

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0038148
(43) 공개일자 2024년03월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/635 (2014.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
A61K 31/4706 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7008469(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년11월16일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2019-7025805
원출원일자(국제) 2017년11월16일
심사청구일자 2020년10월07일
- (85) 번역문제출일자 2024년03월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/061953
- (87) 국제공개번호 WO 2018/147915
국제공개일자 2018년08월16일
- (30) 우선권주장
62/455,651 2017년02월07일 미국(US)
- (71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브 800/850
- (72) 발명자
해리슨 다이앤 디.
미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥킨 로드 1400
샤 엘리자베스 씨.
미국 19477 펜실베이니아주 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한성

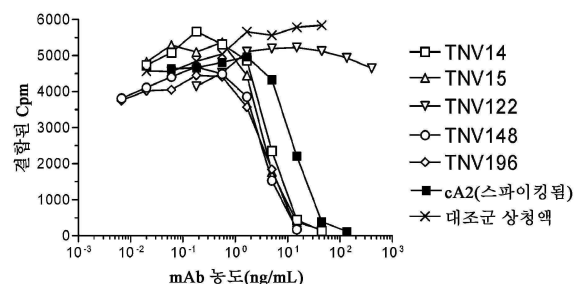
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 활성 강직성 척추염의 치료를 위한 항-TNF 항체, 조성물, 및 방법

(57) 요약

본 발명은, 활성 강직성 척추염(AS)의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 항-TNF 항체를 이용하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/635 (2020.08)

A61P 19/02 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김 리-리안

미국 19477 펜실베이니아주 스프링 하우스 매킨 로드
1400

로 김 홍

미국 19477 펜실베이니아주 스프링 하우스 매킨 로드
1400

명세서

청구범위

청구항 1

활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하며, IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 활성 강직성 척추염(AS)의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 항-TNF 항체를 이용하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TNF 알파는 17 kD 단백질 서브유닛의 가용성 동종삼량체이다. 막-결합된 26 kD 전구체 형태의 TNF가 또한 존재한다.

[0003] 단핵구 또는 대식세포 이외의 세포 또한 TNF 알파를 생산한다. 예를 들어, 인간 비-단핵구성 종양 세포주는 TNF 알파 및 CD4⁺ 및 CD8⁺ 말초 혈액 T 림프구를 생산하며, 일부 배양된 T 및 B 세포주 또한 TNF 알파를 생산한다.

[0004] TNF 알파는 연골 및 뼈의 분해와 같은 조직 손상, 부착 분자의 유도, 혈관 내피 세포에 대한 응혈촉진 활성 유도, 호중구 및 림프구의 부착의 증가, 및 대식세포, 호중구, 및 혈관 내피 세포로부터의 혈소판 활성화 인자의 방출의 자극을 유발하는 염증 촉진 작용을 야기한다.

[0005] TNF 알파는 감염, 면역 장애, 신생물 병리학, 자가면역 병리학, 및 이식편-대-숙주 병리학과 관련되어 있다. TNF 알파와 암 및 감염성 병리학의 연계는 종종 숙주의 이화 상태와 관련된다. 암 환자는 일반적으로 거식증과 관련된 체중 감소를 겪는다.

[0006] 암 및 다른 질환과 관련된 광범위한 소모는 "악액질"로 알려져 있다. 악액질은 악성 성장에 반응하는 진행성 체중 감소, 거식증, 및 체지방 체중(lean body mass)의 지속적인 감소를 포함한다. 악액질 상태는 많은 암 이환율 및 사망률을 야기한다. TNF 알파가 암, 감염성 병리학, 및 다른 이화 상태에서 악액질에 관여한다는 증거가 있다.

[0007] TNF 알파는 발열, 권태감, 거식증, 및 악액질을 포함하는 그램-음성 패혈증 및 내독소 쇼크(endotoxic shock)에서 중심 역할을 하는 것으로 여겨진다. 내독소는 TNF 알파 및 다른 사이토카인의 단핵구/대식세포 생산 및 분비를 강력하게 활성화한다. TNF 알파 및 다른 단핵구-유래 사이토카인은 내독소에 대한 대사 및 신경호르몬 반응을 매개한다. 인간 지원자에 대한 내독소 투여는 발열, 빈맥, 증가된 대사 속도, 및 스트레스 호르몬 방출을 포함하는 플루형 증상을 동반하는 급성 질병을 유발한다. 그램-음성 패혈증을 앓고 있는 환자에서는 순환 TNF 알파가 증가한다.

[0008] 따라서, TNF 알파는 염증성 질환, 자가면역 질환, 바이러스, 박테리아, 및 기생충 감염, 악성종양, 및/또는 신경퇴행성 질환에 연루되어 있으며, 류마티스 관절염 및 크론병과 같은 질환에서 특이적 생물학적 요법에 대한 유용한 표적이다. TNF 알파에 대한 키메라 단클론 항체(cA2)를 이용하는 개방-표지 시험에서의 유익한 효과가 염증의 억제 및 류마티스 관절염 및 크론병에서의 재발 후 성공적인 재치료와 함께 보고되었다. cA2를 이용하는 무작위 이중-맹검 위약-대조 시험에서의 유익한 결과가 또한 염증의 억제와 함께 류마티스 관절염에서 보고되었다.

[0009] 다른 연구자들은 시험관내에서 중화 활성을 가진 재조합 인간 TNF에 특이적인 mAb를 기재하였다. 이들 mAb 중 일부를 사용하여 인간 TNF의 에피토프를 맵핑하고, 효소 면역검정을 개발하고, 재조합 TNF의 정제를

보조하였다. 그러나, 이들 연구는 면역원성, 낮은 특이성, 및/또는 약제학적 부적합성으로 인해 인간에서 생체 내 진단 또는 치료 용도를 위해 사용될 수 있는 TNF 중화 항체를 생산하기 위한 기초를 제공하지 않는다.

[0010] 인간 이외의 포유류에서 TNF에 대한 중화 항혈청 또는 mAb는 실험적 내독소혈증 및 균혈증에서 유해한 생리학적인 변화를 제거하고 치명적인 켈린지 후의 사망을 예방하는 것으로 나타났다. 이러한 효과는, 예를 들어 설치류 치사 검정 및 영장류 병리학 모델 시스템에서 입증되었다.

[0011] hTNF의 추정 수용체 결합 좌위(receptor binding loci)가 개시되어 있으며, TNF의 아미노산 11 내지 13, 37 내지 42, 49 내지 57, 및 155 내지 157로 이루어진 TNF 알파의 수용체 결합 좌위가 개시되어 있다.

[0012] 인간외 포유류, 키메라, 다클론(예를 들어, 항-혈청) 및/또는 단클론 항체(Mab) 및 단편(예를 들어, 이의 단백질 분해 또는 융합 단백질 생성물)은 일부 경우에 소정의 질환을 치료하고자 시도하기 위해 조사되고 있는 잠재적인 치료제이다. 그러나, 그러한 항체 또는 단편은 인간에게 투여될 때 면역 반응을 유도할 수 있다. 그러한 면역 반응은 순환으로부터의 항체 또는 단편의 면역 복합체-매개 제거(immune complex-mediated clearance)를 유발하고, 반복된 투여가 요법에 부적합하게 만들 수 있으므로, 환자에 대한 치료 이익을 감소시키고 항체 또는 단편의 재투여를 제한할 수 있다. 예를 들어, 인간외 부분을 포함하는 항체 또는 단편의 반복된 투여는 혈청병 및/또는 아나필락시스로 이어질 수 있다. 이들 및 다른 문제를 피하기 위하여, 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 키메라화 및 인간화를 포함하는, 그러한 항체 및 이의 부분의 면역원성을 감소시키기 위한 다수의 접근법이 취해졌다. 그러나, 이들 및 다른 접근법은 여전히 일부 면역원성, 낮은 친화도, 낮은 결합활성을 갖거나, 세포 배양, 스케일 업(scale up), 생산, 및/또는 낮은 수율의 문제를 갖는 항체 또는 단편을 유발할 수 있다. 따라서, 그러한 항체 또는 단편은 치료 단백질로서 제조 또는 사용하기에 이상적으로 적합하지 못할 수 있다.

