS。医师将完成评估患者的当前关节炎活动的VAS。量表的锚是“无关节炎活动”至“极度活动性关节炎”。评分越低表明疾病活动越少。在文献中已记载了用于将该量度包括在用于评估儿童的变量核心集中的过程⁵。

[0928] 9.2.1.4. 儿童健康评估问卷

[0929] CHAQ将评估受试者的功能状态²¹。父母/受试者将完成该问卷以评估受试者在8个功能领域(穿衣洗漱、起床、吃饭、走路、卫生、伸手、抓握和日常生活活动)中完成任务的难度。每个功能领域中的响应被评分为0(没有任何难度)、1(有一定难度)、2(难度很大)、3(不能做)或4(不适用)。较低的评分指示特定功能领域中改善的功能和任务性能。

[0930] 另外,CHAQ包括2个VAS问题—一个用于评估受试者的疼痛水平,并且一个用于评估受试者的总体健康状况。已评价CHAQ的特性并评估其有效性²¹。已证实CHAQ响应于疾病变化²¹。已确定0.188的降低是有意义的临床改善¹。

[0931] 父母/受试者对疼痛的评估

[0932] 使用范围从“无疼痛”(0mm)至“非常严重的疼痛”(100mm)的VAS量表,将疼痛评估为受试者在过去一周内经历的平均疼痛。该评估应由父母(护理人员)/受试者在压痛和肿胀关节检查之前完成。

[0933] 父母/受试者对总体健康状况的评估

[0934] 父母/受试者对总体健康状况的评估是0mm至100mm VAS。父母/受试者将完成VAS,要求他们考虑关节炎影响他们小孩/他们自身的所有方式,然后指示受试者如何做。量表的锚为“非常好”(0mm)至“非常差”(100mm)。评分越低表明健康状况越好。在文献中已记载了用于将该量度包括在用于评估儿童的变量核心集中的过程⁵。

[0935] 在研究条目中15至小于18岁的受试者可与父母/护理人员联合完成CHAQ。优选地,在研究开始时完成评估的同一个体(例如,父母、护理人员或受试者)应在整个研究中完成评估。

[0936] 9.2.1.5. C反应蛋白

[0937] C反应蛋白已被证明可用作患有pJIA的患者的炎症标志物,并且是JIA ACR 30核

心评估的一部分。c反应蛋白将由中心实验室使用验证的高灵敏度CRP测定法进行测定。

[0938] 9.2.1.6. 幼年关节炎疾病活动评分 (JADAS)

[0939] 最近,开发了pJIA的复合疾病活动评分,即幼年关节炎疾病活动评分 (JADAS);在验证分析中,发现其具有良好的计量特性,包括预测疾病结果的能力。通过评估以下变量来计算JADAS (为使用CRP而修正): (1) 在100mm水平VAS上测量的医师对总体疾病活动的全局评级 (0为无活动;100为两个VAS的最大活动); (2) 在21号圆圈和100毫米水平线视觉模拟量表上评估的父母/小孩对健康状况和疼痛的评级⁴, (3) 在71个、27个或10个关节 (分别为JADAS 71、JADAS 27和JADAS 10) 中评估的活动性关节数;以及 (4) 根据下式将CRP截短至0级: $(\text{CRP}[\text{mg/L}] - 10/10)$, 类似于JADAS-ESR中使用的截短ESR。在计算之前,CRP值 $<10\text{mg/L}$ 被转换为10,并且CRP值 $>110\text{mg/L}$ 被转换为110¹³。

[0940] JADAS被计算为其4种正常的评分的总和,其对于JADAS 71、JADAS 27和JADAS 10分别产生0至101、0至57和0至40的全局评分。

[0941] JADAS 10、27和71最小疾病活动的状态^{2,11}被定义为在患有多发性关节炎的患者中存在以下全部疾病:医师对疾病活动的全局评估 ≤ 3.5 ,父母对健康状况的全局评级 ≤ 2.5 ,以及肿胀关节计数 ≤ 1 。

[0942] JADAS非活动性疾病的标准被定义为总JADAS评分 ≤ 1 。

[0943] 9.2.2. 终点

[0944] 主要终点

[0945] 本研究的主要终点是第28周的PK暴露 (第28周的谷浓度) 和8周的一个给药间隔内的贝叶斯AUCss (来自群体PK建模和模拟)。

[0946] 重要次要终点

[0947] 重要次要终点包括:

[0948] 第52周的PK暴露 (第52周的谷浓度) 和第52周的贝叶斯AUCss (来自群体PK建模和模拟)

[0949] 其他终点

[0950] 其他终点包括:

[0951] • 随时间推移JIA ACR 30、50、70和90响应者的受试者比例

[0952] • 随时间推移CHAQ相对于基线的变化

[0953] • 随时间推移CRP浓度的变化

[0954] • 随时间推移具有非活动性疾病的受试者比例

[0955] • 随时间推移接受pJIA药物治疗临床缓解的受试者比例

[0956] • 每次访视时pJIA评分组相对于基线的改善

[0957] • 随时间推移到第52周,按疾病亚型和/或年龄划分的JIA ACR30、50、70和90响应者的受试者比例

[0958] • 随时间推移JADAS 10、27和71评分相对于基线的变化

[0959] • 随时间推移实现JADAS 10、27和71最小疾病活动的受试者比例

[0960] 9.3. 药代动力学和免疫原性

[0961] 9.3.1. 评价

[0962] 血清样本将用于评价戈利木单抗 (抗戈利木单抗抗体) 的PK以及免疫原性。将收集

静脉血样,并将每个血清样本分成3个等分试样(每1个用于药代动力学、抗研究药物抗体和备份)。将保持受试者的秘密性。应当从与IV管线不同的臂抽取样本,或者如果使用也用于递送药物的IV管线,则应当冲洗该管线并且清除在抽取每个PK样本之前可能剩余的任何残余药物。当使用IV管线抽取PK样本时,应在获取样本之前抽取并丢弃前1mL血液。应按照护理标准进行静脉内管线维护。在将评价血清浓度和抗戈利木单抗抗体的访视时,可使用足够体积的1次抽血。

[0963] 9.3.2. 分析程序

[0964] 药代动力学

[0965] 由申办方或在申办方的监督下使用验证过的、特异性的和灵敏的方法来分析血清样本以确定戈利木单抗的浓度。

[0966] 免疫原性

[0967] 将由申办方或在申办方的监督下使用验证的测定法进行抗戈利木单抗抗体的检测和表征。收集用于检测抗戈利木单抗抗体的所有样本也将针对戈利木单抗血清浓度进行评价,以使得能够解释抗体数据。

[0968] 9.3.3. 药代动力学参数

[0969] 血清戈利木单抗浓度将在第0周、第4周、第8周、第12周、第20周、第28周、第52周、第100周、第148周、第196周和第244周进行评价并随时间推移进行汇总。

[0970] 输注前(输注前立即)和输注后(输注后1小时)样本将在第0周、第4周和第12周抽取,并且另外的随机群体PK样本将在第0周和第8周之间的任何时间抽取,而不是在第0周、第4周和第8周访视时抽取,并在研究试剂施用之前或之后至少24小时收集。对于其余访视中的每一次访视,将仅收集1个血清戈利木单抗样本,如果在该次访视时输注研究试剂,则应在输注前收集。应从与IV输注管线不同的臂抽取输注后样本,或者如果使用与用于药物施用相同的进入管线,则必须冲洗IV输注管线并清除可能剩余的任何残留药物,并且应在获取样本之前抽取和丢弃1mL血液。

[0971] 将利用到第28周的数据进行群体PK分析,以表征戈利木单抗的PK以及鉴定患有pJIA的儿科群体中PK的重要协变量。另外,群体PK模型将用于评估儿科和成人中PK的相似性。将使用NONMEM方法来估计清除率和分布体积。另外,将执行暴露响应分析以探究和表征暴露和疗效之间的关系。

[0972] 9.3.4. 免疫原性评估(抗戈利木单抗抗体)

[0973] 抗戈利木单抗的抗体将根据时间和事件计划表(即,第0周、第4周、第8周、第12周、第28周、第52周、第100周、第148周、第196中和第244周)在从所有受试者收集的血清样本中进行评价。另外,还应在最终访视时从中止治疗或退出研究的受试者中收集血清样本。这些样本将由申办方或申办方的指定人员进行测试。

[0974] 将筛选血清样本中结合戈利木单抗的抗体,并且将报告确认的阳性样本的滴度。可进行其他分析以验证抗戈利木单抗抗体的稳定性和/或进一步表征戈利木单抗的免疫原性。

[0975] 将确定研究期间抗戈利木单抗抗体的发生率。

[0976] 9.4. 安全性评价

[0977] 研究期间发生的任何临床相关变化必须记录在CRF的不良事件部分。

[0978] 在研究结束/提前退出时任何临床上显著的异常持续将由研究者跟进,直到解决或达到临床稳定终点。

[0979] 该研究将包括根据时间和事件计划表中提供的时间点对安全性和耐受性进行的以下评价。

[0980] 不良事件

[0981] 在研究期间,将由受试者(或在适当时,由护理人员、替代人或受试者的法律上可接受的代表)报告不良事件。研究者将按照第12节不良事件报告的指定跟踪不良事件。

[0982] 临床实验室测试

[0983] 将收集用于血清化学和血液学的血样。研究者必须审查实验室报告,记录该审查,并将研究期间发生的任何临床相关变化记录在CRF的不良事件部分。实验室报告必须与源文档一起提交。

[0984] 将由中心实验室进行以下测试:

[0985] • 血液学检查

-血红蛋白

-WBC (嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞[%，绝对值])

[0986] -血细胞比容

-血小板计数

-RBC

-平均红细胞体积

-平均红细胞血红蛋白

-平均红细胞血红蛋白浓度

-RBC 形态

-WBC 形态 (如果存在)

[0987] • 血清化学检查

-钠

-总胆红素

-钾

-胆红素 (直接和间接)

-尿素氮

-钙

-肌酸酐

-磷

[0988] -葡萄糖

-白蛋白

-AST

-总蛋白

-ALT

-碱性磷酸酶

-尿酸

-碳酸氢盐

-氯化物

[0989] • 将在筛选时对具有生育潜力的女孩进行血清妊娠试验。

[0990] • 将根据时间和事件计划表对具有生育潜力的女孩执行尿液妊娠测试。

[0991] • 可根据研究者需要确定或当地法规要求执行附加的血清或尿液妊娠测试,以确定在整个研究中不存在妊娠。

[0992] • 筛选时进行乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎表面抗体 (抗HBs) 和乙型肝炎核心抗体 (抗HBc 总量) 的血清学检查。

[0993] • 筛选时HCV抗体的血清学。

[0994] 生命体征

[0995] 脉搏/心率、呼吸速率、温度和血压测量将根据时间和事件计划表 (表、表7和表) 进行。

[0996] 应在输注前采集生命体征；在15分钟和30分钟时（输注期间的15分钟间隔）；以及在60分钟和90分钟时（在输注后1小时的观察期期间）。

[0997] 体检

[0998] 体检，包括每次体检的皮肤检查和至少每6个月性成熟的Tanner分期将根据时间和事件计划表进行。对系统的审查将在所有访视中进行，以评价新症状，并且如果需要，可由研究者自行执行全面的体检。在研究结束时任何临床上显著的异常持续由研究者跟进，直到解决或达到临床稳定终点。

[0999] 高度和体重

[1000] 高度将在筛选时测量，并且在时间和事件计划表中指定所有时间点。重量将在时间和事件计划表中指定的时间点处测量，在每次重量测量时使用校准的量表。将指导受试者脱下鞋以及户外服装和用具。

[1001] 葡萄膜炎评价

[1002] 在筛选时以及此后至少每6个月由研究者基于体检和面谈来评估所有受试者的新发病葡萄膜炎。这包括对葡萄膜炎的体征和症状的评估，该葡萄膜炎包括但不限于眼睛发红、光敏感性、视力变化和飞蚊症。基于变化的临床标准，检查可能更频繁。

[1003] 另外，所有受试者均被要求在研究期间以指定的间隔（基于JIA亚型、ANA测试结果、JIA开始时的年龄和JIA持续时间）由眼科医生/验光师执行裂隙灯评价。

[1004] 如果受试者在研究期间患葡萄膜炎，则受试者持续参与研究由研究者和申办方决定。

[1005] 输注反应评价

[1006] 在开始输注之前，将应获得适当的人员、药物（例如肾上腺素、吸入的 β -激动剂、抗组胺剂和皮质类固醇）和其他用于治疗过敏反应的要求。基于研究者的决定，受试者可在开始输注之前预先用预防药物（例如苯海拉明）给药，但这不是强制性的。然而，不允许用于预防的皮质类固醇。预先给药应当记录于eCRF中。

[1007] 研究者或有资格的指定人员将根据时间和事件计划表评价受试者的输注反应。

[1008] 输注反应是在输注期间或在输注完成1小时内发生的任何不利或非预期的体征。必须仔细观察所有受试者的输注反应的症状。在完成IV施用研究试剂之后，将观察受试者的输注反应症状至少60分钟。如果观察到输注反应，则应由研究者决定治疗受试者。

[1009] 研究者将在AE页面中记录输注反应。如果没有观察到输注反应，则研究者将在受试者的医疗记录（源数据）中注意到这一点。

[1010] 变应性反应

[1011] 在整个研究中，在输注完成之后至少60分钟内，必须仔细观察所有受试者的变应性反应症状（例如，荨麻疹、瘙痒、喉炎）。如果观察到轻度或中度过敏反应，则可施用批准的儿科剂量的对乙酰氨基酚或NSAID和苯海拉明。

[1012] 在输注后具有严重反应导致支气管痉挛伴随喘息和/或呼吸困难并且需要通气支持或症状性低血压伴随收缩压降低大于40mm汞柱（Hg）的受试者将不允许接受任何另外的研究试剂输注。就此类反应而言，应施用适当的医学治疗。

[1013] 活动性结核的早期检测

[1014] 为了有助于在研究参与期间早期检测到TB、重新活动或新TB感染，必须在计划访

视(参考时间和事件计划表)或通过大约每8周至12周的电话接触来评估受试者的活动性TB的体征和症状。建议在评价期间使用以下系列的问题。

[1015] • “您的小孩是否具有>14天的新咳嗽持续时间或慢性咳嗽的变化?”

[1016] • “您的小孩是否具有任何以下症状”:

[1017] -持续发热?

[1018] -无意的体重减轻?

[1019] -盗汗?

[1020] • “您的小孩是否与具有活动性TB的个人密切接触?”(如果存在不确定关于是否应将接触视为“密切”,则应咨询TB专科医师。)

[1021] 如果评价怀疑受试者可能有TB复发或新TB感染,则应中断研究试剂施用,并且应进行立即且彻底的调查,包括在可能的情况下,与TB专科医生进行会诊。

[1022] 研究者应意识到免疫失能的受试者中的TB复发可能作为散布性疾病或具有肺外特征。具有活动性TB证据的受试者必须立即中止研究试剂,并且应参考进行适当的治疗。

[1023] 对于有潜伏性TB病史和潜伏性TB持续治疗或已完成针对TB充分治疗的记录的受试者,不需要进行年度Quantiferon®-TB Gold(和结核菌素皮肤)测试。

[1024] 在进行研究期间与患有活动性TB的个体密切接触的受试者必须在未批准/注册Quantiferon®(TB Gold测试)的国家/地区中具有重复胸片、重复的Quantiferon®(TB Gold测试)、重复的结核菌素皮肤测试,并且如果可能的话,参考在TB专科医师以确定受试者发展为活动性TB的风险以及是否有必要对潜伏性TB进行治疗。对于有潜伏性TB病史和潜伏性TB持续治疗或已完成针对TB的充分治疗的记录的受试者,不需要重复Quantiferon®(TB Gold测试)(和结核菌素皮肤测试)。如果Quantiferon®(TB Gold测试)结果不确定,则应如第9.1.2节所概述重复测试。应鼓励受试者返回根据方案的所有后续计划的研究访视。

[1025] 9.5. 样本收集和处理

[1026] 样本收集的实际日期和时间必须记录在CRF或实验室申请表中。

[1027] 对于所有样本收集的时间安排和频率,参考时间和事件计划表。

[1028] 关于样本的收集、处理、存储和运输的说明可见于将提供的实验室手册中。样本的收集、处理、存储和运输必须在指定的(和在适用的情况下)受控温度条件下进行,如在实验室手册中所指示的。

[1029] 10. 受试者完成/退出

[1030] 10.1. 完成

[1031] 如果受试者在第52周时完成评估,则认为他或她已完成主要研究。如果受试者在第252周时完成评估,则认为他或她已完成长期扩展。

[1032] 10.2. 研究治疗的中止

[1033] 如果必须在治疗方案结束前中止受试者的研究治疗,则不会导致受试者自动退出本研究。

[1034] 如果发生以下任何情况,则受试者的研究治疗应永久中止:

[1035] • 研究者认为出于安全性原因(例如,不良事件)中止研究治疗是为了受试者的最

大利益。

[1036] • 受试者妊娠。

[1037] • 在研究试剂施用后发生的导致伴有和不伴有喘息的支气管痉挛(新发病研究试剂相关和先前存在的哮喘的严重恶化)和/或需要通气支持的呼吸困难和/或症状性低血压的反应。

[1038] • 在输注研究试剂后1至14天发生导致肌痛和/或关节痛的反应,伴有发热和/或皮疹(提示血清病并且不代表其他公认的临床综合征的体征和症状)。这些可伴有其他事件,包括瘙痒、面部、手部或唇水肿、吞咽困难、荨麻疹、喉咙痛和/或头痛。

[1039] • 机会性感染。

[1040] • 恶性肿瘤。

[1041] • 受试者在试验期间的任何时间发生充血性心力衰竭。

[1042] • 脱髓鞘疾病。

[1043] • 受试者撤销同意施用研究试剂。

[1044] • 开始禁用药物方案。

[1045] • 根据以下TB筛选标准,认为受试者不合格。

[1046] -进行活动性TB的诊断。

[1047] -根据随访评估问题和/或体格检查,受试者具有提示活动性TB的症状,或者最近与患有活动性TB的人有密切接触,并且不能或不会继续经历附加评价。

[1048] -经历评价的受试者胸片显示当前活动性TB和/或 QuantiFERON[®] (TB Gold测试) 结果阳性(或者在未经批准/注册 QuantiFERON[®] (TB Gold测试) 或结核菌素皮肤测试由当地卫生部门强制要求的国家/地区获得阳性结核菌素皮肤测试结果),除非可以排除活动性TB,并且可以在下次施用研究试剂之前开始对潜伏性TB进行适当的治疗并继续完成。不确定的 QuantiFERON[®] (TB Gold测试) 结果应如第9.1.2节中所述进行处理。如果排除活动性TB,他们的胸片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的另外风险因素,则具有持续不确定的 QuantiFERON[®] (TB Gold测试) 结果的受试者可以在不接受潜伏性TB治疗的情况下继续。必须立即向赞助人的医疗监督员报告此决定,并将其记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[1049] -接受潜伏性TB治疗的受试者过早地停止该治疗或不配合治疗。

[1050] 在施用最后一次输注之后,在研究期间中止研究试剂输注的所有受试者将随访大约8周。

[1051] 注意:在上一次研究代理输注之后大约8周的访视被称为“最终安全性随访”,其可在计划或非计划访视时发生。

[1052] 中止研究试剂输注但不终止研究参与的受试者将在最终安全性随访时进行以下评估:

[1053] • 安全性评价(生命体征、系统审查、AE审查、TB评价、葡萄膜炎评价,以及收集血样用于常规实验室分析和确定ANA/抗双链脱氧核糖核酸(dsDNA)抗体和抗戈利木单抗抗体的存在)。

[1054] • 伴随用药审查。

[1055] • 疗效评价(关节评估、JIA评估和CRP血样收集)。

[1056] • 在最终安全性随访访视时抽取血样用于测量所有受试者的戈利木单抗浓度。

[1057] 如果受试者在研究结束前中止研究治疗,则应在最后一次输注研究试剂之后大约8周获得评估。

[1058] 10.3.退出研究

[1059] 受试者将会由于以下原因中的任一种而退出研究:

[1060] • 失去随访

[1061] • 同意退出

[1062] • 死亡

[1063] 如果受试者在研究结束之前中止研究治疗,则应在最后一次安全性随访时最后一次输注研究试剂后大约8周获得治疗结束评估。

[1064] 如果受试者失去随访,则研究站点人员必须做出一切合理的努力来联系受试者并确定中止/退出的原因。必须记录对随访采取的措施。

[1065] 当受试者在完成研究之前退出时,退出的原因应记录在CRF和源文档中。分配给被退出受试者的研究药物可能不会被分配给另一个受试者。退出的受试者不会被替换。

[1066] 如果受试者在研究结束之前退出研究,则应在撤销同意之前获得治疗结束评估。

[1067] 11.统计方法

[1068] 统计分析将由申办方或在申办方的权限下进行。下面概述了用于分析疗效和安全性数据的统计方法的一般描述。具体细节将在统计分析计划中提供。

[1069] 一般来讲,描述性统计,诸如平均值、中值、标准偏差、四分位数范围、连续变量的最小值和最大值以及分类变量的计数和百分比,将用于汇总数据。

[1070] 11.1.受试者信息

[1071] 招募到本研究的所有受试者将具有提供的基线描述性统计。

[1072] 将汇总受试者基线数据、人口统计和基线疾病特征。基线测量值被定义为在第0周研究试剂施用之前取得的最近测量值。

[1073] 无论受试者是否接受研究试剂使用,将汇总已招募到本研究的所有受试者的人口统计和受试者基线疾病特征和先前的药物数据。将汇总已接受至少1次研究试剂施用的所有受试者的药代动力学数据。除非另外指明,否则将汇总招募到本研究的所有受试者的疗效分析。将汇总所有接受过治疗的受试者的安全性评估。

[1074] 11.2.样本量确定

[1075] 样本量确定并非基于统计学考虑。为了确定本研究的样本量,考虑儿科群体中PK的可变性。目标是具有将足以建立群体PK和暴露响应模型(如果可行的话)的样本量。另外,还考虑了将提供合理安全性评估的样本量。基于这些考虑,选择了大约120名受试者的样本量,假设如果20名受试者将退出或者如果他们不提供PK样本,考虑到PK时间点的稀疏采样,大约100名受试者的样本量被认为足以建立群体PK模型,以及提供来自大约100名受试者的1年安全性数据。

[1076] 11.3.疗效分析

[1077] 主要终点分析

[1078] 没有计划主要疗效终点分析。

[1079] 重要次要终点分析

[1080] 没有计划重要次要疗效终点分析。

[1081] 其他疗效终点

[1082] 对于招募到本研究的所有受试者将汇总以下内容：

[1083] • 随时间推移JIA ACR 30、50、70和90响应者的受试者比例

[1084] • 随时间推移具有非活动性疾病的受试者比例

[1085] • 随时间推移接受pJIA药物治疗临床缓解 (ACR标准) 的受试者比例

[1086] • 随时间推移pJIA评分组相对于基线的改善

[1087] • 随时间推移到第52周,按疾病亚型和/或年龄划分的JIA ACR30、50、70和90响应者的受试者比例

[1088] • 随时间推移CHAQ相对于基线的变化

[1089] • 随时间推移CRP浓度的变化

[1090] • 随时间推移JADAS 10、27和71评分相对于基线的变化

[1091] • 随时间推移实现JADAS 10、27和71最小疾病活动的受试者比例

[1092] 11.4. 药代动力学分析

[1093] 该研究的主要目的是表征pJIA群体中戈利木单抗的PK暴露 (第28周的谷浓度和来自群体PK建模和模拟的8周的剂量间隔内的贝叶斯AUCss)。

[1094] 血清戈利木单抗浓度将随时间推移进行汇总。另外,将对到第28周的数据进行群体PK分析,以表征戈利木单抗的PK以及鉴定和定量患有pJIA的儿科群体中PK的重要协变量。将使用NONMEM方法来估计清除率和分布体积。详细信息将在群体PK分析计划中提供,并且分析结果将在单独的报告中呈现。

[1095] PK暴露的量度将在施用IV戈利木单抗 (包括但不限于稳态 C_{max} 、 C_{min} 和AUC) 之后在儿科群体中以图形方式评价,并与CNT0148ART3001中成人的PK暴露进行比较。除了观察到的浓度的描述性统计之外,儿科和成人受试者之间的相似性将通过经由目视检查从群体PK模型生成箱线图来评估。

[1096] 汇总将汇总戈利木单抗浓度,并且将评价到第52周和到LTE的PK暴露。

[1097] 11.5. 免疫原性分析

[1098] 在研究期间抗戈利木单抗抗体的出现和滴度将针对接受戈利木单抗的施用并且收集有适当样本以用于检测抗戈利木单抗的抗体的所有受试者 (即,具有在其第一次戈利木单抗施用之后获得的至少1个样本的受试者) 随时间推移进行汇总。

[1099] 11.6. 药代动力学/药效动力学分析

[1100] 将探索血清戈利木单抗浓度与疗效之间的关系。将探索和开发合适的PK/PD模型以描述暴露-反应关系。

[1101] 11.7. 安全性分析

[1102] 不良事件

[1103] 研究者在CRF中用于鉴定不良事件的逐字术语将是用监管活动医学词典 (MedDRA) 编码的。所有报告的在治疗阶段开始的不良事件 (即,治疗期不良事件和自基线起恶化的不良事件) 将包括在分析中。对于每个不良事件,将通过治疗组汇总经历至少1次给定事件出现的受试者百分比。

[1104] 可酌情提供针对死亡、由于不良事件而中止治疗、或经历剧烈或严重的不良事件的那些受试者的汇总、列表、数据集或受试者叙述。

[1105] 在本试验中将使用以下分析来评估受试者的安全性：

[1106] • AE的出现和类型

[1107] • SAE的出现和类型

[1108] • 合理相关AE的出现和类型

[1109] • 输注反应的出现

[1110] • ANA和抗dsDNA抗体的出现

[1111] • 抗戈利木单抗抗体的出现

[1112] • 实验室(血液学和化学)参数明显异常的出现

[1113] 临床实验室测试

[1114] 实验室数据将按实验室测试的类型进行汇总。在实验室数据的总结中将使用参考范围和明显异常的结果(在统计分析计划中规定)。治疗前与治疗交叉制表(具有低于正常范围、在正常范围内和高于正常范围的类别)将呈现自基线结果的变化。将制作异常的频率列表。还将提供具有任何显著异常实验室结果的受试者列表。

[1115] 生命体征

[1116] 将在事件时间表中的每个计划时间点对脉搏/心率、呼吸频率、温度和血压(收缩压和舒张压)值和自基线的变化的描述性统计数据汇总。

[1117] 11.8.期中分析

[1118] 没有计划进行期中分析。

[1119] 11.9.数据监测委员会

[1120] 这是一项开放标签研究,其中所有受试者接受相同剂量的IV戈利木单抗。因此,将不利用外部数据监测委员会。安全性数据将由本研究的医学监查员和DRC图表中定义的内部数据审查委员会常规地评价。另外,数据可由指导委员会审查。

[1121] 12.不良事件报告

[1122] 来自临床研究的安全性信息的及时、准确和完整的报告和分析对于保护受试者、研究者和申办方是至关重要的,并且由全球监管机构强制执行。申办方已确立符合全球监管要求的标准操作程序(Standard Operating Procedures),以确保安全性信息的适当报告;申办方或其附属机构进行的所有临床研究将根据那些程序进行。

[1123] 12.1.定义

[1124] 12.1.1.不良事件定义和分类

[1125] 不良事件

[1126] 不良事件是在施用药物(研究性或非研究性)产品的临床研究受试者中发生的任何不良医学事件。不良事件不一定与治疗有因果关系。因此,不良事件可以是与使用药物(研究性或非研究性)产品暂时相关联的任何不利且非预期的体征(包括异常发现)、症状或疾病,无论是否与该药物(研究性或非研究性)产品相关。(根据国际医药法规协和会[ICH]的定义)

[1127] 这包括任何新出现的或严重程度或频率较基线情况恶化的事件,或诊断过程的异常结果,包括实验室检测异常。

[1128] 注意：申办方从签署ICF开始收集不良事件（关于上一次不良事件记录的时间，参见12.3.1节所有不良事件）。

[1129] 严重不良事件

[1130] 基于ICH和欧盟的《人用医药产品药物警戒指南》的严重不良事件是任何剂量下出现的任何不良医学事件：

[1131] • 导致死亡

[1132] • 是危及生命的（受试者在事件发生时有死亡风险。其不是指假设如果更严重则可能导致死亡的事件）

[1133] • 需要住院或延长现有住院时间

[1134] • 导致持续或严重的残疾/失能

[1135] • 先天性异常/出生缺陷

[1136] • 经由医药产品的任何感染原的可疑传播

[1137] • 医学上重要*

[1138] *应当运用医学和科学判断来决定速报制度是否也适用于其他情况，例如可能不会立即危及生命或导致死亡或住院但可能危及受试者或可能需要干预以防止上述定义中列出的其他结果之一的重要医疗事件。这些通常应被认为是严重的。

[1139] 如果发生了严重和出乎意料的不良事件，并且有证据表明研究药物和该事件（例如，由过敏反应导致的死亡）之间存在因果关系，则该事件必须被报告为严重和出乎意料的可疑不良反应，即使其是研究终点的组分（例如，全因死亡率）。

[1140] 未列出的（出乎意料的）不良事件/参考安全性信息

[1141] 如果性质或严重程度与适用的产品参考安全性信息不一致，则认为不良事件是未列出的。

[1142] 对于拥有营销授权的MTX，不良事件的预期将取决于其是否列在该国家/地区药品制造商提供的包装标签中。

[1143] 与药物的使用相关联的不良事件

[1144] 如果根据在第12.1.2节中列出的定义，该属性是可能的、很可能的或非常可能的，则认为不良事件与药物的使用相关联。

[1145] 12.1.2. 属性定义

[1146] 不相关

[1147] 与药物的使用不相关的不良事件。

[1148] 可疑

[1149] 更可能有替代解释的不良事件，例如伴随药物、伴随疾病或时间上的关系表明不大可能有因果关系。

[1150] 可能

[1151] 可能由于使用药物导致的不良事件。替代解释（例如，伴随的药物、伴随疾病）是不确定的。时间上的关系是合理的；因此，不能排除因果关系。

[1152] 很可能

[1153] 可能由于使用药物导致的不良事件。时间上的关系是暗示性的（例如，通过去激发证实的）。不太可能有替代解释，例如伴随药物、伴随疾病。

[1154] 非常可能

[1155] 不良事件被列为可能的不良反应并且不能通过替代解释(例如,伴随药物、伴随疾病)合理地解释。时间上的关系是非常有暗示性的(例如,其通过去激发和再激发证实)。

[1156] 12.1.3.严重程度标准

[1157] 将使用以下一般类别描对严重性等级进行评估:

[1158] 轻度:觉察到容易忍受的症状,产生极少不适感,并且不干扰日常活动。

[1159] 中度:存在足以干扰正常活动的不适感。

[1160] 重度:极度痛苦,导致严重的功能障碍或失能。阻止了正常的日常活动。

[1161] 研究者应使用临床判断来评估受试者未直接经历的事件(例如,实验室异常)的严重性。

[1162] 12.2.特殊报告情况

[1163] 可能需要速报制度和/或安全性评价的有关申办方研究药物的所关注安全事件包括但不限于:

[1164] • 申办方研究药物的过量

[1165] • 申办方研究药物的可疑滥用/误用

[1166] • 无意或意外接触申办方研究药物

[1167] • 申办方研究药物预期药理作用的任何失效(即缺乏效果)

[1168] • 申办方研究药物使用的非预期治疗或临床益处

[1169] • 涉及申办方产品的药物差错(受试者/患者是否暴露于申办方研究药物,例如名字混淆)

[1170] 应在CRF中记录特殊报告情况。应在CRF的严重不良事件页面上记录满足严重不良事件标准的任何特殊报告情况。

[1171] 12.3.程序

[1172] 12.3.1.所有不良事件

[1173] 所有不良事件和特殊报告情况,无论是严重还是不严重,都将从获得签名并注明日期的ICF时开始报告,直到完成受试者的最后一次研究相关程序(其可能包括联系以进行安全性随访)。必须使用严重不良事件表报告严重不良事件,包括在研究结束的30天内自发向研究者报告的那些不良事件。申办方将评价研究者自发报告的超出方案中指定的时间框架的任何安全性信息。

[1174] 满足严重不良事件定义的所有事件将被报告为严重不良事件,而不管它们是否为方案指定的评估。

[1175] 必须使用医学术语在源文档和CRF中记录所有不良事件,而不管其严重程度、严重性或与研究药物的假定关系。只要可能,当体征和症状由常见病因引起(例如,咳嗽、流鼻涕、打喷嚏、喉咙痛和头部充血应报告为“上呼吸道感染”)时应给予诊断。研究者必须在CRF中记录他们对不良事件与研究疗法之间的关系的看法。不良事件管理所需的所有措施均必须记录在源文档中并根据申办方说明进行报告。

[1176] 申办方承担了向监管机构适当报告不良事件的责任。申办方还将向研究者(以及调查机构负责人,如果需要的话)报告未列出(出乎意料的)并且与研究药物的使用相关联的所有严重不良事件。除非独立伦理委员会/机构审查委员会(IEC/IRB)另有要求和记录,

否则研究者(或申办方,如果需要的话)必须将这些事件报告给批准该方案的适当IEC/IRB。

[1177] 对于所有门诊期的研究,包括开放标签研究,必须向受试者提供“钱包(研究)卡”,并指示他们在研究期间随身携带该卡,该卡写明以下项:

- [1178] • 研究编号
- [1179] • 用当地语言声明受试者正在参与临床研究
- [1180] • 研究者的名字和24小时联系电话号码
- [1181] • 当地赞助者的名称和24小时联系电话号码(仅限医务人员)
- [1182] • 现场编号
- [1183] • 受试者编号
- [1184] • 紧急打断盲测所需的任何其他信息

[1185] 12.3.2.严重不良事件

[1186] 研究期间发生的所有严重不良事件必须由研究站点人员在了解事件后24小时内报告给适当的申办方联系人。

[1187] 关于严重不良事件的信息将使用严重不良事件表传输到申办方,该严重不良事件表必须由医师在研究站点完成和签署,并且在24小时内传输到申办方。严重不良事件的初始和随访报告应通过传真(fax)进行。

[1188] 所有在研究结束时尚未解决的严重不良事件,或在受试者中止参与研究后仍未解决的严重不良事件,均必须进行随访,直至出现以下任何情况:

- [1189] • 事件消退
- [1190] • 事件稳定
- [1191] • 如果基线值/状态可用,则事件返回基线
- [1192] • 事件可归因于研究药物以外的药剂或与研究行为无关的因素
- [1193] • 不太可能获得任何额外信息(受试者或医疗保健从业者拒绝提供额外信息,在通过随访努力证明尽职调查后失去随访)

[1194] 由医药产品引起的任何感染原的可疑传播将报告为严重不良事件。在受试者参与研究过程中发生的任何需要住院(或延长住院)的事件均必须被报告为严重不良事件,但以下住院情况除外:

[1195] • 并非旨在治疗急性疾病或不良事件的住院(例如,出于社会原因,诸如待安置在长期护理机构中)

[1196] • 在进入研究之前计划的手术或过程(必须记录在CRF中)。注意:在签署ICF之前计划的住院,以及计划住院的潜在病症尚未恶化的住院,将均不视为严重不良事件。任何导致原计划住院时间延长的不良事件将被报告为新的严重不良事件。

[1197] 研究中受试者在最后一剂研究药物后2个月内的死亡原因,无论该事件是预期的还是与研究药物相关联,都被认为是严重不良事件。

[1198] 12.3.3.妊娠

[1199] 研究站点人员必须在了解事件后24小时内,使用适当的怀孕通知表,将妊娠期所有初始报告报告给申办方。异常妊娠期结果(例如,自然流产、死胎和先天性异常)被认为是严重不良事件,并且必须使用严重不良事件表进行报告。在研究期间怀孕的任何受试者必须中止进一步的研究治疗。

[1200] 因为研究药物对精子的影响未知,所以研究中包括的男性受试者的伴侣怀孕情况将由研究站点人员在了解事件后24小时内使用适当的怀孕通知表进行报告。

[1201] 将需要关于妊娠结果和婴儿任何产后后遗症的随访信息。

[1202] 12.4.特别关注的事件

[1203] 在参与该临床研究的受试者中首次施用研究试剂之后出现的任何新识别的恶性肿瘤或活动性TB的病例必须由研究者根据第12.3节中的程序报告。研究者还建议,活动性TB在大多数国家/地区被认为是可报告的疾病。只有当这些事件满足严重不良事件的定义时,才认为它们是严重的。