[0013] 따라서, 하나 이상의 이러한 문제를 극복하는 항-TNF 항체 또는 단편의 제공과 더불어, 알려진 항체 또는 이의 단편에 대한 개선이 필요하다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0015] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 제0주 및 제4주에, 그리고 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) 정맥내(IV) 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0016] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항체는 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되며, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0017] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0018] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 제0주 및 제4주에, 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0019] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC)

및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학 적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 메토티렉세이트(MTX), 설파살 라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 상기 조성물은 IV를 통해 투여되며, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0020] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0021] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 제0주 및 제4주에, 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0022] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 상기 조성물은 제0주 및 제4주에, 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되며, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한다.

[0023] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 4 주 또는 치료의 2 주에 조성물로 치료한 환자는 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성하며, 본 방법은 상기 (a) 투여하는 단계 전에, 동시에, 또는 후에, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류마티스제, 근육 이완제, 안정제, 비스테로이드 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 항정신병제, 자극제, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입용 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토카인, 또는 사이토카인 길항제 중 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 단백질의 유효량을 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0024] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: 베스 강직성 척추염 기능 지수(BASFI) = -2.4 ± 2.1 표준 편차(SD), 베스 강직성 척추염 계측 지수(BASMI) = -0.4 ± 0.6 SD, 36-항목 단축-양식 건강 조사 신체요소 개요(SF-36 PCS) = 8.5 ± 7.5 SD, 36-항목 단축-양식 건강 조사 정신요소 개요(SF-36 MCS) = 6.5 ± 9.1 SD, 및 강직성 척추염 삶의 질(ASQoL) = -5.4 ± 5.0 SD.

[0025] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 제0주 및 제4주에, 그리고 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) 정맥내(IV) 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0026] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF

항체는 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 투여되며, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0027] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0028] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 제0주 및 제4주에, 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0029] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 조성물은 IV 주입을 통해 투여되며, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0030] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0031] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 제0주 및 제4주에, 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0032] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 투여되고, 여기서 조성물은 IV 주입을 통해 투여되며, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성한다: BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SD.

[0033] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투

여되고, 여기서 치료의 제16주에 항-TNF 항체로 치료한 환자는 BASFI = -2.4 ± 2.1 SD, BASMI = -0.4 ± 0.6 SD, SF-36 PCS = 8.5 ± 7.5 SD, SF-36 MCS = 6.5 ± 9.1 SD, 및 ASQoL = -5.4 ± 5.0 SDA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기준의 기준선으로부터의 평균 변화를 달성하며, 본 방법은 상기 (a) 투여하는 단계 전에, 동시에, 또는 후에, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류마티스제, 근육 이완제, 안정제, 비스테로이드 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항진선제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 항정신병제, 자극제, 친식 약물, 베타 작용제, 흡입용 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토카인, 또는 사이토카인 길항제 중 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 단백질의 유효량을 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0034] 본 발명은, 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 대상에게 투여되고 하기 표에서의 반응으로 이루어진 군으로부터 선택된 임상 반응을 유도한다:

제 16 주에서의 효능		
	위약	폴리무답 2 mg/kg
무작위 배정된 환자, n	103	105
임상 효능		
ASAS20, n(%)	27(26.2%)	77(73.3%)**
ASAS40, n(%)	9(8.7%)	50(47.6%)**
BASDAI 50, n(%)	15(14.6%)	43(41.0%)**
ASAS 부분 관해, n(%)	4(3.9%)	17(16.2%)*
* p < 0.01; **p ≤ 0.001		
ASAS20/40, 강직성 척추염 평가(ASAS) 국제 작업 그룹 기준의 20%/40% 이상의 개선; BASDAI, 베스 강직성 척추염 질환 활성 지수		

[0035] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.

[0037] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 45% 이상의 치료 차이(위약에 비교한 개선)로 ASAS20을 달성한다.

[0038] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 정맥내(IV) 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 투여되고, 제0주 및 제4주에, 그리고 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되며, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.

[0039] 본 발명은, 활성 강직성 척추염의 안전하고 효과적인 치료에 사용하기 위한, 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 하나 이상의 단리된 포유류 항-TNF 항체를 제공하며, 상기 항-TNF 항체는 메토크세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 정맥내(IV) 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.

[0040] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은

[0041] (a) 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.

[0042] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방

법은

- [0043] (a) 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 45% 이상의 치료 차이(위약에 비교한 개선)로 ASAS20을 달성한다.
- [0044] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은
- [0045] (a) 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 IV 주입을 통해 2 mg/kg의 용량으로 투여되고, 제0주 및 제4주에, 그리고 이어서 그 후로는 매 8 주마다(q8w) 30 ± 10 분에 걸쳐 투여되며, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.
- [0046] 본 발명은 TNF 관련 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 TNF 관련 병태는 활성 강직성 척추염이고, 본 방법은
- [0047] (a) 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는 단리된 포유류 항-TNF 항체의 안전하고 효과적인 양을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 메토티렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 또는 하이드록시클로로퀸(HCQ)의 존재 또는 부재 하에 IV 주입을 통해 투여되고, 여기서 치료를 받는 환자의 65% 이상이 치료의 제16주에 ASAS20을 달성한다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 재조합 TNF 수용체에 대한 TNF α 결합을 억제하기 위한 하이브리도마 세포 상청액에서의 TNV mAb의 능력에 대한 검정을 나타내는 도해적 표현을 나타낸다. 알려진 양의 TNV mAb를 함유하는 다양한 양의 하이브리도마 세포 상청액을 고정된 농도(5 ng/ml)의 125 I-표지된 TNF α 와 함께 사전 인큐베이션하였다. 재조합 TNF 수용체/IgG 융합 단백질인 p55-sf2로 사전에 코팅된 96-웰 Optiplate에 혼합물을 이전하였다. 미결합 재료를 세척해내고 감마 계수기를 사용하여 계수한 후에 mAb의 존재 하에 p55 수용체에 결합된 TNF α 의 양을 결정하였다. 이들 실험에서는 8 개의 TNV mAb 샘플을 시험하였지만, 간략함을 위해, DNA 서열 분석에 의해 다른 TNV mAb 중 하나와 동일한 것으로 나타난 3 개의 mAb(섹션 5.2.2 참조)는 여기에 나타내지 않는다. 각각의 샘플을 이중실험으로 시험하였다. 결과는 2 회의 독립적인 실험을 대표한다.

도 2a 및 도 2b는 TNV mAb 중쇄 가변 영역의 DNA 서열을 나타낸다. 나타낸 생식세포계열 유전자는 DP-46 유전자이다. 'TNVs'는 나타낸 서열이 TNV14, TNV15, TNV148, 및 TNV196의 서열임을 나타낸다. TNV 서열 내의 최초 3 개의 뉴클레오티드는 번역 개시 Met 코돈을 정의한다. TNV mAb 유전자 서열 내의 점은 뉴클레오티드가 생식세포계열 서열에서와 동일함을 나타낸다. TNV 서열의 최초 19 개 뉴클레오티드(밑줄)는 가변 영역을 PCR 증폭하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오티드에 상응한다. 성숙 mAb로 시작하는 아미노산 번역(1문자 약어)은 생식세포계열 유전자에 대해서만 나타낸다. 생식세포계열 아미노산 번역에서 3 개의 CDR 도메인은 굵은체 및 밑줄로 표시된다. TNV148(B)로 표지된 선은 나타낸 서열이 TNV148 및 TNV148B 둘 모두에 관련됨을 나타낸다. 생식세포계열 DNA 서열(CDR3) 내의 겹은 생식세포계열 유전자에서 알려져 있지 않거나 존재하지 않는 서열에 기인한다. TNV mAb 중쇄는 J6 결합 영역을 사용한다.