[1204] 13.研究药物信息

[1205] 13.1.研究药物的物理描述

[1206] 测试产品戈利木单抗将作为无菌液体供应,用于在单次使用小瓶中以4mL (50mg, 12.5mg/mL) 的体积IV输注。每个小瓶将容纳pH为5.5的在组氨酸、山梨糖醇和聚山梨醇酯80的水性介质中的戈利木单抗。不存在防腐剂。它的制造和提供将由申办方负责。

[1207] MTX(口服或注射)将不会由申办方提供,而是必须从商业药房获得。

[1208] 13.2.制备、处理和储存

[1209] 玻璃小瓶中的液体研究试剂将随时可用。在研究站点,戈利木单抗溶液的小瓶必须储存在2°C至8°C (35.6°F至46.4°F) 范围内的受控温度下的安全冰箱中。

[1210] 静脉内戈利木单抗在幼年特发性关节炎患者中的药代动力学、疗效和安全性:开放标签3期研究的结果

[1211] 患者和方法

[1212] 目标

[1213] 评估静脉内(IV)戈利木单抗经28周的治疗和52周的治疗在已接受甲氨蝶呤(MTX)疗法的具有活动性多关节型幼年特发性关节炎(poly-JIA)的儿科患者中的药代动力学(PK)、疗效和安全性。

[1214] 患者和研究设计

[1215] 这是一项在9个国家的33个中心进行的3期、开放标签、单臂、国际研究。合格的患者为在筛选和入组时2至小于18岁,体重>15kg,尽管在筛选前用甲氨蝶呤(MTX; $\geq 10\text{mg}/\text{m}^2$)治疗 ≥ 2 个月,但仍有至少3个月的poly-JIA和活动性关节炎史(≥ 5 个活动性关节);并且在16岁生日前发病。Poly-JIA可包括根据JIA国际风湿病协会联盟(ILAR)分类标准分类的以下类别之一:扩展的寡关节JIA、类风湿因子(RF)-阳性或RF-阴性的poly-JIA、 ≥ 3 个月内无全身症状的全身性JIA、附着点炎相关性关节炎或多关节幼年银屑病关节炎。

[1216] 所有合格的患者在第0周和第4周以及此后每8周(q8w; ± 3 天)到第28周和q8w(± 1 周)到第52周接受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 戈利木单抗(最大单剂量240mg) IV (30 $\pm$ 10分钟内)(图18)。在每次访视时计算体表面积(BSA),并根据需要调节IV戈利木单抗剂量以将剂量保持在 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 。商业MTX以与研究入选时相同的基于BSA的剂量每周施用至少到第28周(在BSA<1.67 m^2 的患者中为10至30 mg/m^2 ,或在BSA $\geq 1.67\text{m}^2$ 的患者中为每周15mg的最小剂量)。在第28周之后,允许患者改变或添加MTX、其他DMARD、糖皮质激素和NSAID。在第52周完成研究的患者具有进入现在正在进行的研究的长期扩展阶段的选择。

[1217] 患者必须是医学稳定的,在筛选前3个月内不能患有活动性葡萄膜炎,并且不能具

有主要的并发医学病症。筛选结核患者,并且排除有活动性结核证据的那些。患有潜伏性结核的患者如果目前正在接受潜伏性结核的治疗则是合格的。具有生育潜力的患者在筛选时和每次研究访视时必须具有阴性妊娠测试,并且性活跃的患者必须同意使用高效的节育方法。

[1218] 如果患者正在使用糖皮质激素(对于泼尼松当量为 $\leq \pm 10\text{mg}/\text{天}$ 或 $0.20\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ [以较低者为准])或NSAID,则在首次施用IV戈利木单抗或筛选之前,剂量必须分别稳定 ≥ 2 周。多达30%的患者可能先前暴露于 ≤ 2 种抗TNF剂。在首次施用IV戈利木单抗之前用b-DMARD或小分子治疗剂治疗的患者需要观察特定的清除期。相对于首次研究试剂施用的清除期,对于白介素(IL)-1ra为1周;对于Janus激酶抑制剂为2周;对于关节内、肌肉或IV糖皮质激素、来氟米特、依那西普或开始DMARD为4周;对于阿达木单抗或赛妥珠单抗为6周;对于阿巴西普、英夫利昔单抗或托珠单抗为8周;对于IL-12/23抑制剂、阿法西普、活病毒或细菌疫苗接种、研究药物或医疗装置为3个月;对于卡那单抗为4个月;对于卡介苗接种或耗尽B细胞或T细胞的试剂为12个月。禁止使用细胞毒性剂。

[1219] 独立的伦理委员会或机构审查委员会批准了每个站点的研究方案,该研究是根据源于赫尔辛基宣言的伦理原则进行的,并且符合良好临床实践和适用的法规要求。该研究在ClinicalTrials.gov (NCT02277444)注册。7岁或更大的患者给予同意,并且父母、法定监护人或法定代理人给予研究参与的书面知情同意书。

[1220] 研究评估

[1221] 在第0周、第4周、第8周、第12周、第20周、第28周和第52周测量血清戈利木单抗浓度。在第0周、第4周和第12周抽取输注前和输注后样本,并且在第0周和第8周之间的任何时间抽取另外的随机群体PK样本,而不是在第0周、第4周和第8周访视时抽取,并在研究试剂施用之前或之后至少24小时收集。在第8周、第20周、第28周和第52周仅抽取输注前样本。使用经验证的、特异性的和灵敏的方法分析血清样本。

[1222] 疗效评估包括JIA评分组测量(医师对总体疾病活动的全局评估[疾病活动医生(MD)全局评估;0至10cm视觉模拟量表(VAS),从“无关节炎活动”到“极度活动性关节炎”],具有活动性关节炎的关节数[肿胀或,如果不存在肿胀,同时具有有限运动范围和疼痛的关节],运动范围有限的关节数,交叉适应和验证版本的儿童健康评估问卷[CHAQ;包括父母对使用VAS(0至10cm)对总体健康状况和疼痛的评估],和C-反应蛋白[CRP;对于无基础炎症性疾病患者,正常 $\leq [0.287\text{mg}/\text{dL}]$),和晨僵持续时间。

[1223] 每次访视时进行安全性评估,并包括常规实验室评价。任何不良事件(AE)均以逐字术语报告,并根据监管活动医学词典(MedDRA)版本21.1进行编码。使用经验证的、高度灵敏的耐药酶免疫测定,在第0周、第4周、第8周、第12周、第28周和第52周收集的血清样本中评价抗戈利木单抗抗体。具有戈利木单抗特异性抗体的样本被分类为抗药物抗体(ADA)阳性。在首次戈利木单抗施用后至第52周的任何时间具有分类为ADA阳性(治疗加强[如果基线样本为ADA阳性则增加滴度]或治疗诱导)的样本的患者被分类为抗戈利木单抗抗体阳性。具有分类为ADA阳性且在治疗后未增加滴度的基线样本的患者被分类为抗戈利木单抗抗体阴性。在基线、第24周和第52周收集的血清样本中评价抗核抗体(ANA)/抗双链DNA(dsDNA)抗体的存在。

[1224] 研究终点

[1225] 本研究的主要终点是第28周的PK暴露(第28周的谷浓度)和在第28周的8周的1个给药间隔内模型预测的稳态曲线下面积(AUC_{ss}) (来自群体PK建模和模拟)。主要次要终点是第52周的PK暴露(第52周的谷浓度)和第52周的模型预测的 AUC_{ss} 。

[1226] 疗效终点包括JIA美国风湿病学会(ACR) 30、50、70和90响应(定义为相对于基线的30%、50%、70%或90%改善 ≥ 3 ,而在剩余JIA评分测量的 >1 中 $\geq 30\%$ 不恶化),其是相对于在首次IV戈利木单抗施用之前(第0周)进行的最接近评价计算的;JIA ACR非活动性疾病的改良版本(定义为无关节具有活动性关节炎和无活性葡萄膜炎;无因JIA引起的发热、皮疹、浆膜炎、脾肿大、肝肿大或全身淋巴结病;正常CRP;全局MD ≤ 5 mm[无活动性疾病];和 <15 分钟的晨僵持续时间);接受poly-JIA药物治疗的临床缓解(定义为在接受药物治疗时每次访视 ≥ 6 个月无活动性疾病);和计数71个关节的幼年关节炎疾病活动评分(JADAS 71;高疾病活动[HDA]的截断值 >10.5 ,中等疾病活动[MDA]的截断值为3.9至10.5,低疾病活动[LDA]的截断值为1.1至3.8,并且非活动性疾病[ID]的截断值为 ≤ 1)。

[1227] 统计分析

[1228] 本研究遵循临床试验报告统一标准(CONSORT)声明的建议,报告了完整分析集的结果。接受至少1个剂量的研究试剂的所有患者都包括在PK(如果他们具有足够的PK样本用于分析)、疗效和安全性分析中。利用到第28周的数据进行群体PK分析,以表征戈利木单抗的PK并鉴定患有poly-JIA的儿科患者中PK的重要协变量。群体PK建模用于评估儿科与成人的PK相似性。使用非线性混合效应建模(NONMEM)方法来估计清除率和分布体积。还执行暴露响应分析以探究和表征暴露和疗效之间的关系。将儿科群体中PK暴露的测量结果与先前研究中在第0周、第4周和此后q8w接受IV戈利木单抗2mg/kg的患有RA的成人中的PK暴露进行比较,并用作参考群体。

[1229] 对于二元复合疗效终点的分析,根据意向治疗(ITT)原则,使用插补规则(对于完全缺失数据的无响应者插补[NRI]和对于缺失组分的末次观察推进[LOCF])插补缺失数据。对于连续终点或缺失浓度数据没有插补。不进行正式的假设检验。一般来讲,描述性统计诸如平均值、中值、标准差、四分位数范围以及最小值和最大值用于汇总连续变量的数据,并且使用计数和百分比来汇总分类变量的数据。

[1230] 结果

[1231] 患者处置和疾病特征

[1232] 在筛选的180名患者中,127名(71%)入组并接受至少1个剂量的IV戈利木单抗,并包括在完整分析数据集中(图19)。在127名接受治疗的患者中,在研究中到第52周仍有113名(89%)。AE是研究中止的主要原因。

[1233] 表9汇总了基线人口统计、疾病特征和poly-JIA先前治疗。基线时的中位年龄为13岁,大多数患者为女性(73%)和白人(67%),并且中位体重为42.4kg。大多数患者被分类为RF阴性(43%)和RF阳性(35%)的poly-JIA。最常见的既往用药是NSAID(94%)和全身性糖皮质激素(57%)。在接受过抗TNF治疗的25名患者中,大多数(80%)接受过依那西普。在基线时,72%的患者服用NSAID,37%的患者服用口服糖皮质激素,并且10%的患者服用除MTX以外的s-DMARD。在基线时,121名(99%)患者具有高疾病活动,如通过JADAS 71测量的(表10)。

[1234] 表9:基线人口统计、疾病特征和既往关节炎治疗

[1235]	特性	戈利木单抗 (N=127)
	年龄, 岁	13.0(8.0,15.0)
	女性, n (%)	93(73.2)
	种族, n (%)	
	白人	85(66.9)
	其他	28(22.0)
	西班牙裔或拉丁裔, n (%)	63(49.6)
	体重, kg	42.4(29.2,57.0)
	BSA, m ²	1.3(1.0,1.6)
	疾病持续时间, 年	1.4(0.5,4.0)
	ILAR 分类, n (%)	
	多关节类风湿性因子-阴性	54(42.5)
	多关节类风湿性因子-阳性	44(34.6)
	与附着点炎相关的关节炎	12(9.4)
	扩展的寡关节	8(6.3)
	幼年银屑病性关节炎	5(3.9)
	全身性无全身症状但有多关节病程	4(3.1)
	ANA 阳性, n (%)	64(50.4)
	既往关节手术或注射, n (%)	26(20.5)
	类固醇关节注射	25(96.2)
	其他 ^a	10(38.5)
[1236]	基线 JIA 用药 ^b	
	甲氨蝶呤, n (%)	127(100)
	甲氨蝶呤剂量, mg/m ² /周	13.6(4.5)
	除甲氨蝶呤以外的 s-DMARD, n (%)	13(10.2)
	口服糖皮质激素, n (%)	47(37.0)
	泼尼松或等效剂量, mg/kg/天	0.16(0.1)
	NSAID, n (%)	92(72.4)
	既往 JIA 用药 ^c , n (%)	
	甲氨蝶呤	127(100)
	除甲氨蝶呤以外的 s-DMARD ^d	25(19.7)
	抗 TNF 疗法	25(19.7)
	除抗 TNF 疗法以外的 b-DMARD	3(2.4)
[1237]	全身性糖皮质激素	72(56.7)
	NSAID	119(93.7)

除非另有说明, 否则值均为中值 (IQ 范围)。

^a 关节穿刺术、关节镜检查 (手术或诊断)、截骨术、肌腱手术

^b 基线 JIA 用药是在首次研究试剂施用之前和之后使用的任何药物

^c 既往 JIA 用药是起始日期在首次研究试剂施用日之前的任何药物

^d 包括免疫抑制剂环孢菌素 (n=2) 和硫唑嘌呤 (n=1)

ANA, 抗核抗体; b-DMARD, 改善生物疾病的抗风湿药物; BSA, 体表面积; DMARD, 改善疾病的抗风湿药物; ILAR, 国际风湿病学协会联盟; IQ, 四分位数; JIA, 幼年特发性关节炎; N, 所有接受治疗的患者; n, 患者数量; NSAID, 非甾体类抗炎药; s-DMARD, 合成的改善疾病的抗风湿药物; TNF, 肿瘤坏死因子

[1237] 表10: JIA评分组测量和其他疾病活动参数汇总 (N=127)

	特性	基线	第 4 周	第 28 周	第 52 周
[1238]	JIA 评分组测量				
	疾病活动 MD 全局评估, 0-10cm	5.5(4.5,6.8) ^a	2.2(1.0,3.8)	0.5(0.1,1.2)	0.3(0.0,1.4)
	VAS				
	父母对总体健康状况的评估, 0-10cm	5.4(3.3,6.9)	2.6(1.1,5.0)	1.7(0.3,4.8)	1.1(0.2,4.2)
	VAS				
	活动性关节数	14.0(9.0,22.0)	6.0(2.0,11.0)	1.0(0.0,4.0)	0.0(0.0,3.0)
	运动范围有限的关节数	10.0(4.0,18.0)	3.0(0.0,9.0)	1.0(0.0,4.0)	1.0(0.0,5.0)
	CHAQ, 0-3 评分	1.25(0.8,1.9)	0.9(0.4,1.4)	0.4(0.0,1.1)	0.4(0.0,1.1)
	CRP, mg/dL ^b	0.5(0.1,1.1)	0.1(0.0,0.3)	0.1(0.0,0.7)	0.1(0.0,0.6)
	晨僵持续时间, 分钟	40(20,60)	5(0,30)	0(0,15)	0(0,15)
	JADAS 71, 平均值 (95%置信区间)	28.4 (26.1, 30.7)	14.6 (12.4, 16.8)	6.8 (5.2, 8.3)	5.4 (3.9, 6.9)
	JADAS 71 高疾病活	121(99.2)	73(58.9)	23(20.2)	16(14.5)
[1239]	动>10.5, n (%)				
	JADAS 71 中度疾病活动 3.9-10.5, n (%)	1(0.8)	32(25.8)	37(32.5)	32(29.1)
	JADAS 71 低疾病活动 1.1-3.8, n (%)	0	15(12.1)	27(23.7)	23(20.9)
	JADAS 71 非活动性疾病≤1, n (%)	0	4(3.2)	27(23.7)	39(35.5)
	除非另有说明, 否则所有值均为中值 (IQ 范围)。				
^a n=122					
^b 正常为≤0.287mg/dL					
95%置信区间基于正态近似: 平均值±1.96×SD/√N					
CHAQ, 儿童健康评估问卷; CRP, C 反应蛋白质; IQ, 四分位数; JADAS 71, 评价 71 个关节的幼年关节炎疾病活动评分; JIA, 幼年特发性关节炎; MD, 医生; VAS, 视觉模拟量表					

[1240] 药代动力学和免疫原性

[1241] 总体而言, 在第0周、第4周和此后q8w施用IV戈利木单抗80mg/m²后, poly-JIA患者的PK暴露与成年RA参考群体中的相似(图20A和图20B)。poly-JIA患者的总体中值稳态谷戈利木单抗浓度在第28周为0.40μg/mL(平均值±SD: 0.50±0.43μg/mL), 并且在第52周为0.45μg/mL(平均值±SD: 0.52±0.48μg/mL)。在第28周, 整个儿科年龄类别的总体中值稳态谷戈利木单抗浓度相似, 并且与第36周在成年RA参考群体中观察到的中位谷戈利木单抗浓度相似(0.31μg/mL; 平均值±SD: 0.41±0.52μg/mL)(图20A)。在第28周观察到的戈利木单抗中值谷浓度在体重四分位数之间也是相似的。

[1242] 在8周给药间隔内患有poly-JIA的患者的群体PK模型预测中值总体AUC_{ss}在第28周为399μg·天/mL并且在第52周为421μg·天/mL。这些值在儿科年龄类别之间是一致的(图20B)。在poly-JIA患者中模型预测的AUC_{ss}值略微高于在成年RA参考群体中观察到的AUC_{ss}

(248 $\mu\text{g} \cdot \text{天}/\text{mL}$) (图20B);然而,已显示单克隆抗体在PK中具有中等至高度的可变性。

[1243] 到第52周,125名(31%)具有合适样本的接受治疗的患者中有39名为抗戈利木单抗抗体阳性,并且24名(19%)为中和抗体阳性。抗戈利木单抗抗体的峰值滴度在5名患者中为<10,在17名患者中为 ≥ 10 至<100,在13名患者中为 ≥ 100 至<1000,并且在4名患者中为 ≥ 1000 。抗体阳性患者中值谷戈利木单抗浓度倾向于低于抗体阴性患者(第52周0.00[n=32]对0.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [n=63])。

[1244] 有效性

[1245] 如表10所示,早在第4周就观察到JIA ACR组分评分相对于基线的改善,并从第28周到第52周保持。在第28周和第52周,中值改善百分比对于疾病活动MD全局评估分别为92%和96%,对于父母对总体健康状况的评估为63%和70%,对于活动性关节数为94%和100%,对于运动范围有限的关节数为89%和85%,对于按CHAQ划分的身体机能为57%和63%,对于CRP为53%和48%。

[1246] 类似地,早在第4周就观察到JIA ACR 30、50、70和90响应,其中超过50%的患者实现至少JIA ACR 50(图21A)。在第28周,70%的患者实现至少JIA ACR 70响应,并且几乎一半(47%)实现JIA ACR 90响应。到第52周保持这些响应。在第28周和第52周,在JIA ACR 30、50、70和90的血清谷戈利木单抗浓度四分位数之间观察到一致高的JIA ACR响应率(数据未示出)。在第52周,JIA ACR 30响应者中的中值血清谷戈利木单抗浓度(0.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$,n=83)高于无响应者(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$,n=12);12个无响应者中有6个为戈利木单抗抗体阳性。

[1247] 不同poly-JIA亚型之间的JIA ACR 30、50、70和90响应率与在整个群体中观察到的那些大体相似;然而,在没有全身性症状但具有多关节病程的全身性poly-JIA患者中的响应率通常较低(在第52周,25%已实现至少JIA ACR 70响应),并且在患有扩展的寡关节或幼年银屑病关节炎的患者中通常较高(在第52周,88%和80%分别已实现至少JIA ACR 70响应)。应当注意,这些亚型的患者也比其他亚型少(表9)。在有和没有既往抗TNF疗法的患者中,第52周的JIA ACR 30响应率也是相似的(两组中均为76%)。

[1248] 早在第4周就有4%的患者实现JIA ACR非活动性疾病,在第28周增加到29%,并且在第52周增加到34%(图21B)。早在第28周2%的患者和在第52周13%的患者实现接受药物治疗时的临床缓解(图21B)。早在第4周就观察到CHAQ评分相对于基线的平均改善(0.34),在第28周增加到0.62,并且到第52周保持稳定(图21C)。父母对患者疼痛的评估的改善模式相似(图21C)。

[1249] 早在第4周就观察到平均JADAS 71评分降低,并持续到第52周(图21D)。JADAS 71相对于基线的平均降低在第28周为-21.28,并且在第52周为-22.18。早在第4周,12%的患者就实现了LDA并且3%的患者实现了ID(表10)。到第52周,21%的患者实现了LDA并且36%的患者实现了ID。

[1250] 安全性

[1251] 到第52周,大多数患者(85%)经历至少1个AE;7%经历至少1个严重AE(SAE),并且9%经历至少1个导致中止的AE(表11)。超过一半的治疗患者(65%)经历1次或更多次感染,6%的患者经历1次或更多次严重感染,1名患者经历机会性感染。输注反应患者比例低,无严重反应或导致治疗中止,并且抗戈利木单抗抗体对输注反应无影响。未报告活动性结核、脱髓鞘事件或过敏或血清病反应。1名患者报告了系统性红斑狼疮;该事件被认为是非严重

的,并且与戈利木单抗无关。到第52周没有报告死亡,但在第52周后报告了1例由脓毒性休克(可能是由于便秘导致细菌通过肠壁移位)引起的死亡。该患者在第76周接受其最后一次剂量的IV戈利木单抗,并在第78周死亡。该事件被认为是严重的,强度严重,并且可能与戈利木单抗有关。

[1252] AE通常与戈利木单抗和其他抗TNF疗法所建立的安全性特征一致。第52周AE发生率最高的MedDRA系统器官类别(SOC)为感染和侵染(67%) (表11)。最常报告的AE是上呼吸道感染(21.3%)和鼻咽炎(18%)。到第52周有九名(7%)患者经历SAE;1名(1%)患者各自经历了带状疱疹播散、感染性支气管扩张加重、脓毒症、水痘、蕈样真菌病、自杀意念、蜂窝织炎、肺炎、肺炎链球菌和胸腔积液(同一患者报告肺炎链球菌和多处积液)。除水痘、蜂窝织炎和肺炎外,所有这些事件均导致IV戈利木单抗的永久性中止。到第52周有1名患者报告双眼出现新发前葡萄膜炎。该事件被视为初期/非常轻微,且无需治疗。

[1253] 在第24周评价的115名患者中,57名在基线时为ANA阴性,并且13名(23%)在第24周为新ANA阳性。在第52周评价的110名患者中,51名在基线时为ANA阴性,并且这些患者中的13名(26%)在第52周为新ANA阳性。在这些新阳性患者中,在第24周7名患者为ANA阴性并且6名患者为ANA阳性。第24周ANA阳性的六名患者在第52周变为ANA阴性,并且1名中止了该研究。在第24周,11名患者的滴度为1:40,并且2名患者的滴度为1:160。在第52周,8名患者的滴度为1:40,3名患者的滴度为1:80,并且2名患者的滴度为1:160。测定在整个研究中保持稳定。第24周和第52周新阳性的患者均无ANA阳性史,并且在基线、第28周或第52周无抗dsDNA抗体阳性。

[1254] 表11:到第52周的不良事件汇总

	戈利木单抗 (N=127)
随访平均持续时间, 周	49.8
平均暴露, 施用次数	6.6
由于≥1 个 AE 而中止研究试剂的患者	11(8.7)
具有≥1 个 AE 的患者	108(85.0)
具有≥1 个严重 AE 的患者	5(3.9)
具有≥1 个 SAE 的患者	9(7.1)
每 100 名患者年暴露的 AE, n (95% CI)	359.6(326.7,394.9)
每 100 名患者年暴露的 SAE, n (95% CI)	8.2(4.0,15.1)
死亡 ^a	0
具有≥1 次感染的患者	83(65.4)
≥1 次严重感染	7(5.5)
≥1 次机会性感染	1(0.8)
每 100 名患者年暴露的感染, n (95% CI)	151.4(130.3,174.9)
每 100 名患者年暴露的严重感染, n (95% CI)	6.6(2.8,13.0)
[1255] 具有≥1 个输注相关反应的患者	3(2.4)
≥1 个恶性肿瘤的患者 ^b	1(0.8)
活动性肺结核患者	0
ANA/抗 dsDNA 抗体 ^c	13(25.5)
按 SOC 划分的常见不良事件 (出现在≥5%的患者中) 和相关 PT	
感染和侵染	85(66.9)
上呼吸道感染	27(21.3)
鼻咽炎	23(18.1)
胃肠道疾病	30(23.6)
恶心	11(8.7)
呕吐	10(7.9)
腹痛	8(6.3)
肌肉骨骼和结缔组织疾病	24(18.9)
幼年特发性关节炎	14(11.0)
神经系统疾病	20(15.7)
头痛	14(11.0)
调查	13(10.2)
丙氨酸转氨酶增加	7(5.5)
除非另有说明, 否则所有值均为 n (%)。	
[1256] ^a 在第 78 周报告一例因脓毒性休克的死亡	
^b 蕈样真菌病	
^c 新开发; 在 51 名基线为 ANA 阴性的患者中	
AE, 不良事件; ANA, 抗核抗体; 抗 dsDNA, 抗双链脱氧核糖核酸; CI, 置信区间; N, 所有接受治疗的患者; n, 患者数量; PT, 优选术语; SAE, 严重不良事件; SOC, 系统器官类别	
[1257] 讨论	
[1258] 在该开放标签 3 期研究中, 在患有 poly-JIA 的儿科患者中, IV 戈利木单抗加 MTX 提	

供的PK暴露类似于在患有RA的成人中发现的有效暴露。中值谷血清戈利木单抗浓度和AUCss通常随时间推移保持,并且在年龄组和体重四分位数之间相似,表明基于BSA的给药适于在整个poly-JIA年龄和体重范围内实现相似的PK暴露。

[1259] 已充分认识到,稳态谷水平的交叉研究比较可能是具有挑战性的,特别是当谷水平相对低并且因此在研究之间高度可变时。为了将研究间可变性置于交叉研究比较的背景中,还将在poly-JIA中观察到的稳态谷浓度与使用IV戈利木单抗的所有3项成人3期研究(包括RA、银屑病关节炎和强直性脊柱炎)进行比较。在第28周poly-JIA患者中的中值稳态谷血清戈利木单抗浓度(平均值 $\pm$ SD) $0.40\mu\text{g/mL}$ ($0.50\pm 0.43\mu\text{g/mL}$) 在第36周对接受戈利木单抗IV施用的患有RA、银屑病关节炎或强直性脊柱炎的成人中观察到的那些范围内(分别为 $0.31[0.41\pm 0.52]$ 、 $0.61[0.69\pm 0.58]$ 和 $0.71[0.74\pm 0.51]\mu\text{g/mL}$)。考虑到研究间可变性,这些PK数据支持以下结论:在本研究在儿童中观察到的稳态戈利木单抗浓度通常与在成年RA参考群体中观察到的相似。

[1260] 值得注意的是,在该儿科研究中的最高体重四分位数组患者的平均体重为73kg(范围:57.00kg至142.70kg),这与成人RA参考群体的平均体重相似(72kg;范围:39.00kg至125.00kg)。此外,对于最高体重四分位数组,在成人RA研究中使用的2mg/kg剂量与在该儿科研究使用的 80mg/m^2 剂量的计算总剂量差异产生小的剂量差异(平均值2%;范围:-13%至16%),证明该组中的poly-JIA患者接受的戈利木单抗剂量与成年RA参考群体中的那些相当。因此,最高体重四分位数组的PK暴露为不同年龄和体重亚组的PK比较提供了内部参考,以证明所有poly-JIA亚组的PK暴露与成年RA参考群体相似。

[1261] IV戈利木单抗导致通常保持到第52周的poly-JIA临床体征和症状的减少。在对于JIA ACR响应和poly-JIA亚型的谷血清戈利木单抗浓度四分位数上,以及在有和没有既往抗-TNF暴露的患者中,总体上观察到一致高的JIA ACR 30、50、70和90响应率。该研究中我们用IV戈利木单抗观察到的JIA ACR响应率和其他临床R响应与在类似的3期poly-JIA研究中对SC戈利木单抗和其他b-DMARD报告的一致。

[1262] 中值谷戈利木单抗浓度在ADA阳性患者比在ADA阴性患者中低,并且在JIA ACR 30无响应者中比响应者中低。JIA ACR 30无响应者中低的中值戈利木单抗浓度总体上是因为12名JIA ACR 30无响应者中的6名是ADA阳性的并且具有低于定量下限的中值戈利木单抗浓度。然而,似乎ADA状态对疗效特征没有影响,因为在第52周12名无响应者中有6名也是ADA阴性的。此外,JIA ACR 30响应率在ADA阳性和ADA阴性患者中是相似的(分别为79%对74%)。

[1263] 到第52周IV戈利木单抗在poly-JIA患者中的总体安全性特征与IV戈利木单抗在成人风湿性疾病患者中的总体安全性特征和SC戈利木单抗在poly-JIA患者中的总体安全性特征一致。尽管到第52周没有死亡,但在第78周报告了1例死亡,其被认为可能与IV戈利木单抗有关。在类似的3期poly-JIA研究中,没有报告SC戈利木单抗和其他b-DMARD的死亡。十三名患者在第52周已新开发了ANA抗体,并且这些患者中没有一个具有抗dsDNA抗体。

[1264] PRINTO和PRCSG网络的伦理要求是,出于注册目的参与试验的公司应继续向入组临床试验的儿童提供药物,直到鉴定出药物供应的替代方法。如先前所报告的,该要求对于资源较少的国家特别重要,在这些国家儿童可能没有公共或私人保险来支付b-DMARD的高成本。对于该试验,在252周后停止对入组试验的已达到18岁的儿童的药物供应。IV戈利木

单抗目前在参与试验的许多国家 (9个中的7个) 中销售用于RA、PsA或AS。

[1265] 该研究的局限性是其开放标签、非随机和非对照设计。研究以这种方式设计,旨在外推来自成人疗效试验的结果。

[1266] 总之,在第0周和第4周和此后q8w到第52周的IV戈利木单抗 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 与每周MTX为活动性poly-JIA患者的临床疗效提供了足够的PK暴露,包括先前暴露于抗-TNF疗法的患者亚组。该IV戈利木单抗方案在该患者群体中也被良好耐受。

序列表

- <110> Janssen Biotech, Inc.
Bensley, Karen
Clark, Michael
Leu, Jocelyn
Xu, Zhenhua
- <120> 用于治疗幼年特发性关节炎的物质和方法
- <130> JBI6307WOPCT1
- <140> 待转让
- <141> 2021-04-26
- <150> 63/015,889
- <151> 2020-04-27
- <150> 63/015,894
- <151> 2020-04-27
- <150> 63/015,902
- <151> 2020-04-27
- <160> 45
- <170> PatentIn版本3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 智人(Homo sapiens)
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (1) .. (5)
- <223> 重链互补决定区1 (CDR1)。
- <400> 1
Ser Tyr Ala Met His
1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> 智人(Homo sapiens)
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (1) .. (17)
- <223> 重链互补决定区2 (CDR2)。
- <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 1位处的Xaa选自Ile、Phe或Val。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2) .. (2)
 <223> 2位处的Xaa选自Ile或Met。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (3) .. (3)
 <223> 3位处的Xaa选自Ser或Leu。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4) .. (4)
 <223> 4位处的Xaa选自Tyr或Phe。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (10) .. (10)
 <223> 10位处的Xaa选自Lys或Tyr。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (11) .. (11)
 <223> 11位处的Xaa选自Ser或Tyr。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (17) .. (17)
 <223> 17位处的Xaa选自Asp或Gly。
 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Xaa
 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (17)
 <223> 重链互补决定区3 (CDR3)。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4) .. (4)

<223> 4位处的Xaa选自Ile或Val。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (5) .. (5)

<223> 5位处的Xaa选自Ser、Ala或Gly。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (9) .. (9)

<223> 9位处的Xaa选自Asn或Tyr。

<400> 3

Asp Arg Gly Xaa Xaa Ala Gly Gly Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (11)

<223> 轻链互补决定区1 (CDR1)。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (7) .. (7)

<223> 7位处的Xaa选自Ser或Tyr。

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (7)

<223> 轻链互补决定区2 (CDR2)。

<400> 5
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (10)
<223> 轻链互补决定区3 (CDR3)。
<400> 6
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10
<210> 7
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (126)
<223> 重链可变区序列,如原始序列中所示
图4
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (30)
<223> 框架1
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (28) .. (28)
<223> 28位处的Xaa选自Ile或Thr。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (31) .. (35)
<223> 互补决定区1 (CDR1)。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (36) .. (49)
<223> 框架2

- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (43) .. (43)
<223> 43位处的Xaa选自Lys或Asn。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (50) .. (66)
<223> 互补决定区2 (CDR2)。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (50) .. (50)
<223> 50位处的Xaa选自Ile、Phe或Val。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (51) .. (51)
<223> 51位处的Xaa选自Ile或Met。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (52) .. (52)
<223> 52位处的Xaa选自Ser或Leu。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (53) .. (53)
<223> 53位处的Xaa选自Tyr或Phe。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (59) .. (59)
<223> 59位处的Xaa选自Lys或Tyr。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (60) .. (60)
<223> 60位处的Xaa选自Ser或Tyr。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (66) .. (66)
<223> 66位处的Xaa选自Asp或Gly。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (67) .. (98)

<223> 框架3
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (70) .. (70)
 <223> 70位处的Xaa选自Val或Ile。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (75) .. (75)
 <223> 75位处的Xaa选自Ser或Pro。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (78) .. (78)
 <223> 78位处的Xaa选自Thr或Ala。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (80) .. (80)
 <223> 80位处的Xaa选自Tyr或Phe。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (94) .. (94)
 <223> 94位处的Xaa选自Tyr或Phe。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (99) .. (115)
 <223> 互补决定区3 (CDR3)。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (102) .. (102)
 <223> 102位处的Xaa选自Ile或Val。
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (116) .. (126)
 <223> J6区
 <400> 7

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Xaa	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Xaa	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

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

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (108)

<223> 轻链可变区序列,如原始序列中所示
图5

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (23)

<223> 框架1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (24) .. (34)

<223> 互补决定区1 (CDR1)。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (49)

<223> 框架2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (50) .. (56)

<223> 互补决定区2 (CDR2)。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (57) .. (88)

<223> 框架3

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (89) .. (98)

<223> 互补决定区3 (CDR3)。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (99) .. (108)

<223> J3区

<400> 8

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65				70				75						80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro
				85				90					95		
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 9

<211> 157

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (157)

<223> 人TNF α 单体序列

<400> 9

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg
			20					25					30		
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu
			35				40						45		

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

ttggtccagt cggactgg

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

cacctgcact cgggtgctt

18

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

cactgttttg agtgtgtacg ggcttaagtt

30

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

gccgcacgtg tggaaggg

18

<210> 14

<211> 25	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 14	
agtcaaggctc ggactggcctt aagtt	25
<210> 15	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 15	
gttgtccctt ctcacaattct tcgaattt	28
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 16	
ggcggtagac tactcgtc	18
<210> 17	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 17	
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile	
1 5	
<210> 18	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 18	
tttcgtacgc caccatggac tggacctgga gcac	35
<210> 19	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 19	
tttcgtacgc caccatgggg tttgggctga gctg	34
<210> 20	
<211> 35	
<212> DNA	

<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 20	
tttcgtacgc caccatggag tttgggctga gcatg	35
<210> 21	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 21	
tttcgtacgc caccatgaaa cacctgtggt tette	35
<210> 22	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 22	
tttcgtacgc caccatgggg tcaaccgcca tcctc	35
<210> 23	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 23	
Thr Val Thr Val Ser Ser	
1 5	
<210> 24	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 24	
gtgccagtgg cagaggagtc cattcaagct taagtt	36
<210> 25	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 25	
Met Asp Met Arg Val	
1 5	
<210> 26	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	

<400> 26	
tttgtcgaca ccatggacat gagggtcctc c	31
<210> 27	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 27	
tttgtcgaca ccatggaagc cccagctc	28
<210> 28	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 28	
Thr Lys Val Asp Ile Lys	
1 5	
<210> 29	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 29	
ctggtttcac ctatagtttg cattcagaat tcggcgctt t	41
<210> 30	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 30	
catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatc	35
<210> 31	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 31	
gtagaggtct ctgttaaggt tcttgtgcga catag	35
<210> 32	
<211> 19	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	

<222> (1) .. (19)