도 3은 TNV mAb 경쇄 가변 영역의 DNA 서열을 나타낸다. 나타낸 생식세포계열 유전자는 인간 카파 생식세포계열 가변 영역 유전자의 Vg/38K 패밀리의 대표적인 구성원이다. TNV mAb 유전자 서열 내의 점은 뉴클레오티드가 생식세포계열 서열에서와 동일함을 나타낸다. TNV 서열의 최초 16 개 뉴클레오티드(밑줄)는 가변 영역을 PCR 증폭하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오티드에 상응한다. 성숙 mAb의 아미노산 번역(1문자 약어)은 생식세포계열 유전자에 대해서만 나타낸다. 생식세포계열 아미노산 번역에서 3 개의 CDR 도메인은 굵은체 및 밑줄로 표시된다. TNV148(B)로 표지된 선은 나타낸 서열이 TNV148 및 TNV148B 둘 모두에 관련됨을 나타낸다. 생식세포계열 DNA 서열(CDR3) 내의 겹은 생식세포계열 유전자에서 알려져 있지 않거나 존재하지 않는 서열에 기인한다. TNV mAb 경쇄는 J3 결합 서열을 사용한다.

도 4는 TNV mAb 중쇄 가변 영역의 추정된 아미노산 서열을 나타낸다. 나타낸 아미노산 서열(1문자 약어)은 클로닝되지 않은 PCR 생성물 및 클로닝된 PCR 생성물 둘 모두로부터 결정된 DNA 서열로부터 추정하였다. 아미노산 서열은 분비 신호 서열(신호), 프레임워크(FW), 및 상보성 결정 영역(CDR) 도메인으로 분할하여 나타낸다. DP-

46 생식세포계열 유전자에 대한 아미노산 서열은 각각의 도메인에 대해 상부 라인 상에 나타난다. 점은 TNV mAb 내의 아미노산이 생식세포계열 유전자와 동일함을 나타낸다. TNV148(B)는 나타난 서열이 TNV148 및 TNV148B 둘 모두에 관련됨을 나타낸다. 상이한 서열을 나타내지 않는 한, 'TNVs'는 나타난 서열이 모든 TNV mAb에 관련됨을 나타낸다. 생식세포계열 서열(CDR3) 내의 대시는 서열이 생식세포계열 유전자에서 알려져 있지 않거나 존재하지 않음을 나타낸다.

도 5는 TNV mAb 경쇄 가변 영역의 추정된 아미노산 서열을 나타낸다. 나타난 아미노산 서열(1문자 약어)은 클로닝되지 않은 PCR 생성물 및 클로닝된 PCR 생성물 둘 모두로부터 결정된 DNA 서열로부터 추정하였다. 아미노산 서열은 분비 신호 서열(신호), 프레임워크(FW), 및 상보성 결정 영역(CDR) 도메인으로 분할하여 나타낸다. Vg/38K-유형 경쇄 생식세포계열 유전자에 대한 아미노산 서열은 각각의 도메인에 대해 상부 라인 상에 나타난다. 점은 TNV mAb 내의 아미노산이 생식세포계열 유전자와 동일함을 나타낸다. TNV148(B)는 나타난 서열이 TNV148 및 TNV148B 둘 모두에 관련됨을 나타낸다. '전부'는 나타난 서열이 TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B, 및 TNV186에 관련됨을 나타낸다.

도 6은 rTNV148B-발현 C466 세포를 제조하기 위해 사용되는 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드의 개략적 예시를 나타낸다. p1783은 중쇄 플라스미드이고 p1776은 경쇄 플라스미드이다. rTNV148B 가변 영역 및 불변 영역 코딩 도메인은 흑색 박스로 나타낸다. J-C 인트론 내의 면역글로불린 인핸서는 회색 박스로 나타낸다. 관련 제한 부위를 나타낸다. 플라스미드는 Ab 유전자의 전사가 시계방향으로 진행되도록 배향하여 나타낸다. 플라스미드 p1783은 길이가 19.53 kb이고 플라스미드 p1776은 길이가 15.06 kb이다. 둘 모두의 플라스미드의 완전한 뉴클레오타이드 서열은 알려져 있다. p1783 내의 가변 영역 코딩 서열은 BsiWI/BstBI 제한 단편을 대체함으로써 다른 중쇄 가변 영역 서열로 용이하게 대체될 수 있다. p1776 내의 가변 영역 코딩 서열은 SalI/AflIII 제한 단편을 대체함으로써 다른 가변 영역 서열로 대체될 수 있다.

도 7은 5 개의 rTNV148B-생산 세포주의 성장 곡선 분석의 도해적 표현을 나타낸다. 30 ml 부피 내에 1.0×10^5 세포/ml의 생존가능한 세포 밀도를 갖도록 I5Q+ MHX 배지 중에 T75 플라스크 내로 세포를 접종함으로써 제0일에 배양을 개시하였다. 이들 연구에 사용된 세포 배양물은 형질주입 및 서브클로닝이 수행된 이후로 연속 배양되었다. 후속 날에, T 플라스크 내의 세포를 철저히 재현탁시키고, 0.3 ml 분취량의 배양물을 제거하였다. 세포 계수가 1.5×10^5 세포/ml 미만으로 하락했을 때 성장 곡선 연구를 종료하였다. 분취물 내의 생존 세포의 수를 트리판 블루 배제에 의해 결정하였고, 분취물의 나머지는 이후의 mAb 농도 결정을 위해 저장하였다. 모든 샘플 분취물에 대해 인간 IgG에 대한 ELISA를 동시에 수행하였다.

도 8은 다양한 농도의 MHX 선택의 존재 하에 세포 성장 속도의 비교의 도해적 표현을 나타낸다. 세포 서브클론 C466A 및 C466B를 MHX가 없는 배지(IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민) 내로 해동시키고, 추가로 2 일 동안 배양하였다. 이어서, 둘 모두의 세포 배양물을 MHX 없음, 0.2X MHX, 또는 1X MHX 중 어느 하나를 함유하는 3 개의 배양물로 분할하였다. 1 일 후에, 새로운 T75 플라스크를 1×10^5 세포/ml의 출발 밀도에서 배양물로 접종하고, 세포를 24 시간 간격으로 1 주 동안 계수하였다. 최초 5 일 동안의 배가 시간을 SOP PD32.025의 수학적식을 사용하여 계산하였고, 바 위에 나타낸다.

도 9는 2 개의 rTNV148B-생산 세포주로부터의 시간 경과에 따른 mAb 생산의 안정성의 도해적 표현을 나타낸다. 형질주입 및 서브클로닝을 수행한 이후로 연속 배양 중이었던 세포 서브클론을 사용하여 24-웰 배양 접시에서 장기 연속 배양을 시작하였다. MHX 선택의 존재 및 부재 하에 I5Q 배지 중에 세포를 배양하였다. 매 4 내지 6 일마다 배양물을 분할함으로써 세포를 지속적으로 계대배양하여, 이전의 배양물이 소모되게 하는 동안 새로운 생존가능한 배양물을 유지하였다. 배양물이 소모된 직후에, 소모된 세포 상청액의 분취물을 수집하고, mAb 농도가 결정될 때까지 저장하였다. 모든 샘플 분취물에 대해 인간 IgG에 대한 ELISA를 동시에 수행하였다.

도 10은 실시예 4의 대조군에 비교하여 본 발명의 항-TNF 항체에 반응한 관절염 마우스 모델 마우스 Tg197 체중 변화를 나타낸다. 대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 9 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 둘베코 PBS(D-PBS) 또는 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 본 발명의 항-TNF 항체(TNV14, TNV148, 또는 TNV196)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다. 체중이 투여 전으로부터의 변화로서 분석되었을 때, 10 mg/kg cA2로 치료한 동물은 연구 전체에 걸쳐 D-PBS-치료 동물보다 일관되게 더 높은 체중 증가를 나타냈다. 이러한 체중 증가는 제3주 내지 제7주에 유의하였다. 10 mg/kg TNV148로 치료한 동물은 또한 연구의 제7주에 유의한 체중 증가를 달성하였다.

도 11a 내지 도 11c는 실시예 4에 제시된 바와 같은 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 10

mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 더 낮았으며, 이는 제3주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제7주). 1 mg/kg TNV14로 치료한 동물 및 1 mg/kg cA2로 치료한 동물은, D-PBS-치료군에 비교할 때, 제3주 후에 AI의 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 10 mg/kg 치료군들 사이에는, 각각을 유사한 용량의 다른 것들에 비교했을 때(10 mg/kg cA2를 10 mg/kg TNV14, 148, 및 196에 비교함) 유의한 차이가 없었다. 1 mg/kg 치료군을 비교했을 때, 1 mg/kg TNV148은 3 주, 4 주, 및 7 주에 1 mg/kg cA2보다 유의하게 더 낮은 AI를 나타냈다. 1 mg/kg TNV148은 또한 3 주 및 4 주에 1 mg/kg TNV14-치료군보다 유의하게 더 낮았다. TNV196은 연구의 제6주까지 AI의 유의한 감소를 나타냈지만(D-PBS-치료군에 비교할 때), 연구 종료 시에 유의하게 유지된 유일한 1 mg/kg 치료는 TNV148이었다.

도 12는 실시예 5의 대조군에 비교하여 본 발명의 항-TNF 항체에 반응한 관절염 마우스 모델 마우스 Tg197 체중 변화를 나타낸다. 대략 4 주령에, 체중에 기초하여, 8 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 대조 물품(D-PBS) 또는 3 mg/kg의 항체(TNV14, TNV148)의 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다(제0주). 제1주, 제2주, 제3주, 및 제4주에 모든 동물에서 주사를 반복하였다. 시험 물품 효능에 대해 군 1 내지 군 6을 평가하였다. 군 7 및 군 8의 동물로부터 얻은 혈청 샘플을 제2주, 제3주, 및 제4주에 TNV14 또는 TNV148의 면역 반응 유도 및 약동학적 제거에 대해 평가하였다.

도 13a 내지 도 13c는 관절염 지수에 기초한 실시예 5에서의 질환 중증도의 진행을 나타내는 그래프이다. 10 mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 유의하게 더 낮았으며, 이는 제2주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제5주). 1 mg/kg 또는 3 mg/kg의 cA2로 치료한 동물 및 3 mg/kg TNV14로 치료한 동물은, d-PBS 대조군에 비교할 때, 연구 전체에 걸쳐 임의의 시점에 AI의 임의의 유의한 감소를 달성하지 못하였다. 3 mg/kg TNV148로 치료한 동물은 d-PBS-치료군에 비교할 때 유의한 감소를 나타냈으며, 이는 제3주에 시작하여 제5주까지 계속되었다. 10 mg/kg cA2-치료 동물은 연구의 제4주 및 제5주에 cA2의 더 낮은 용량(1 mg/kg 및 3 mg/kg) 둘 모두에 비교할 때 AI의 유의한 감소를 나타냈으며, 또한 제3주 내지 제5주에 TNV14-치료 동물보다 유의하게 더 낮았다. 3 mg/kg 치료군 중 임의의 것 사이에는 유의한 차이가 없는 것으로 보였지만, 3 mg/kg TNV14로 치료한 동물에 대한 AI는 일부 시점에 10 mg/kg 보다 유의하게 더 높았던 반면에, TNV148로 치료한 동물은 10 mg/kg의 cA2로 치료한 동물과 유의하게 상이하지 않았다.

도 14는 실시예 6의 대조군에 비교하여 본 발명의 항-TNF 항체에 반응한 관절염 마우스 모델 마우스 Tg197 체중 변화를 나타낸다. 대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 6 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 3 mg/kg 또는 5 mg/kg의 항체(cA2, 또는 TNV148)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다. 본 연구는 D-PBS 및 10 mg/kg cA2 대조군을 이용하였다.

도 15는 실시예 6에 제시된 바와 같은 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 모든 치료군은 초기 시점에 일부 보호를 나타냈으며, 5 mg/kg cA2 및 5 mg/kg TNV148은 제1주 내지 제3주에 AI의 유의한 감소를 나타냈고 모든 치료군이 제2주에 유의한 감소를 나타냈다. 연구 후반에, 5 mg/kg cA2로 치료한 동물은 제4주, 제6주, 및 제7주에 유의한 감소를 갖는 일부 보호를 나타냈다. cA2 및 TNV148 둘 모두의 낮은 용량(3 mg/kg)은 제6주에 유의한 감소를 나타냈으며, 모든 치료군이 제7주에 유의한 감소를 나타냈다. 치료군 중 어느 것도 연구 종료 시에 유의한 감소를 유지할 수 없었다(제8주). 임의의 치료군(식염수 대조군을 배제함) 사이에는 임의의 시점에 유의한 차이가 없었다.

도 16는 실시예 7의 대조군에 비교하여 본 발명의 항-TNF 항체에 반응한 관절염 마우스 모델 마우스 Tg197 체중 변화를 나타낸다. TNV148(하이브리도마 세포로부터 유래됨) 및 rTNV148B(형질주입된 세포로부터 유래됨)의 단일 복강내 용량의 효능을 비교하기 위한 것이다. 대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 9 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 둘베코 PBS(D-PBS) 또는 1 mg/kg의 항체(TNV148 또는 rTNV148B)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다.

도 17는 실시예 7에 제시된 바와 같은 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 10 mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 더 낮았으며, 이는 제4주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제8주). TNV148-치료군 및 1 mg/kg cA2-치료군 둘 모두는 제4주에 AI의 유의한 감소를 나타냈다. 이전의 연구(P-099-017)는 TNV148이 단일 1 mg/kg 복강내 볼루스 후에 관절염 지수를 감소시키는 데 약간 더 효과적이었음을 나타냈지만, 본 연구는 TNV 항체-치료군의 둘 모두의 버전으로부터의 AI가 약간 더 높았음을 나타냈다. 1 mg/kg cA2-치료군은 10 mg/kg cA2 군에 비교할 때 유의하게 증가되지 않았고 TNV148-치료군은 제7주 및 제8주에 유의하게 더 높았지만(제6주는 제외함), 연구 중 임의의 지점에 1 mg/kg cA2, 1 mg/kg TNV148, 및 1 mg/kg TNV148B 사이에는 AI의 유의한 차이가 없었다.