<223> 重链可变区序列的信号序列如
原始图4中所示

<400> 32

Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (20)

<223> 轻链可变区序列的信号序列如
原始图5中所示

<400> 33

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 34

<211> 428

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34

atgggggtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggttcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc caggctccgg 180

caaggggctg gagtgggtgg cagttatatc atatgatgga aaataaatac tacgcagact 240

ccgtgaaggg ccgattcacc atctagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaagt 300

aacagccaga gctgaggaca cggtgtgta ttactgtgcg agagatcgag gtatatcagc 360

aggtggaata ctactactac tacggtatgg acgtctgggg gcaagggacc acggtcaccg 420

tctcctca 428

<210> 35

<211> 387

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 35

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct      300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccatt cactttcggc      360
cctgggacca aagtggatat caaacgt                                387

```

<210> 36

<211> 456

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (456)

<223> 戈利木单抗重链(HC)

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

	180					185					190						
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile		
	195					200					205						
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val		
	210					215					220						
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala		
225						230					235					240	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro		
	245					250					255						
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val		
	260					265					270						
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
	275					280					285						
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
	290					295					300						
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		
305						310					315					320	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala		
	325					330					335						
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro		
	340					345					350						
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr		
	355					360					365						
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
	370					375					380						
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
385						390					395					400	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr		
	405					410					415						
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe		
	420					425					430						
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys		
	435					440					445						
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
	450					455											

<210> 37

<211> 215

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (215)

<223> 戈利木单抗轻链(LC)

<400> 37

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70				75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro
				85				90					95		
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100				105					110			
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
			115				120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
			130				135					140			
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150				155					160	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170				175		
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185					190		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
			195				200					205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
			210			215									

<210> 38

<211> 126

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (126)

<223> 戈利木单抗重链可变区

<400> 38

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
		100						105					110		
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (111)

<223> 戈利木单抗轻链可变区

<400> 39

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70				75				80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro

				85					90					95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	
			100					105					110		
<210>	40														
<211>	5														
<212>	PRT														
<213>	智人 (Homo sapiens)														
<220>															
<221>	尚未归类的特征														
<222>	(1) .. (5)														
<223>	戈利木单抗重链互补决定区1														
	(CDRH1)														
<400>	40														
Ser	Tyr	Ala	Met	His											
1				5											
<210>	41														
<211>	17														
<212>	PRT														
<213>	智人 (Homo sapiens)														
<220>															
<221>	尚未归类的特征														
<222>	(1) .. (17)														
<223>	戈利木单抗抗体重链互补决定区														
	2 (CDRH2)														
<400>	41														
Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															
<210>	42														
<211>	17														
<212>	PRT														
<213>	智人 (Homo sapiens)														
<220>															
<221>	尚未归类的特征														
<222>	(1) .. (17)														
<223>	戈利木单抗重链互补决定区3														
	(CDRH3)														
<400>	42														
Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp

1	5	10	15
Val			
<210>	43		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	智人 (Homo sapiens)		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(1) .. (11)		
<223>	戈利木单抗轻链互补决定区1 (CDRL1)		
<400>	43		
Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr Leu Ala			
1	5	10	
<210>	44		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	智人 (Homo sapiens)		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(1) .. (7)		
<223>	戈利木单抗轻链互补决定区2 (CDRL2)		
<400>	44		
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr			
1	5		
<210>	45		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	智人 (Homo sapiens)		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(1) .. (10)		
<223>	戈利木单抗轻链互补决定区3 (CDRL3)		
<400>	45		
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr			
1	5	10	

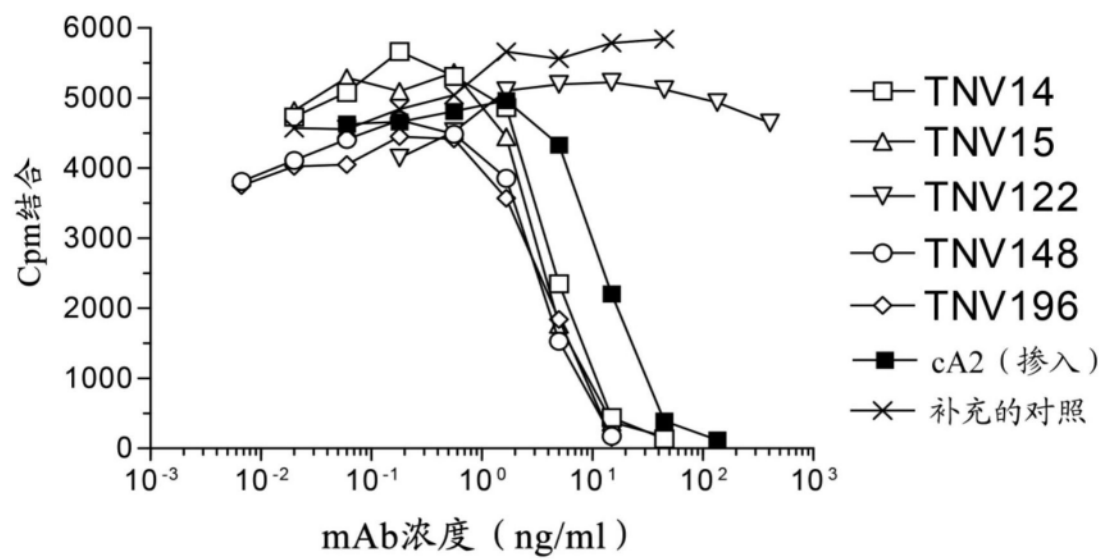


图1

TNVs	<u>ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGA</u>	
种系	Q V Q L V E S G G G V CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG	
TNVs	GGTGTCCAGTGT.....	
TNV148 (B)	GGTGTCCAGTGT.....A.....	
种系	V Q P G R S L R L S C A A S G GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA	
TNVs		
种系	F T F S <u>S Y A M H</u> W V R Q A P TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA	
TNV14, 15		
TNV148 (B)	T.....	
TNV196	C.....	
种系	G K G L E W V A <u>V I S Y D G S</u> GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC	
TNV14	A...C.T.....T	
TNV15	T.....T.....T	
TNV148 (B)	C.....T...G.....	
TNV196	T.....	
种系	<u>N K Y Y A D S V K G</u> R F T I S	SEQ ID NO:7
TNV14	.GC...A.G....G.....A.....	SEQ ID NO:34
TNV15	..C...A.G.....C.....	
TNV148 (B)	A.G.....	
TNV196	A.G.C.....G.....	

图2A

	R D N S K N T L Y L Q M N S L	
种系	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG	
TNV14		
TNV15	G.....	
TNV148	C.....	
TNV148B		
TNV196	T.....	
	R A E D T A V Y Y C A R	
种系	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
TNV14,15	GATCGAGGT	
TNV148 (B)	A	
TNV196	T.....	
	<u>Y Y Y Y Y G M D V</u> W	
种系	TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG	
TNV14	ATATCAGCAGGTGGAA.....	
TNV15	G.C.....A.T..T.....	
TNV148 (B)	...G.....A.....	
TNV196	..TGG.....A.....	
	G Q G T T V T V S S	SEQ ID NO:7
种系	GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG	SEQ ID NO:34
TNV14	..C.....	
TNV15	..C.....	
TNV148 (B)	..C.....	
TNV196	..C..G.....	

图2B

TNVs	<u>ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC</u>
种系	E I V L T Q S P A T