도 18은 활성 강직성 척추염(AS)을 갖는 대상에서 정맥내 투여된 Simponi(골리무맙)의 시험에 대한 연구 설계의 다이어그램을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 발명은, 서열 번호 1, 2, 및 3의 중쇄 가변 CDR 영역의 전부 및/또는 서열 번호 4, 5, 및 6의 경쇄 가변 CDR 영역의 전부를 포함하는 단리, 재조합, 및/또는 합성 항-TNF 인간, 영장류, 설치류, 포유류, 키메라, 인간화, 또는 CDR-이식 항체 및 이에 대한 TNF 항-개별특이형 항체와 더불어, 하나 이상의 항-TNF 항체 또는 항-개별특이형 항체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 암호화 핵산 분자 및 조성물을 제공한다. 추가로 본 발명은, 진단 및 치료 조성물, 방법, 및 장치를 포함하는, 그러한 핵산 및 항체 및 항-개별특이형 항체의 제조 방법 및 사용 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "항-중양 괴사 인자 알파 항체", "항-TNF 항체", "항-TNF 항체 부분", 또는 "항-TNF 항체 단편" 및/또는 "항-TNF 항체 변이체" 등은 중쇄 또는 경쇄의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는 이의 임의의 부분, 또는 TNF 수용체 또는 결합 단백질의 하나 이상의 부분과 같으나 이에 한정되지 않는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함하며, 이는 본 발명의 항체 내로 혼입될 수 있다. 그러한 항체는 임의로 특이적 리간드에 추가로 영향을 주며, 그러한 항체가 시험관 내에서, 원위치에서, 및/또는 생체내에서 하나 이상의 TNF 활성 또는 결합, 또는 TNF 수용체 활성 또는 결합을 조절, 감소, 증가, 길항화, 작용화, 완화, 경감, 차단, 억제, 제거, 및/또는 방해하는 경우와 같으나 이에 한정되지 않는다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 적합한 항-TNF 항체, 특정 부분, 또는 변이체는 하나 이상의 TNF, 또는 이의 특정 부분, 변이체, 또는 도메인에 결합할 수 있다. 적합한 항-TNF 항체, 특정 부분, 또는 변이체는 또한 임의로 RNA, DNA, 또는 단백질 합성, TNF 방출, TNF 수용체 신호전달, 막 TNF 절단, TNF 활성, TNF 생산 및/또는 합성과 같으나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 TNF 활성 또는 기능에 영향을 줄 수 있다. 용어 "항체"는 추가로 항체, 이의 분해 단편, 특정 부분, 및 변이체를 포함하고자 하며, 항체 모방체(mimetic)를 포함하거나, 단일쇄 항체 및 이의 단편을 포함하는, 항체 또는 이의 특정 단편 또는 부분의 구조 및/또는 기능을 모방하는 항체의 부분을 포함한다. 기능적 단편은 포유류 TNF에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, Fab(예를 들어, 파파인 분해에 의함), Fab'(예를 들어, 펩신 분해 및 부분적인 환원에 의함), 및 F(ab')₂(예를 들어, 펩신 분해에 의함), facb(예를 들어, 플라스민 분해에 의함), pFc'(예를 들어, 펩신 또는 플라스민 분해에 의함), Fd(예를 들어, 펩신 분해, 부분적인 환원, 및 재응집에 의함), Fv 또는 scFv(예를 들어, 분자생물학 기술에 의함) 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는, TNF 또는 이의 부분에 결합할 수 있는 항체 단편이 본 발명에 포함된다(예를 들어, 문헌[Colligan, Immunology, 상기 문헌] 참조).
- [0051] 그러한 단편은 본 기술 분야에 공지되고/되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 효소적 절단, 합성 또는 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 절단 형태로 생산될 수 있다. 예를 들어, 중쇄의 CH₁ 도메인 및/또는 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록, F(ab')₂ 중쇄 부분을 암호화하는 조합 유전자를 설계할 수 있다. 항체의 다양한 부분은 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 연결될 수 있거나, 유전 공학 기술을 사용하여 연속 단백질로서 제조될 수 있다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 실질적으로 단백질의 모든 부분 (예를 들어, CDR, 프레임워크, C_L, C_H 도메인 (예를 들어 C_H1, C_H2, C_H3), 힌지, (V_L, V_H))이 작은 서열 변화 또는 변이만을 포함하고, 인간에서 실질적으로 비면역원성인 항체를 말한다. 유사하게, 영장류(원숭이, 개코원숭이, 침팬지 등), 설치류(마우스, 쥐, 토끼, 기니 피그, 햄스터 등), 및 다른 포유류로 지정된 항체는 그러한 중, 아속, 속, 아과, 과 특이적 항체를 지정한다. 추가로, 키메라 항체는 상기의 임의의 조합을 포함한다. 이러한 변화 또는 변이는 선택적으로 그리고 바람직하게는, 변형되지 않은 항체에 비해 인간 또는 다른 종에서의 면역원성을 유지시키거나 감소시킨다. 따라서, 인간 항체는 키메라 또는 인간화 항체와 구별된다. 인간 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 인간의 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 생성될 수 있다는 점이 주목된다. 추가로, 인간 항체가 단일쇄 항체일 때, 인간 항체는 고유 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커(linker) 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 연결하는 링커 펩티드, 예를 들어 2 내지 약 8개의 글라이신 또는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 링커 펩티드는 인간 기원인 것으로 생각된다.

- [0053] 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 단클론, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체인 이중특이성(bispecific), 이중특이성(heterospecific), 이형접합성(heteroconjugate), 또는 유사 항체 또한 사용할 수 있다. 이 경우에, 결합 특이성 중 하나는 하나 이상의 TNF 단백질에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 이중특이성 항체를 제조하는 방법은 본 기술 분야에 알려져 있다. 통상적으로, 이중특이성 항체의 재조합 생성은 2개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는, 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시 발현에 기초한다(문헌[Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이러한 하이브리도마(쿼드로마(quadroma))는 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생성한다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 성가시며, 생성물 수율도 낮다. 유사한 절차가, 예를 들어 국제특허 공개 WO 93/08829호, 미국 특허 제6210668호, 제6193967호, 제6132992호, 제6106833호, 제6060285호, 제6037453호, 제6010902호, 제5989530호, 제5959084호, 제5959083호, 제5932448호, 제5833985호, 제5821333호, 제5807706호, 제5643759호, 제5601819호, 제5582996호, 제5496549호, 제4676980호, 국제특허 공개 WO 91/00360호, WO 92/00373호, 유럽 특허 제03089호, 문헌[Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)], 문헌[Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)]에 개시되어 있으며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0054] 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 항-TNF 항체(TNF 항체로도 칭함)는 임의로 TNF에 대한 고친화도 결합 및 바람직하게는 임의로 낮은 독성 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 특히, 개별 성분, 예를 들어 가변 영역, 불변 영역 및 프레임워크가 개별적으로 및/또는 공동으로, 선택적으로 그리고 바람직하게는 낮은 면역원성을 갖는 본 발명의 항체, 특정 단편 또는 변이체가 본 발명에서 유용하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 항체는 선택적으로 측정가능한 정도로 증상을 완화하고, 낮고/낮거나 허용가능한 독성을 보이면서 장기간 동안 환자를 치료할 수 있는 능력을 특징으로 한다. 낮거나 허용가능한 면역원성 및/또는 높은 친화도뿐만 아니라 다른 적합한 특성이 달성되는 치료 결과에 기여할 수 있다. 본 명세서에서 "낮은 면역원성"은 치료한 환자의 약 75% 미만, 또는 바람직하게는 약 50% 미만에서 유의한 HAMA, HACA, 또는 HAMA 반응을 야기하고/하거나 치료한 환자에서 낮은 역가(이중 항원 효소 면역검정으로 측정할 때, 약 300 미만, 바람직하게는 약 100 미만)를 야기하는 것으로서 정의된다(전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)]).
- [0055] **유용성:** 본 발명의 단리된 핵산은, 면역 장애 또는 질환, 심혈관 장애 또는 질환, 감염성, 악성, 및/또는 신경 장애 또는 질환 중 하나 이상으로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 TNF 병태를 진단, 모니터링, 조절, 치료, 완화시키거나, 그의 발병의 예방을 돕거나, 그의 증상을 감소시키기 위해 세포, 조직, 기관, 또는 동물(포유류 및 인간을 포함함)에서 측정하거나 작용하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 항-TNF 항체 또는 이의 특정 변이체의 생산을 위해 사용될 수 있다.
- [0056] 그러한 방법은 증상, 효과, 또는 기전의 그러한 조절, 치료, 완화, 예방, 또는 감소를 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 유효량은 본 명세서에 기재되거나 관련 기술 분야에 알려진 바와 같이 알려진 방법을 사용하여 실행되고 결정될 때, 단일(예를 들어, 볼루스), 다중, 또는 연속 투여당 약 0.001 내지 500 mg/kg의 양, 또는 단일, 다중, 또는 연속 투여당 0.01 내지 5000 µg/ml의 혈청 농도를 달성하는 양, 또는 그 안의 임의의 유효 범위 또는 값을 포함할 수 있다. 인용. 본 명세서에 인용된 모든 간행물 또는 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되며, 이는 그들이 본 발명의 시점에서의 최신의 기술을 나타내고/나타내거나 본 발명의 설명 및 실시가능성을 제공하기 때문이다. 간행물은 임의의 학술 간행물 또는 특허 간행물, 또는 모든 기록 형식, 전자 형식 또는 인쇄 형식을 포함하는 임의의 매체 형식으로 이용가능한 또 다른 정보를 가리킨다. 하기 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다: 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)].
- [0057] **본 발명의 항체:** 서열 번호 1, 2, 및 3의 중쇄 가변 CDR 영역의 전부 및/또는 서열 번호 4, 5, 및 6의 경쇄 가변 CDR 영역의 전부를 포함하는 본 발명의 하나 이상의 항-TNF 항체는 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 세포주, 혼합 세포주, 불멸화 세포, 또는 불멸화 세포의 클론 집단에 의해 임의로 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY

(1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)]을 참조한다.

[0058] 단리되고/되거나 TNF 단백질 또는 이의 부분과 같은 적절한 면역원성 항원(합성 펩티드와 같은 합성 분자를 포함함)에 대해 인간 TNF 단백질 또는 이의 단편에 특이적인 인간 항체를 발생시킬 수 있다. 다른 특이적 또는 일반적 포유류 항체를 유사하게 발생시킬 수 있다. 면역원성 항원의 제조 및 단클론 항체 생성은 임의의 적합한 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

[0059] 하나의 접근법에서는, 적합한 불멸 세포주(immortal cell line), 예를 들어, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A 등과 같으나 이에 한정되지 않는 골수종 세포주, 또는 이종골수종(heteromyloma), 이의 융합 생성물, 또는 그로부터 유래된 임의의 세포 또는 융합 세포, 또는 본 기술 분야에 알려진 임의의 다른 적합한 세포주를 융합함으로써 하이브리도마가 생성된다. 단리되거나 클로닝된 비장, 말초 혈액, 림프, 편도선, 또는 다른 면역 또는 B 세포 함유 세포와 같으나 이에 한정되지 않는 항체 생산 세포, 또는 중쇄 또는 경쇄 불변 또는 가변 또는 프레임워크 또는 CDR 서열을 내인성 또는 이종성 핵산으로서, 재조합 또는 내인성, 바이러스, 박테리아, 조류, 원핵생물, 양서류, 곤충, 파충류, 어류, 포유류, 설치류, 말류, 양류, 염소, 양, 영장류, 진핵생물, 게놈 DNA, cDNA, rDNA, 미토콘드리아 DNA 또는 RNA, 염색체 DNA 또는 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 단일, 이중, 또는 삼중 가닥, 혼성화 등 또는 이들의 임의의 조합으로서 발현하는 임의의 다른 세포에 대해서는, 예를 들어, 문헌[www.atcc.org, www.lifetech.com.] 등을 참조한다. 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 문헌[Ausubel, 상기 문헌] 및 문헌[Colligan, Immunology, 상기 문헌, 챕터 2]을 참조한다.

[0060] 항체 생산 세포는 또한 관심의 대상이 되는 항원으로 면역화된 인간 또는 다른 적합한 동물의 말초혈, 또는 바람직하게는 비장 또는 림프절로부터 얻을 수 있다. 임의의 다른 적합한 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 항체, 이의 특정 단편 또는 변이체를 암호화하는 이중 또는 내인성 핵산을 또한 발현할 수 있다. 융합된 세포 (하이브리도마) 또는 재조합 세포는 선택적 배양 조건 또는 다른 적합한 공지 방법을 사용하여 단리될 수 있고, 제한 효소 또는 세포 분류, 또는 다른 공지의 방법에 의해 클로닝될 수 있다. 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 세포를 적합한 분석 (예를 들어, ELISA)에 의해 선별할 수 있다.

[0061] 펩티드 또는 단백질 라이브러리(비제한적인 예를 들어, 박테리오파지, 리보솜, 올리고뉴클레오타이드, RNA, cDNA 등, 디스플레이 라이브러리; 예를 들어, 영국 캠브리지셔 소재의 Cambridge antibody Technologies; 독일 마르팅스레이드/플라네그 소재의 MorphoSys; 영국 스코틀랜드 아버딘 소재의 Biovation; 스웨덴 룬드 소재의 BioInvent; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; 캘리포니아주 버클리 소재의 Xoma; Ixsys로부터 입수가능함. 예를 들어, 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); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989(MorphoSys); WO95/16027(BioInvent); WO88/06630; WO90/3809(Dyax); US 4,704,692(Enzon); PCT/US91/02989(Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149(Ixsys) 참조; 또는 체계적으로 생성된 펩티드 또는 단백질 - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689(Ixsys, 현 Applied Molecular Evolution(AME), 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨))로부터 재조합 항체를 선택하는 방법, 또는 본 기술 분야에 알려지고/알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, SCID 마우스, 문헌[Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997)]; 문헌[Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996)]; 문헌[Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998)], 관련 특허 및 출원과 더불어 각각 전체적으로 참고로 포함됨)의 면역화에 의존하는 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 요구되는 특이성의 항체를 생성하거나 단리하는 다른 적합한 방법을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 리보솜 디스플레이(문헌[Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997)]; 문헌[Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)]); 단일 세포 항체 생성 기술(예를 들어, 선택된 림프구 항체 방법("SLAM") (미국 특허 제5,627,052호, 문헌[Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987)]; 문헌[Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)]); 젤 마이크로소적 및 유세포 분석법(문헌[Powell et al.,

Biotechnol. 8:333-337 (1990)]; 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 One Cell Systems; 문헌[Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995)]; 문헌[Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)]; B-세포 선택(문헌 [Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994)]; 문헌[Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)])을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0062]

또한, 인간의 또는 인간 항체를 유전자 조작하거나 인간화하는 방법이 사용될 수 있으며, 이는 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화되거나 조작된 항체는 마우스, 쥐, 토끼, 인간외 영장류 또는 다른 포유류와 같으나 이에 한정되지 않는 인간외 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 인간 아미노산 잔기는 종종 "도입(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 알려진 인간 서열의 "도입" 가변, 불변, 또는 다른 도메인으로부터 취해진다. 공지의 인간 Ig 서열은, 예를 들어 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caaewg/caaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)]에 개시되어 있으며, 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0063]

이러한 도입된 서열은 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화도, 온-레이트(on-rate), 오프-레이트(off-rate), 결합활성(avidity), 특이성, 반감기, 또는 본 기술 분야에 알려진 임의의 다른 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나, 변형시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 인간외 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부가 유지되는 반면에, 가변 및 불변 영역의 인간외 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체된다. 항체는 또한 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유함으로써 임의로 인간화될 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 인간화 항체는 모(parental) 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적(conceptual) 인간화 생성물을 분석하는 과정에 의해 임의로 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하며, 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하여, 후보 면역글로불린 서열이 기능할 때 잔기의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 이의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가가 달성되도록 공통 서열 및 도입 서열로부터 FR 잔기가 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적이고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 준다. 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Winter](문헌[Jones et al., Nature 321:522 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; 문헌[Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)]; 문헌[Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)]; 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)], 문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 미국 특허 제 5723323호, 제5976862호, 제5824514호, 제5817483호, 제5814476호, 제5763192호, 제5723323호, 제5,766886호, 제5714352호, 제6204023호, 제6180370호, 제5693762호, 제5530101호, 제5585089호, 제5225539호; 제4816567호, 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, 그 안에 인용된 참고문헌에 기재된 것들과 같으나 이에 한정되지 않는 임의의 알려진 방법을 사용하여, 본 발명의 항체의 인간화 또는 조작을 수행할 수 있다

[0064] 또한 임의로 항-TNF 항체는 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스, 쥐, 햄스터, 인간외 영장류 등)의 면역화에 의해 생성될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법과 같은 적합한 방법을 사용하여, 인간 항-TNF 항체를 생산하는 세포를 그러한 동물로부터 단리하고 불멸화할 수 있다.