TNVs	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC CCAGATACCACCGGA.....
种系	L S L S P G E R A T L S C <u>R A</u>
TNVs	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
种系	<u>S Q S V S S Y L A</u> W Y Q Q K P
TNV14,15	AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV148,196	TA.....
种系	G Q A P R L L I Y <u>D A S N R A</u>
TNVs	GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
种系	<u>T</u> G I P A R F S G S G S G T D
TNVs	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
种系	F T L T I S S L E P E D F A V
TNVs	TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT
种系	Y Y C <u>Q Q R S N W P P F T</u> F G SEQ
ID NO:35	ID NO:8
TNVs	TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTTCGGC SEQ A.....
种系	P G T K V D I K R
TNVs	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT

图3

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

图4

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

图5

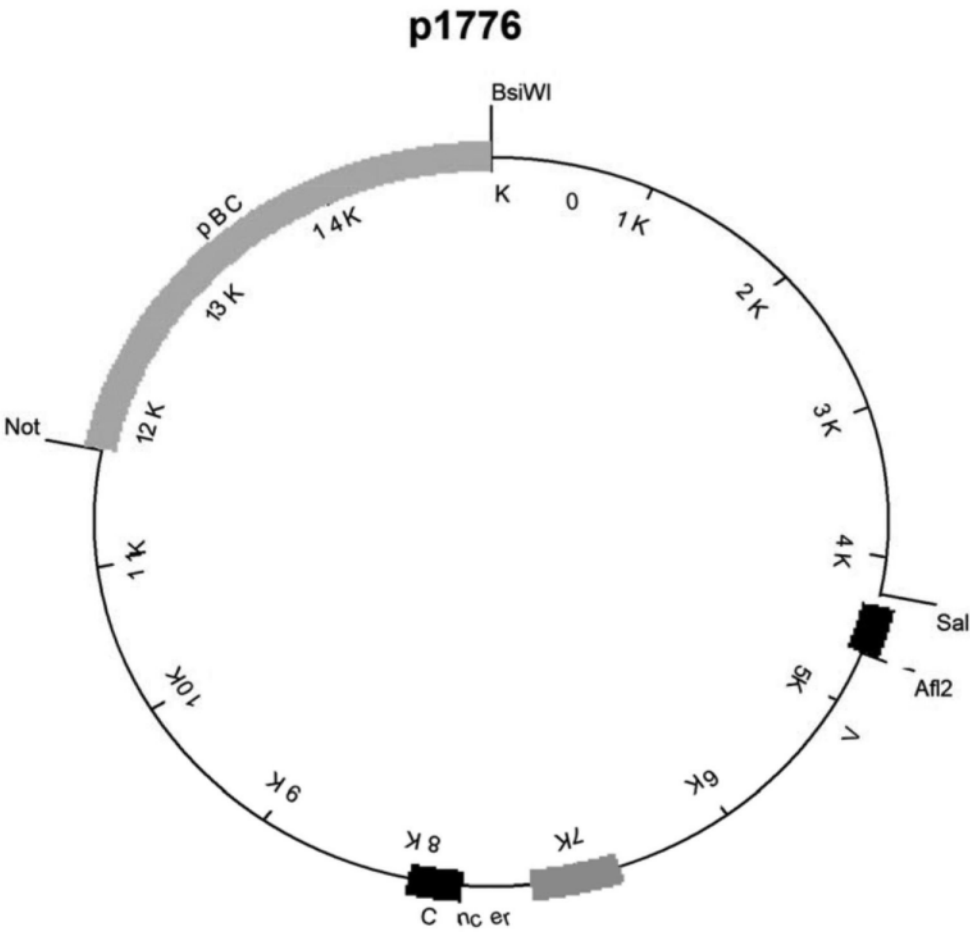


图6

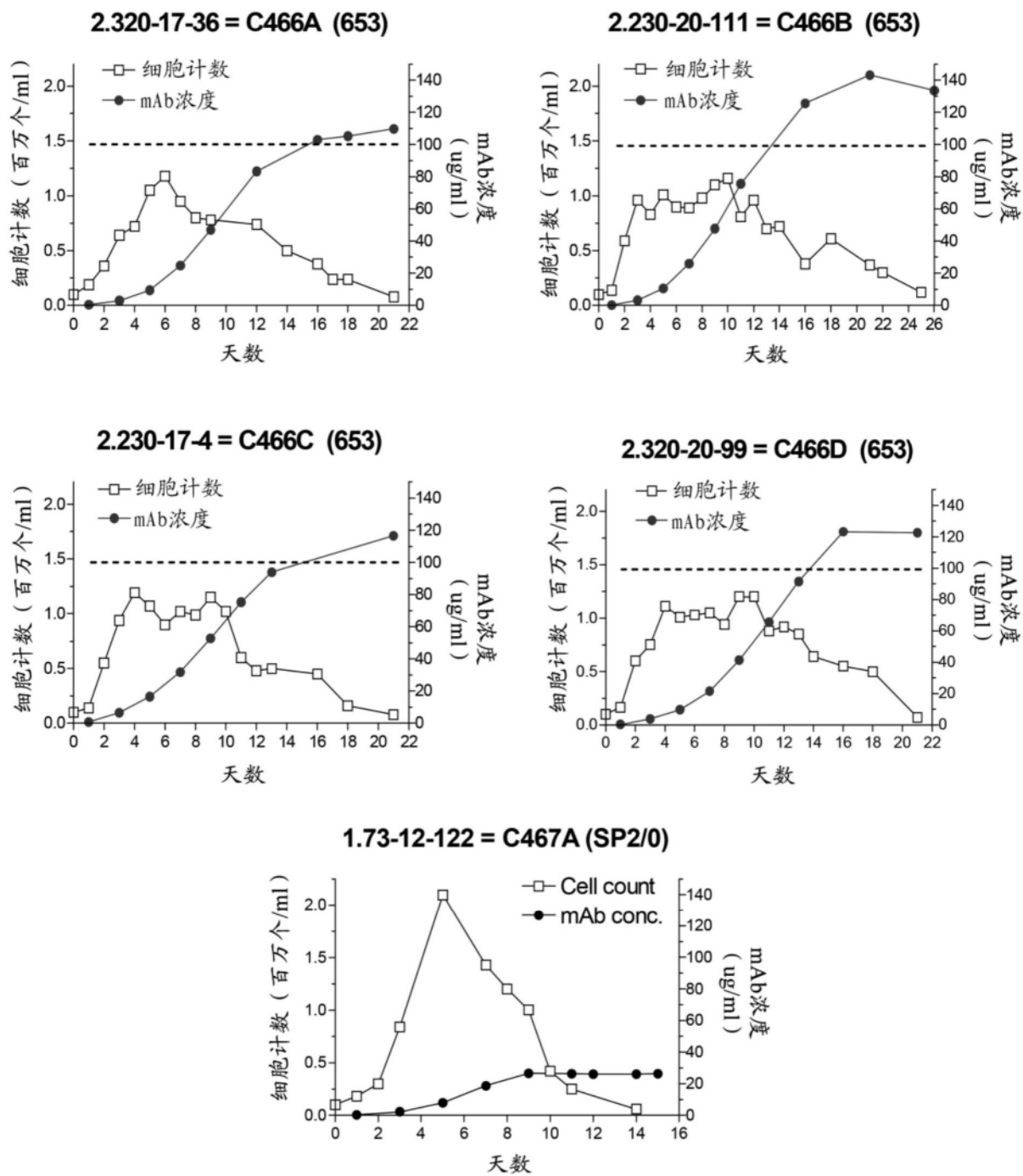


图7

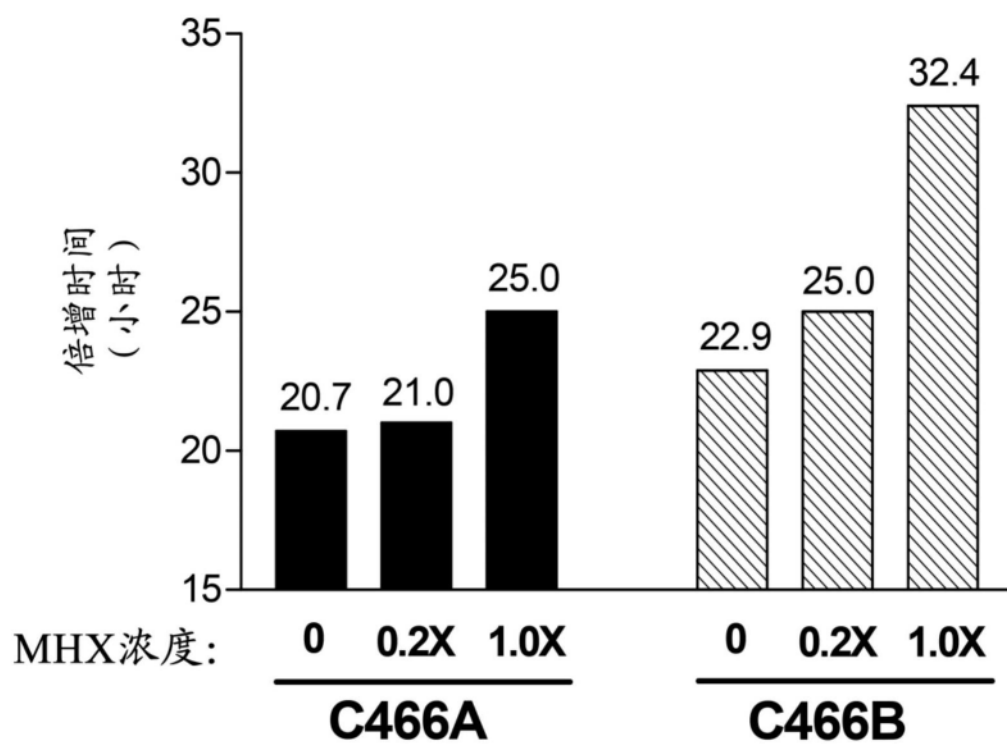


图8

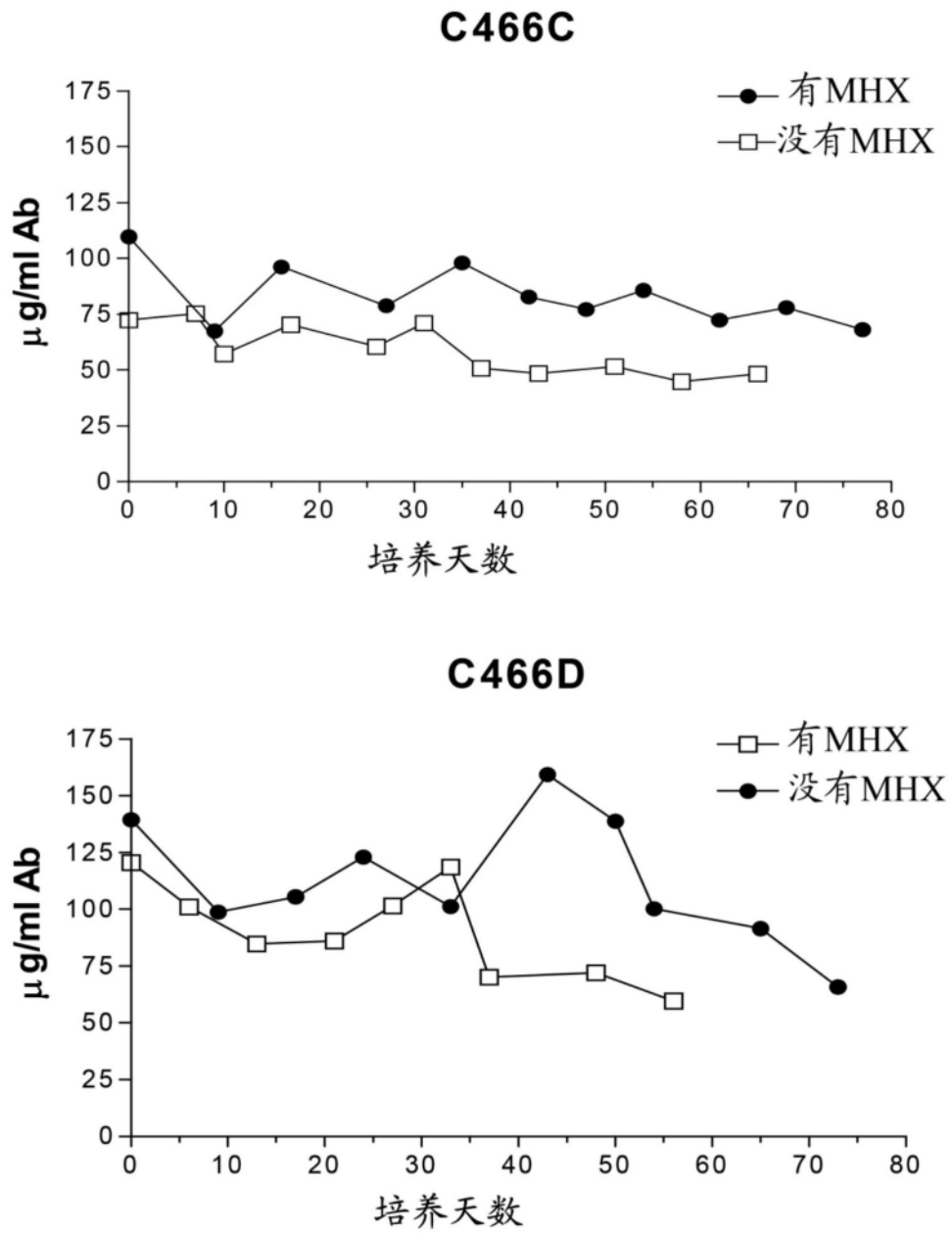


图9

相对于基线的体重变化

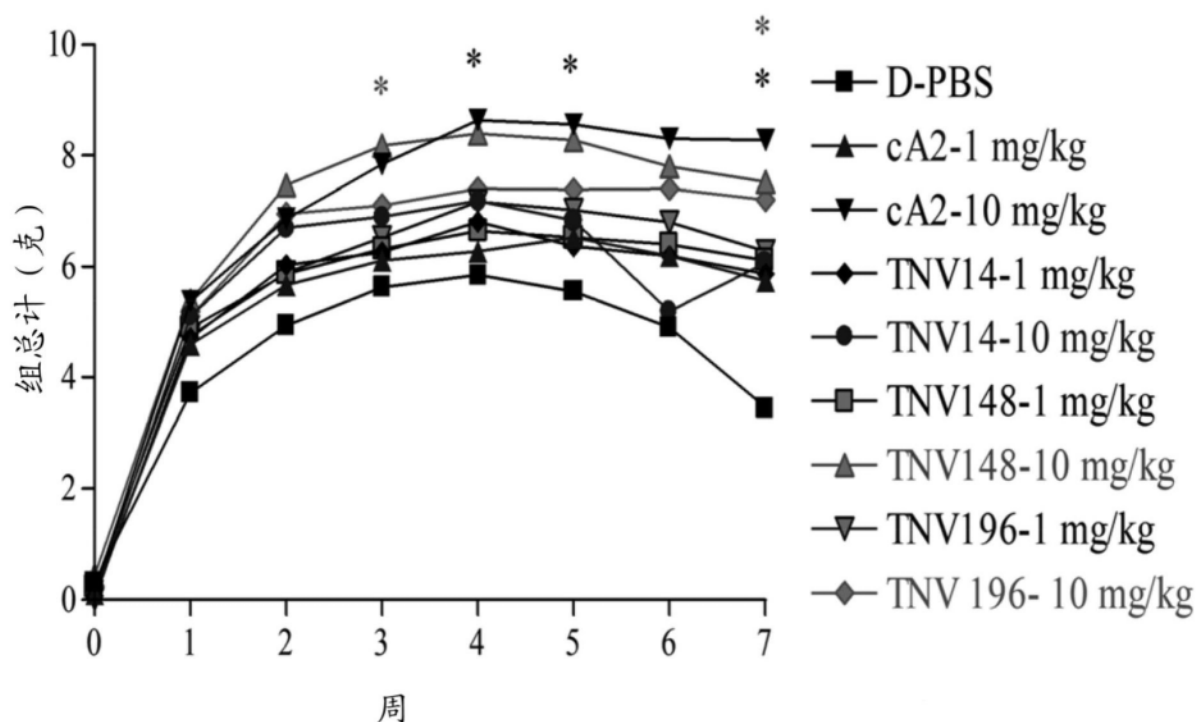
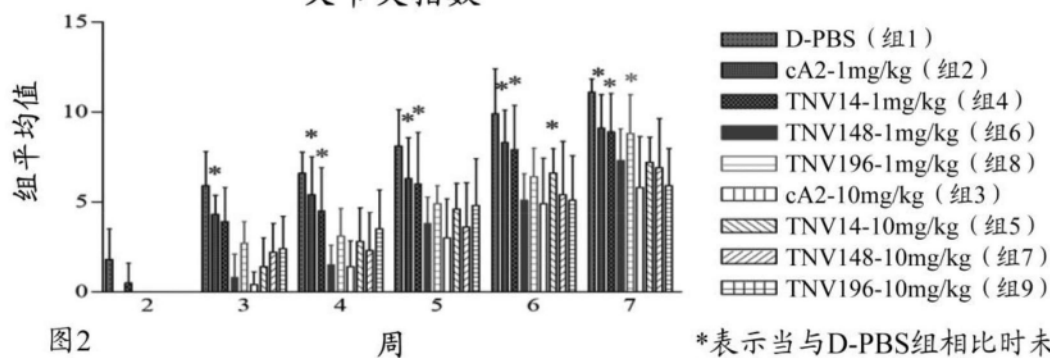


图10

关节炎指数



*表示当与D-PBS组相比时未显著降低的组。

所有未标记的组都是显著的 ($p < 0.050$)。

图11A

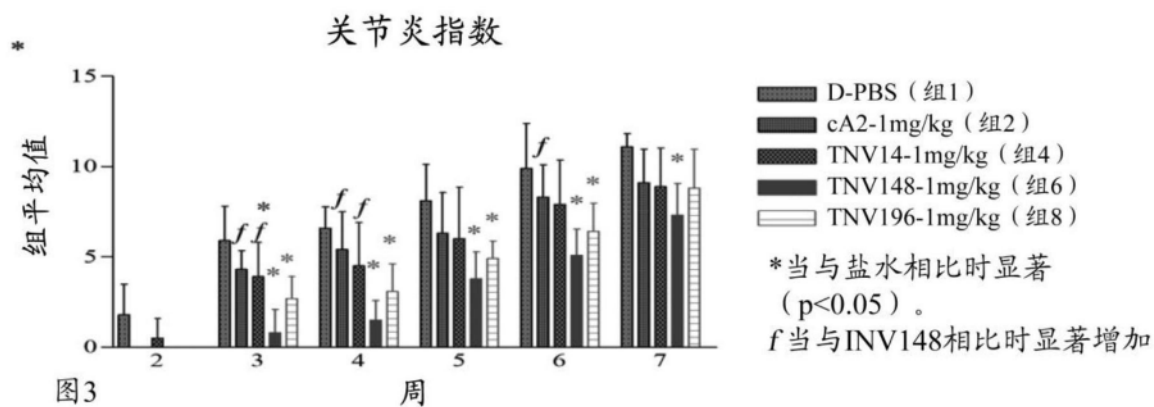


图11B

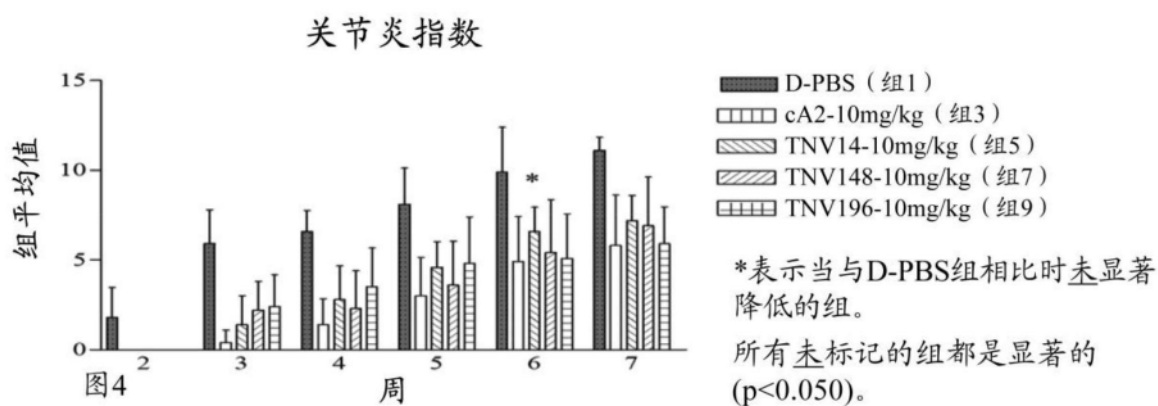


图11C

体重变化 (组平均值)

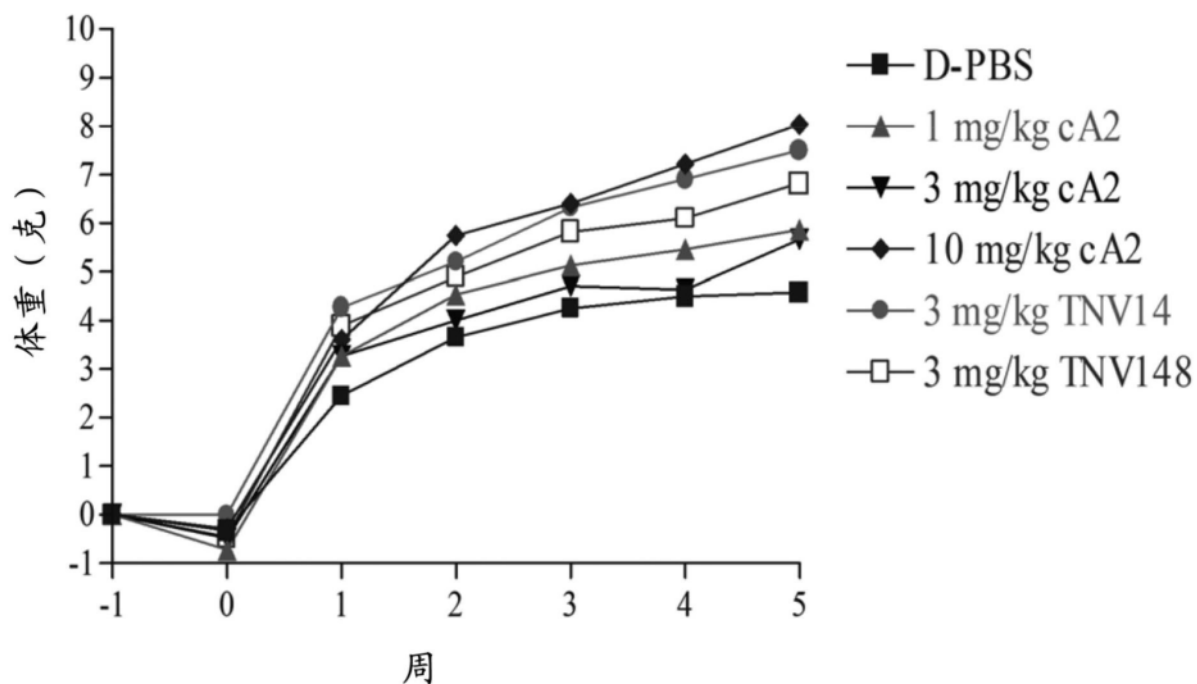


图12

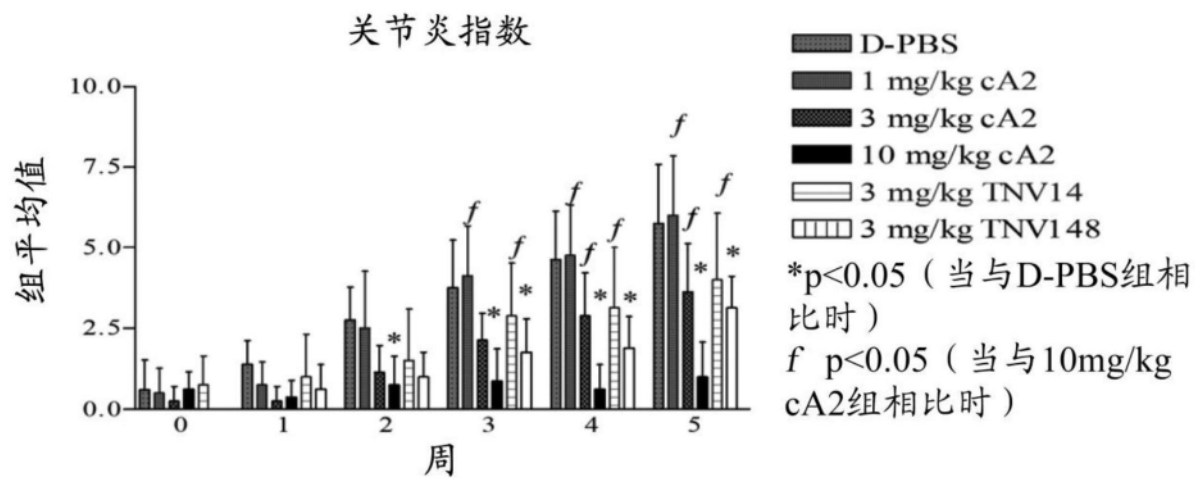


图13A

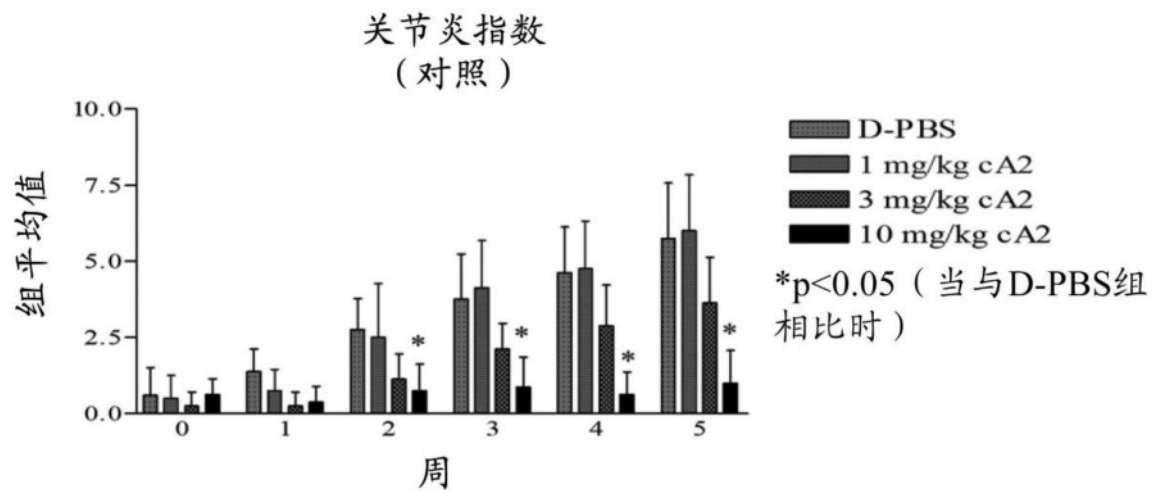


图13B

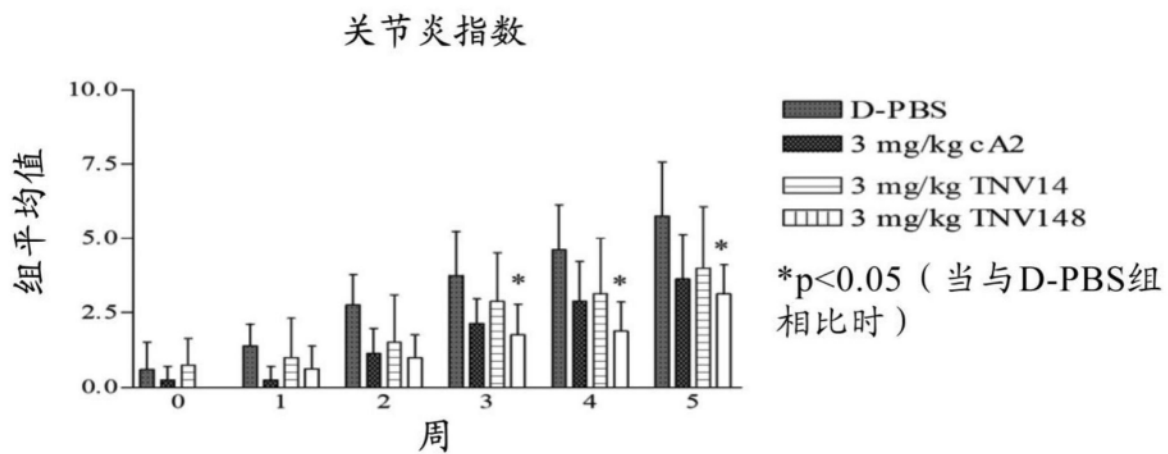


图13C

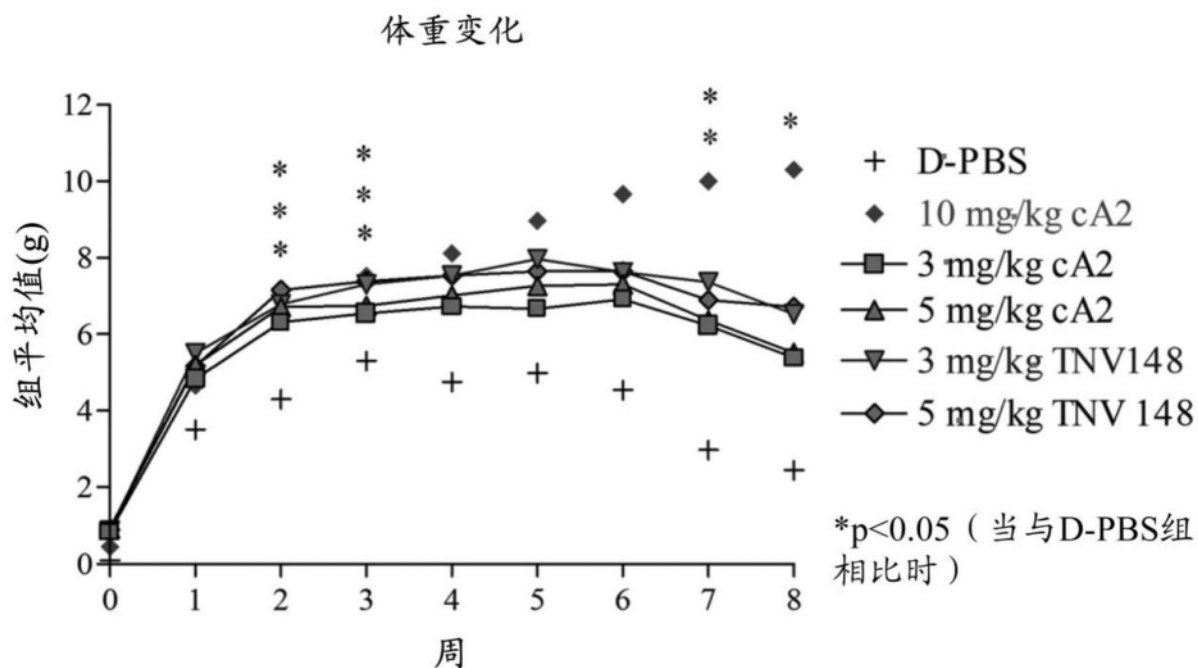


图14

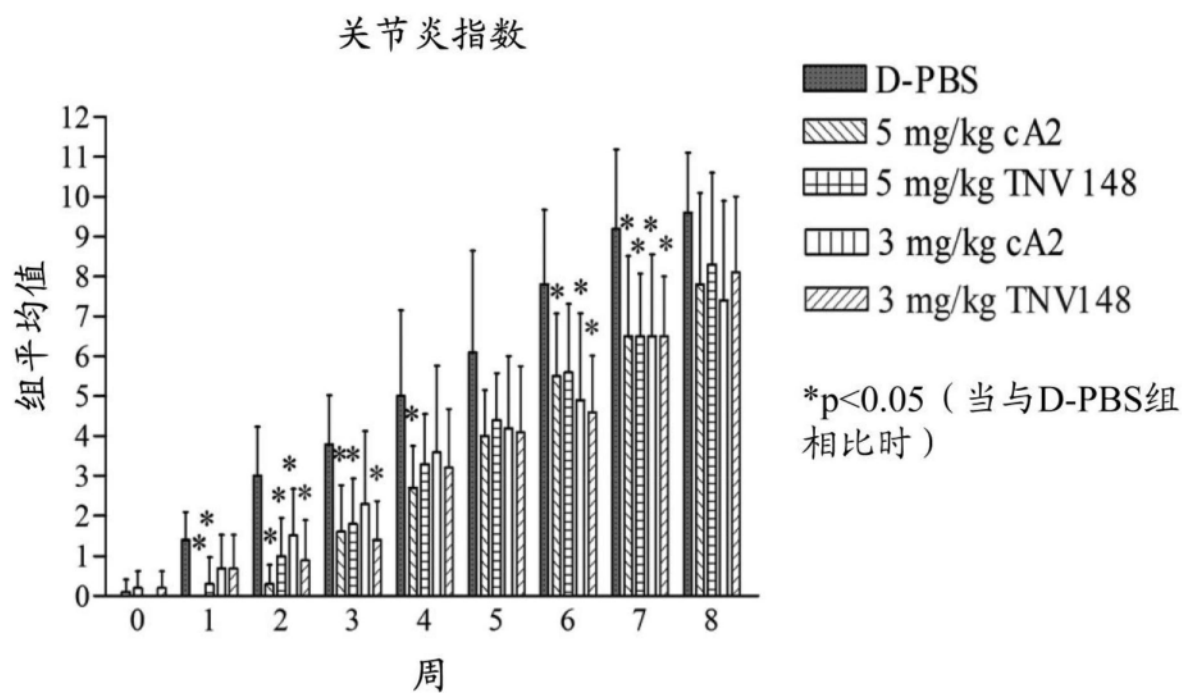


图15

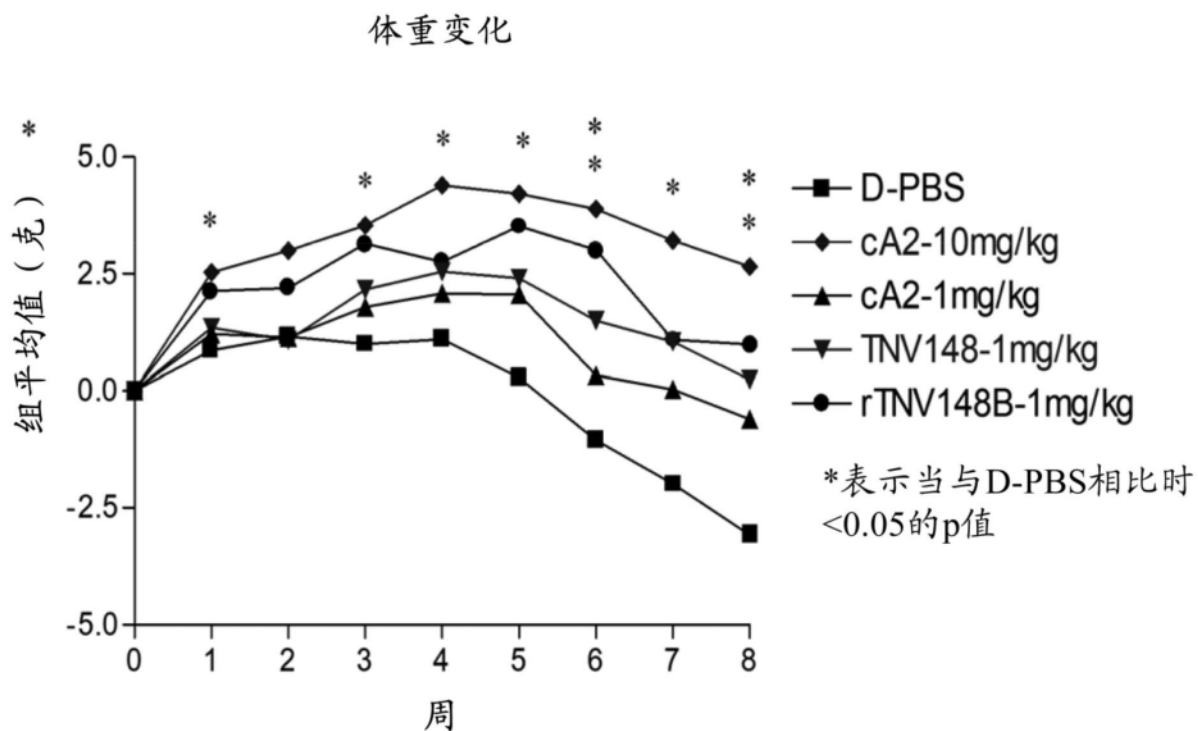


图16

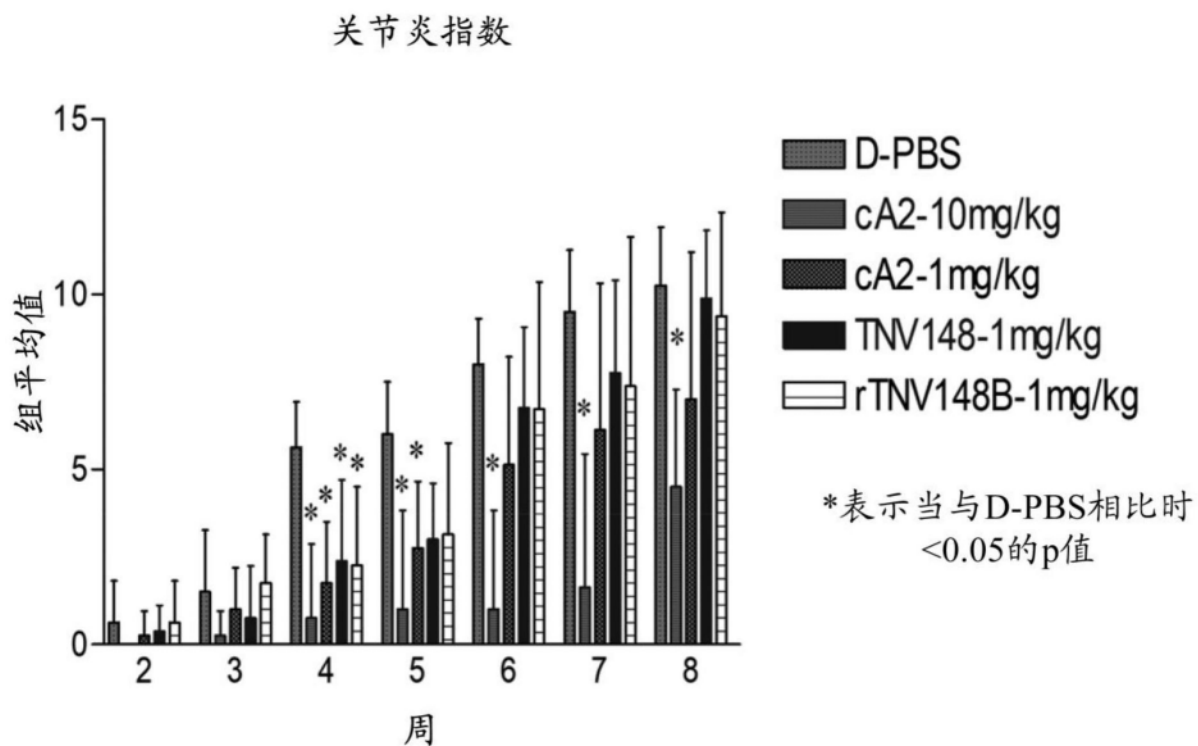


图17

研究的示意概览

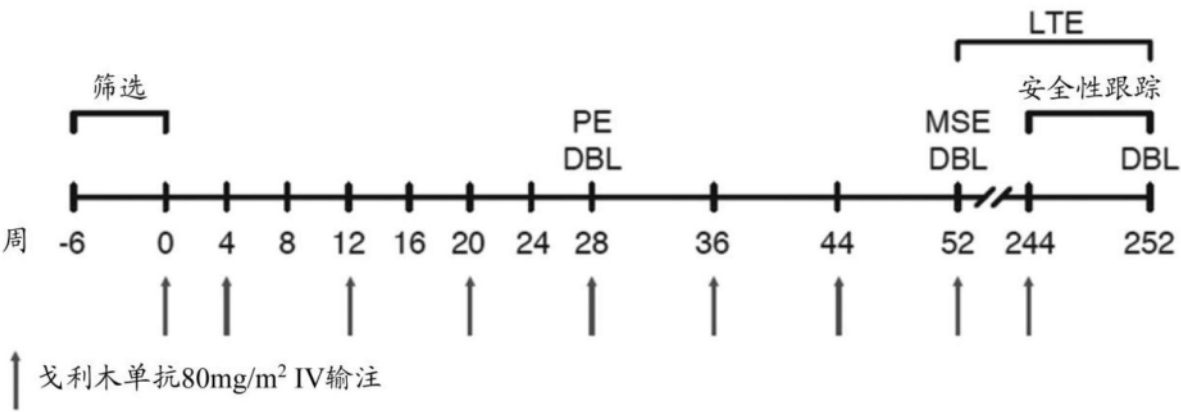


图18

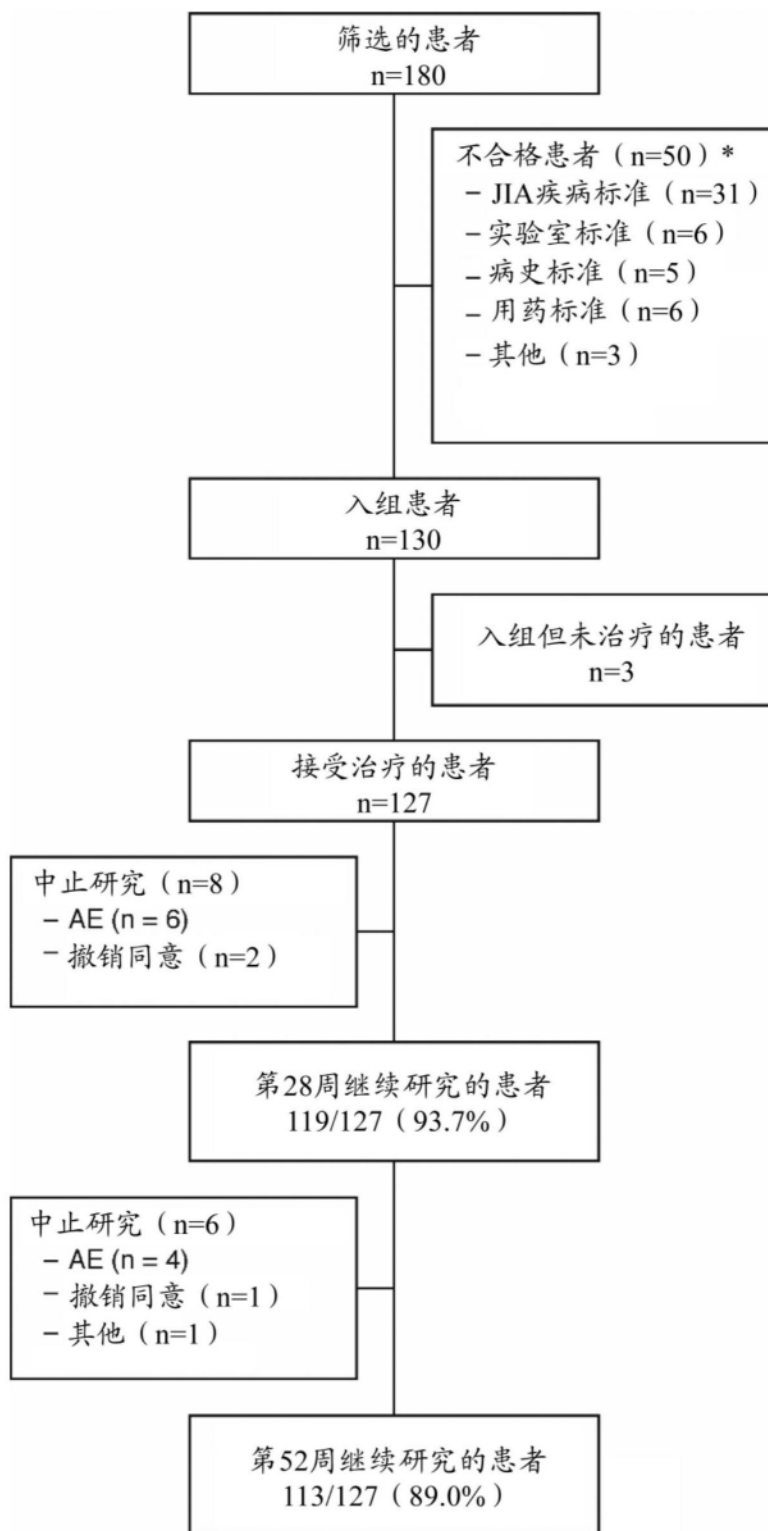


图19

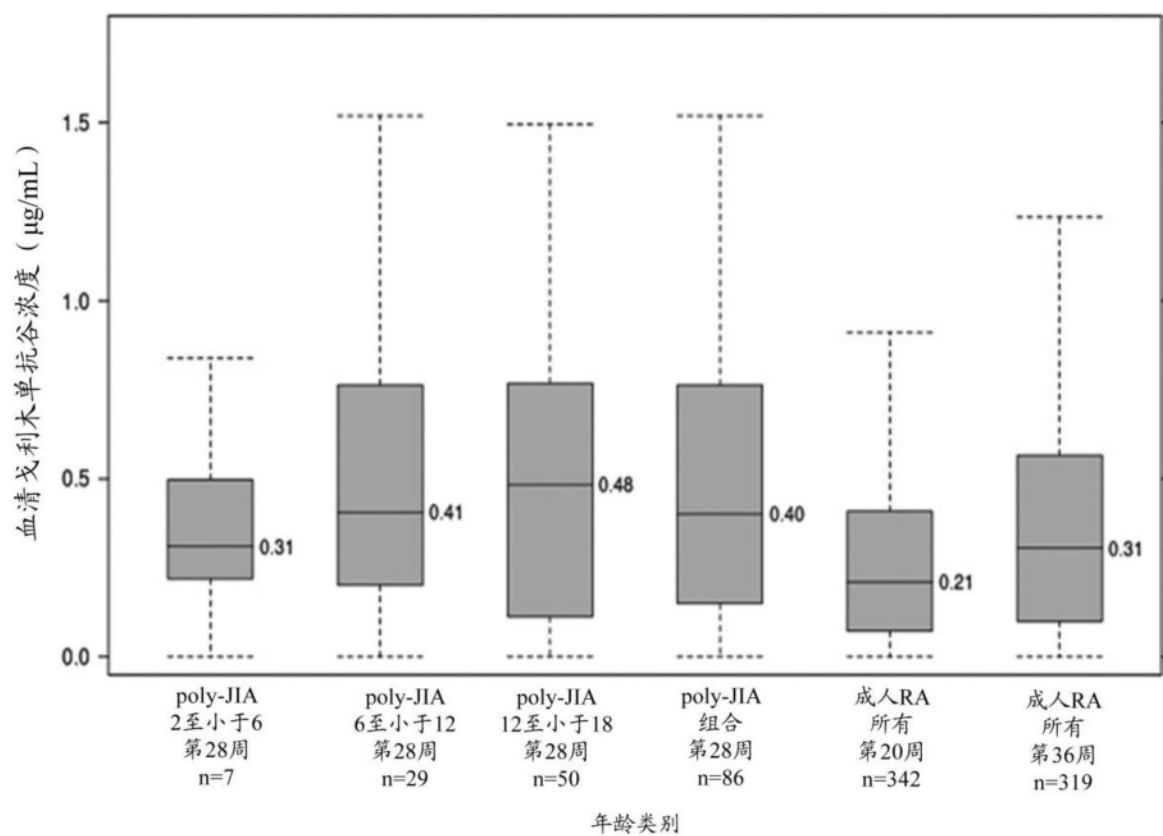


图20A

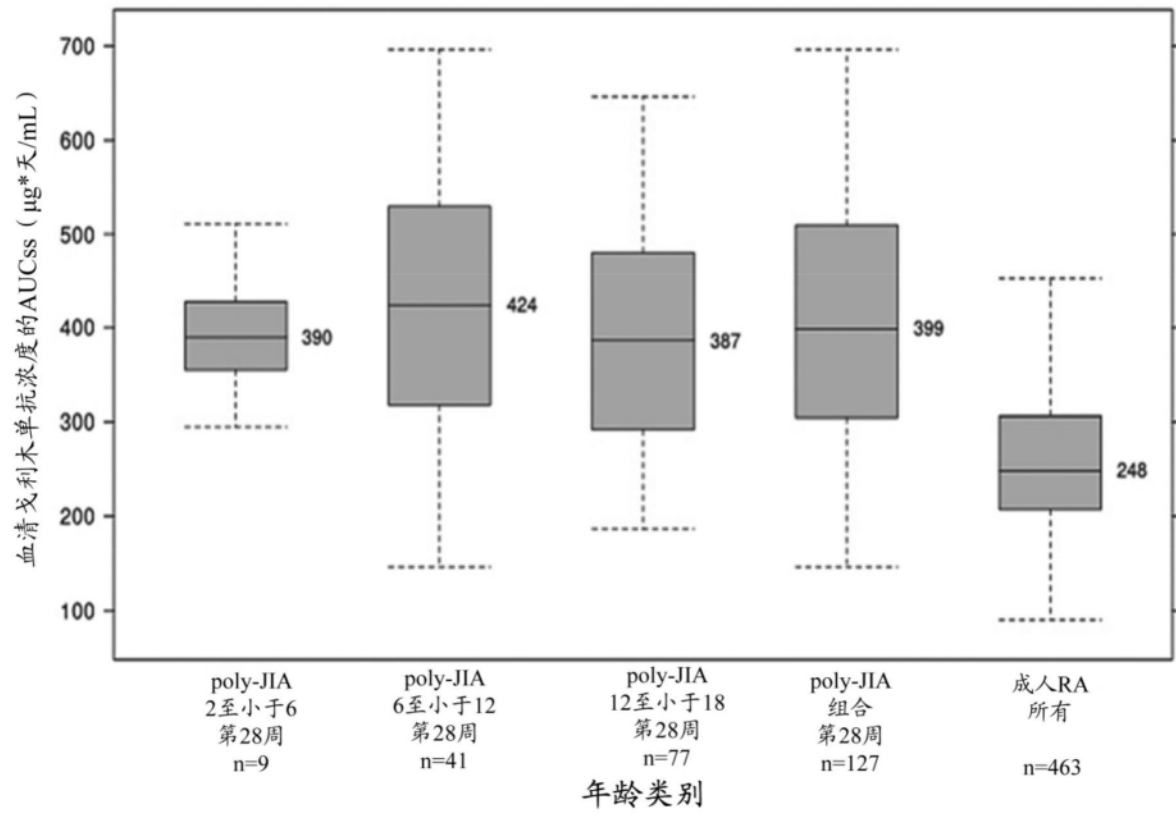
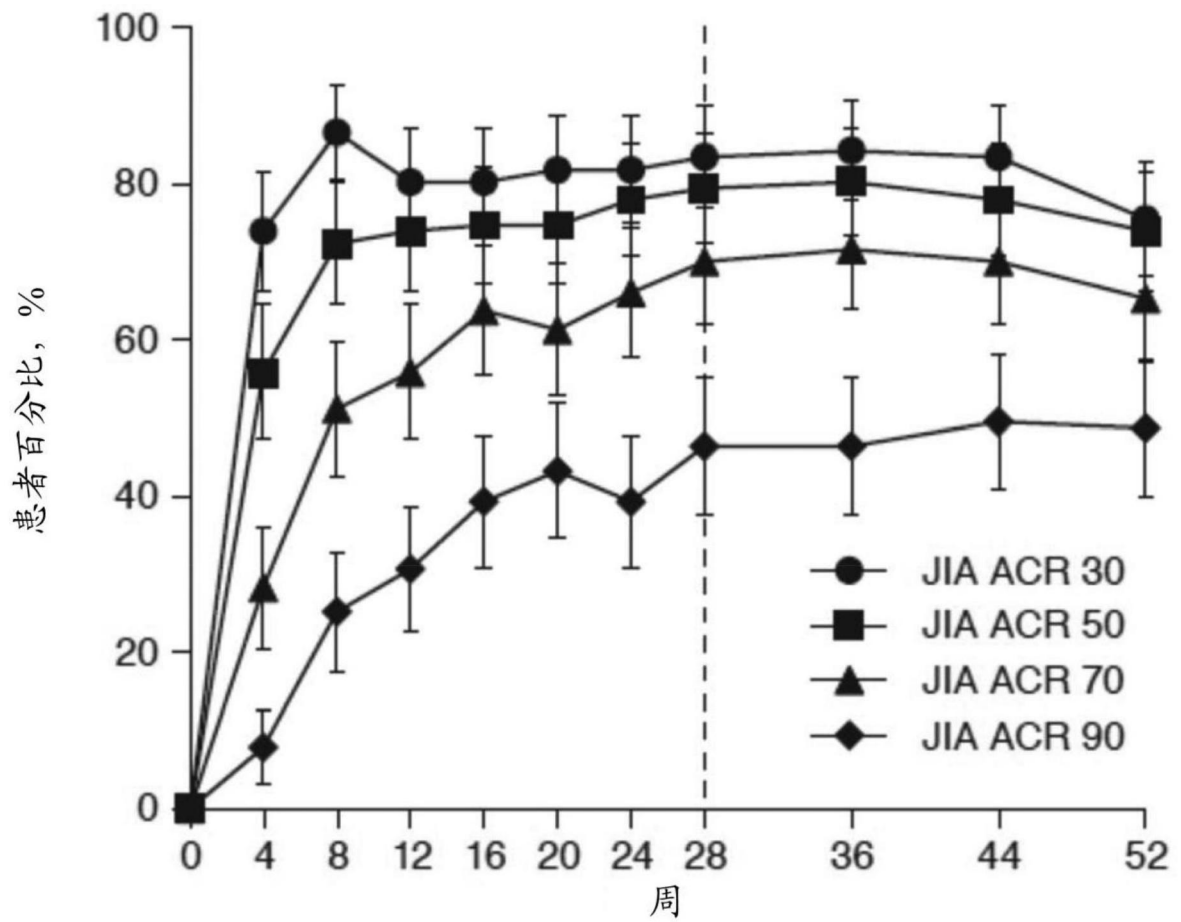


图20B



ACR 30 %	0	74.0	86.6	80.3	80.3	81.9	81.9	83.5	84.3	83.5	75.6
ACR 50 %	0	55.9	72.4	74.0	74.8	74.8	78.0	79.5	80.3	78.0	74.0
ACR 70 %	0	28.3	51.2	55.9	63.8	61.4	66.1	70.1	71.7	70.1	65.4
ACR 90 %	0	7.9	25.2	30.7	39.4	43.3	39.4	46.5	46.5	49.6	48.8

图21A

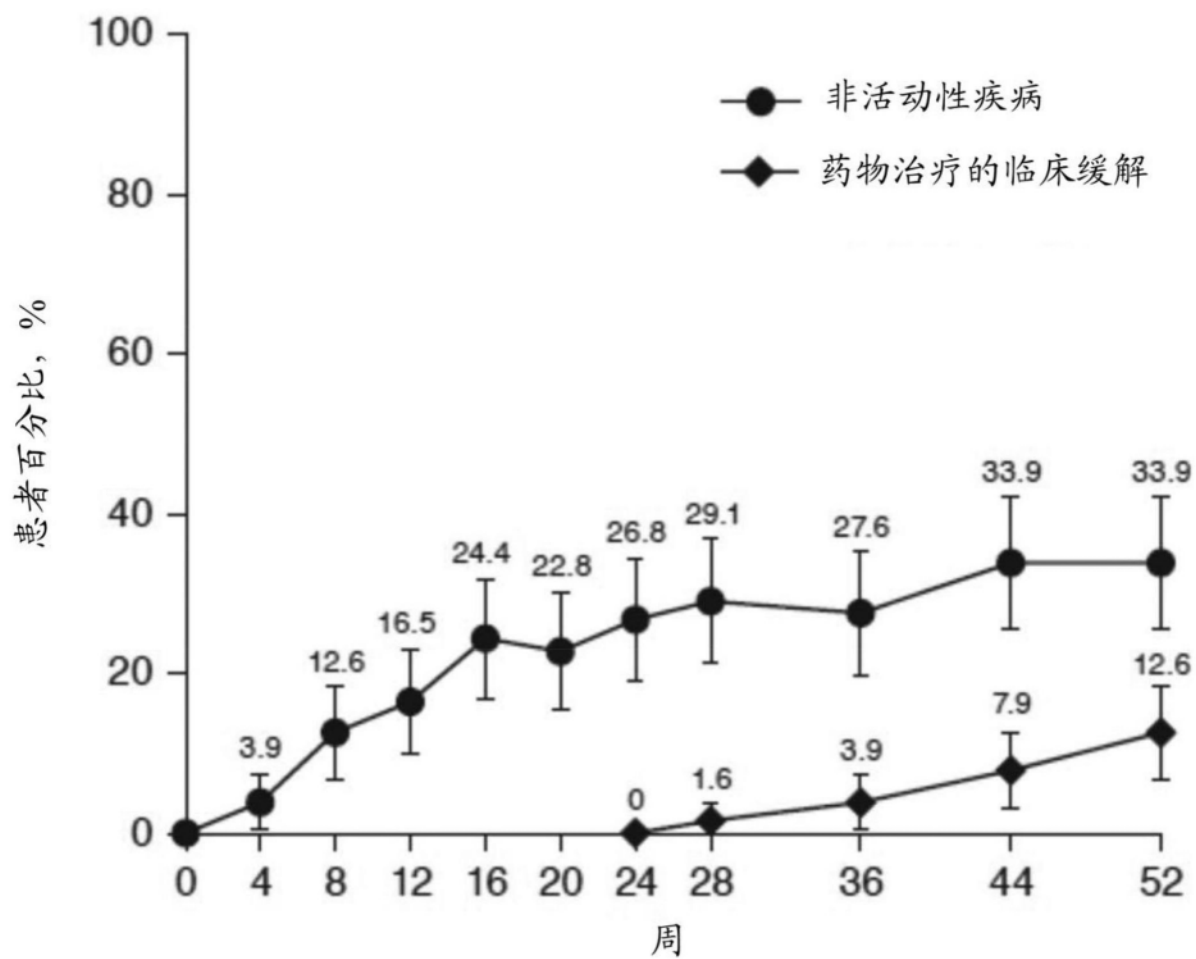


图21B

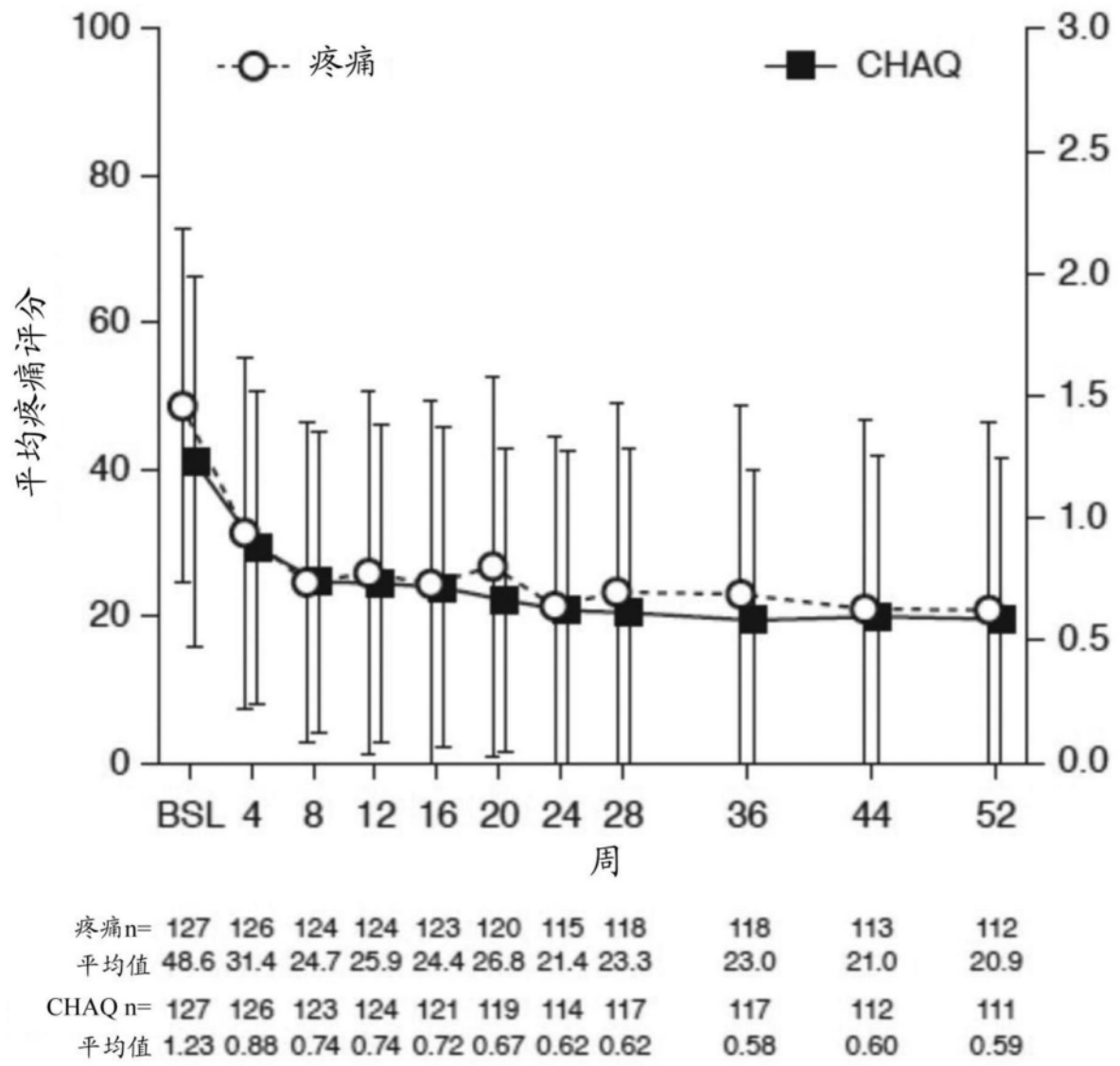


图21C

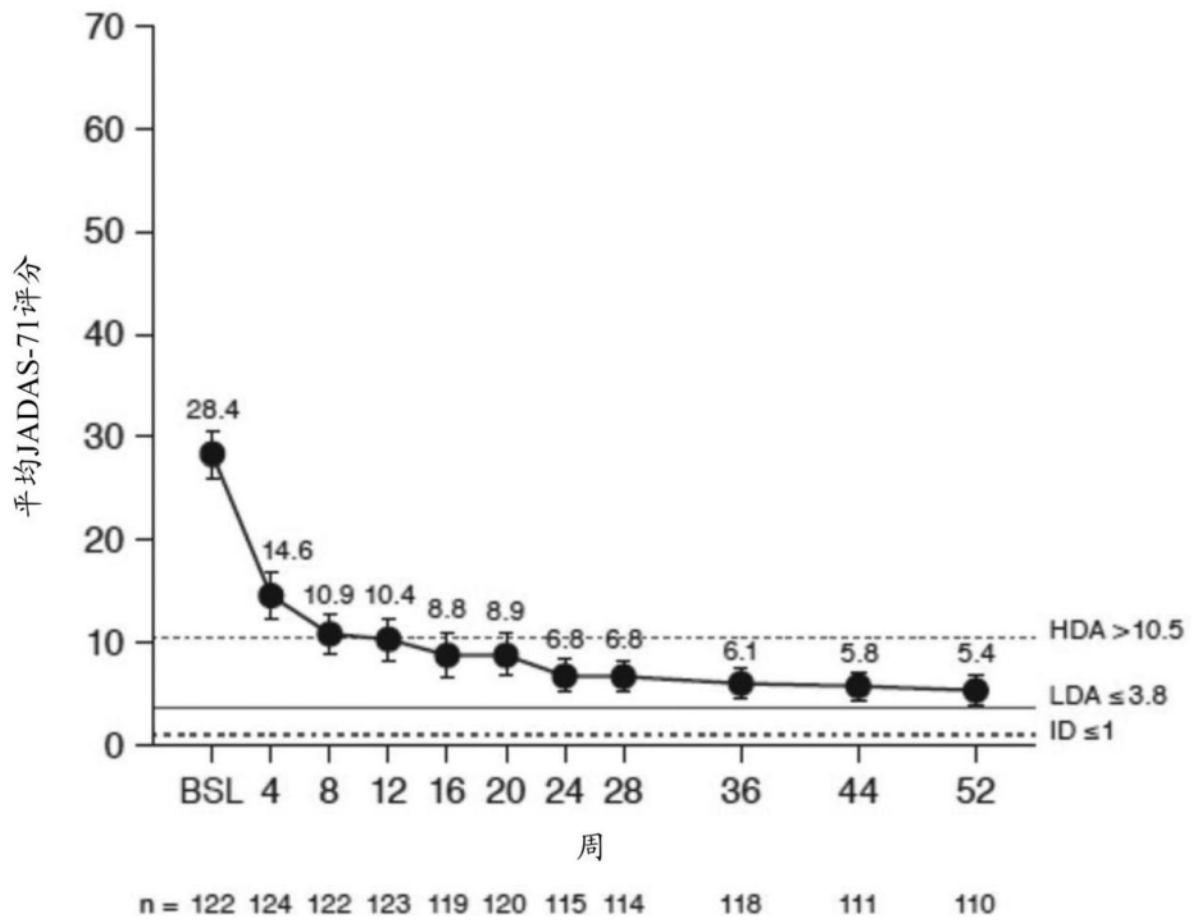


图21D