[0065] 인간 항원에 결합하는 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 마우스는 알려진 방법(비제한적인 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, Lonberg 등에게 허여된 미국 특허 제5,770,428호, 제5,569,825호, 제5,545,806호, 제5,625,126호, 제5,625,825호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 및 제5,789,650호; Jakobovits 등의 WO 98/50433, Jakobovits 등의 WO 98/24893, Lonberg 등의 WO 98/24884, Lonberg 등의 WO 97/13852, Lonberg 등의 WO 94/25585, Kucherlapate 등의 WO 96/34096, Kucherlapate 등의 EP 0463 151 B1, Kucherlapate 등의 EP 0710 719 A1, Surani 등의 미국 특허 제5,545,807호, Bruggemann 등의 WO 90/04036, Bruggemann 등의 EP 0438 474 B1, Lonberg 등의 EP 0814 259 A2, Lonberg 등의 GB 2 272 440 A, 문헌[Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994)], 문헌[Taylor *et al.*, *Int. Immunol.* 6(4):579-591 (1994)], 문헌[Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)], 문헌[Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)], 문헌[Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20(23):6287-6295 (1992)], 문헌[Tuailon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720-3724 (1993)], 문헌[Lonberg *et al.*, *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995)], 및 문헌[Fishwald *et al.*, *Nat Biotechnol* 14(7):845-851(1996)])에 의해 생성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 마우스는 기능적으로 재배열되거나, 기능적으로 재배열될 수 있는 하나 이상의 인간 면역글로불린 유전자좌로부터의 DNA를 포함하는 하나 이상의 트랜스유전자(transgene)를 포함한다. 상기 마우스에서 내인성 면역글로불린 유전자좌는 파괴되거나 결실되어, 내인성 유전자에 의해 암호화되는 항체를 생성하는 동물의 능력을 제거할 수 있다.

[0066] 통상적으로 펩티드 디스플레이 라이브러리를 사용하여 유사한 단백질 또는 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 스크리닝할 수 있다. 이러한 방법은 원하는 기능 또는 구조를 갖는 개별 구성원에 대한 펩티드의 큰 집합의 스크리닝을 포함한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리의 항체 스크리닝은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 디스플레이된 펩티드 서열의 길이는 3 내지 5000개 이상의 아미노산, 종종 5 내지 100개의 아미노산, 종종 약 8 내지 25개의 아미노산일 수 있다. 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 직접적인 화학적 합성 방법 외에도, 여러 가지 재조합 DNA 방법이 기재되어 있다. 하나의 유형은 박테리오파지 또는 세포의 표면 상에 펩티드 서열을 디스플레이하는 것을 포함한다. 각각의 박테리오파지 또는 세포는 특정 디스플레이된 펩티드 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 이러한 방법이 PCT 특허 공개 91/17271호, 91/18980호, 91/19818호 및 93/08278호에 기재되어 있다. 펩티드의 라이브러리를 생성하는 다른 시스템은 시험관 내에서의 화학적 합성 및 재조합 방법 모두의 양태를 포함한다. PCT 특허 공개 92/05258호, 92/14843호 및 96/19256호를 참조한다. 또한 미국 특허 제5,658,754호; 및 제5,643,768호를 참조한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터 및 스크리닝 키트는 인비트로젠(Invitrogen) (캘리포니아주 칼스바드) 및 캠프리지 안티바디 테크놀로지스 (영국 캠프리지셔)와 같은 공급원으로부터 시판된다. 예를 들어, 엔존에 양도된 미국 특허 제4704692호, 제4939666호, 제4946778호, 제5260203호, 제5455030호, 제5518889호, 제5534621호, 제5656730호, 제5763733호, 제5767260호 및 제5856456호; 다이엑스에 양도된 제5223409호, 제5403484호, 제5571698호, 제5837500호, 아피맥스에 양도된 제5427908호, 제5580717호; 캠프리지 안티바디 테크놀로지스에 양도된 제5885793호; Genentech에 양도된 제5750373호, Xoma, Colligan에 양도된 제5618920호, 제5595898호, 제5576195호, 제5698435호, 제5693493호, 제5698417호, 상기 문헌; 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조하며, 상기 특허 및 간행물 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0067] 본 발명의 항체는 또한, 우유 내에 그러한 항체를 생산하는 트랜스제닉 동물 또는 포유류, 예컨대 염소, 소, 말, 양 등을 제공하기 위한 하나 이상의 항-TNF 항체를 암호화하는 핵산을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 알려진 방법을 사용하여 제공할 수 있다. 비제한적인 예를 들어, 미국 특허 제5,827,690호; 제5,849,992호; 제4,873,316호; 제5,849,992호; 제5,994,616호; 제5,565,362호; 제5,304,489호 등을 참조하며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0068] 식물 부분, 또는 그로부터 배양된 세포에서 그러한 항체, 특정 부분, 또는 변이체를 생산하는 트랜스제닉 식물 및 배양된 식물 세포(비제한적인 예를 들어, 담배 및 옥수수)를 제공하기 위한 하나 이상의 항-TNF 항체를 암호화하는 핵산을 사용하여 본 발명의 항체를 추가로 제조할 수 있다. 비제한적인 예로서, 재조합 단백질을 발현

하는 트랜스제닉 담배 잎이, 예를 들어 유도성 프로모터를 사용하여 다량의 재조합 단백질을 제공하는 데 성공적으로 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 또한, 트랜스제닉 옥수수는 다른 재조합 시스템에서 생성되거나, 천연 공급원으로부터 정제된 것과 동등한 생물학적 활성으로, 상업 생산 수준으로 포유류 단백질을 발현하는 데 사용되어 왔다. 예를 들어, 문헌[Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 담배 종자 및 감자 덩이줄기를 포함하는, 항체 단편, 예컨대 단일쇄 항체(scFv)를 포함하는 트랜스제닉 식물 종자로부터 항체가 또한 다량으로 생산되었다. 예를 들어, 문헌[Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998)] 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다. 따라서, 본 발명의 항체는 또한 알려진 방법에 따라 트랜스제닉 식물을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999)], 문헌[Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995)]; 문헌[Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995)]; 문헌[Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994)]; 및 그 안에 인용된 참고문헌을 또한 참조한다. 또한, 일반적으로 항체의 식물 발현에 대해서는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 상기 참고문헌 각각을 참조하며 이에 한정되지 않는다.

[0069] 본 발명의 항체는 광범위한 친화도(K_D)로 인간 TNF에 결합할 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 하나 이상의 인간 mAb는 임의로 높은 친화도로 인간 TNF에 결합할 수 있다. 예를 들어, 인간 mAb는 약 10^{-7} M 이하, 비제한적인 예로서 0.1 내지 9.9(또는 그 안의 임의의 범위 또는 값) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값의 K_D 로 인간 TNF에 결합할 수 있다.

[0070] 항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합활성을 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 확인할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984)]; 문헌[Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법을 참조한다). 상이한 조건 (예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정할 경우, 측정되는 특정 항체-항원 상호작용의 친화도는 다양할 수 있다. 따라서, 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터 (예를 들어, K_D , K_a , K_d)의 측정은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충액, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 완충액을 사용하여 이루어진다.

[0071] **핵산 분자** 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 중 하나 이상의 연속 아미노산의 70 내지 100% 이상을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 이의 특정 단편, 변이체, 또는 공통 서열, 또는 이들 서열 중 하나 이상을 포함하는 기탁된 벡터와 같은 본 명세서에 제공된 정보를 사용하여, 서열 번호 1, 2, 및 3의 중쇄 가변 CDR 영역의 전부 및/또는 서열 번호 4, 5, 및 6의 경쇄 가변 CDR 영역의 전부를 포함하는 하나 이상의 항-TNF 항체를 암호화하는 본 발명의 핵산 분자를 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 방법을 사용하여 얻을 수 있다.

[0072] 본 발명의 핵산 분자는 RNA 형태, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태 또는 cDNA 및 클로닝에 의해 얻어지거나 합성에 의해 생성된 게놈 DNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 삼중가닥, 이중가닥 또는 단일가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 한 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로도 알려진 코딩 가닥일 수 있거나, 안티-센스 가닥으로도 언급되는 비코딩 가닥일 수 있다.

[0073] 본 발명의 단리된 핵산 분자는, 임의로 하나 이상의 인트론을 갖는 개방 해독틀(ORF: open reading frame)을 포함하는 핵산 분자, 비제한적인 예를 들어, 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 특정 부분, 예컨대 하나 이상의 중쇄 (예를 들어, 서열 번호 1 내지 3) 또는 경쇄(예를 들어, 서열 번호 4 내지 6)의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3을 포함하는 핵산 분자; 항-TNF 항체 또는 가변 영역(예를 들어, 서열 번호 7, 8)에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 상기 기재된 것들과는 실질적으로 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하지만, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 하나 이상의 항-TNF 항체를 여전히 암호화하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전 부호는 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 특이적 항-TNF 항체를 코딩하는 그러한 축퇴 핵산 변이체를 생성하는 것은 당업자에게 일상적인 것이다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al. 상기 문헌]을 참조하며, 이러한 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다. 본 발명의 단리된 핵산 분자의 비제한적인 예는 각각 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC 가변 영역 및 LC 가변 영역을 암호화하는 핵산의 비제한적인 예에 상응하는 서열 번호 10, 11, 12, 13, 14, 15를 포함한다.

- [0074] 본 명세서에 나타난 바와 같이 항-TNF 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는, 그 자체로 항체 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 것들; 전체 항체 또는 이의 일부에 대한 코딩 서열; 항체, 단편, 또는 부분에 대한 코딩 서열과 더불어, 추가의 서열, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호(예를 들어, mRNA의 리보솜 결합 및 안정성)를 포함하는, 전사, mRNA 프로세싱에서 역할을 담당하는 전사되고 번역되지 않는 서열과 같은 비-코딩 5' 및 3' 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가의 비-코딩 서열과 함께, 하나 이상의 인트론과 같은, 전술한 추가의 코딩 서열이 있거나 없는, 하나 이상의 신호 리더 또는 융합 펩티드의 코딩 서열; 추가의 작용기를 제공하는 것들과 같은, 추가의 아미노산을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 따라서, 항체를 암호화하는 서열은 항체 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 항체의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 암호화하는 서열과 같은 마커 서열에 융합될 수 있다.
- [0075] **본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 선택적으로 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드.** 본 발명은 선택적인 혼성화 조건 하에 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 이러한 실시 형태의 폴리뉴클레오타이드는 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 단리하고/하거나, 검출하고/하거나, 정량화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장의 클론을 동정하거나, 단리하거나, 증폭하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된 cDNA 서열 또는 게놈이거나, 그렇지 않으면 인간 또는 포유류의 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 상보성이다.
- [0076] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 80% 이상의 전장 서열, 바람직하게는 85% 또는 90% 이상의 전장 서열, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 회귀 서열의 제시를 증가시키도록 정규화될 수 있다. 낮거나 중등의 엄격성 혼성화 조건은 전형적이지만 비배타적으로, 상보성 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중등 및 높은 엄격성 조건은 동일성이 더 큰 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮게 엄격한 조건은 약 70%의 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적인 혼성화를 허용하고 동원성(orthologous) 또는 이원성(paralogous) 서열을 확인하는 데 사용될 수 있다.
- [0077] 임의로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 항체의 적어도 일부를 암호화할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 대한 선택적 혼성화에 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 문헌[Colligan, 상기 문헌]을 참조한다.
- [0078] **핵산의 작제** 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 본 발명의 단리된 핵산은 (a) 재조합 방법; (b) 합성 기술; (c) 정제 기술, 또는 이들의 조합을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0079] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 외에도 서열을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위는 폴리뉴클레오타이드의 단리를 돕기 위해 핵산 내로 삽입될 수 있다. 또한, 번역가능한 서열은 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오타이드의 단리를 돕기 위해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 핵사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 코딩 서열을 배제한 본 발명의 핵산은 임의로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터, 또는 링커이다.
- [0080] 추가의 서열은 클로닝 및/또는 발현에서 이들의 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오타이드의 단리를 돕거나, 세포 내로의 폴리뉴클레오타이드의 도입을 개선하기 위해 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 첨가될 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용이 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다).
- [0081] **핵산 작제를 위한 재조합 방법.** 당업자에게 알려진 임의의 수의 클로닝 방법을 사용하여 RNA, cDNA, 게놈 DNA, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 본 발명의 단리된 핵산 조성물을 생물학적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 엄격한 조건 하에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 선택적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하기 위해 사용된다. RNA의 단리, 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 작제는 당업자에게 잘 알려져 있다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다).
- [0082] **핵산 스크리닝 및 단리 방법.** 본 명세서에 개시된 것들과 같은, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 서열에 기초한 프로브를 사용하여 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 프로브를 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 혼성화하여, 동일하거나 상이한 유기체 내의 상동 유전자를 단리하는 데 사용할 수 있다. 다양한 정도의 혼성화

염격성이 검정에 사용될 수 있으며; 혼성화 배지 또는 세척 배지가 염격할 수 있음을 당업자는 인정할 것이다. 혼성화 조건이 더 엄격해지면, 이중체(duplex)를 형성하기 위해 프로브와 표적 사이의 상보성 정도가 더 커야 한다. 염격성 정도는 온도, 이온 강도, pH, 및 포름아미드와 같은 부분 변성 용매의 존재 중 하나 이상에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 혼성화 염격성은 예를 들어, 포름아미드 농도를 0% 내지 50%의 범위 내에서 조정하여, 반응 용액의 극성을 변경하여 편리하게 변동된다. 검출가능한 결합에 필요한 상보성 정도 (서열 동일성)는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 염격성에 따라 변동될 것이다. 상보성 정도는 최적으로 100%, 또는 70 내지 100%, 또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머에서의 작은 서열 변화는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 염격성을 감소시켜 보상될 수 있음을 이해해야 한다.

[0083] RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있고, 과도한 실험을 실시하지 않으면서, 본 명세서에 제시된 교시 및 지침을 기초로 하여 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0084] 알려진 DNA 또는 RNA 증폭 방법은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 관련 증폭 과정(예를 들어, Mullis 등의 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 제4,800,159호, 제4,965,188호; Tabor 등의 제4,795,699호 및 제4,921,794호; Innis의 제5,142,033호; Wilson 등의 제5,122,464호; Innis의 제5,091,310호; Gyllensten 등의 제5,066,584호; Gelfand 등의 제4,889,818호; Silver 등의 제4,994,370호; Biswas의 제4,766,067호; Ringold의 제4,656,134호 참조) 및 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭(Malek등의 미국 특허 제5,130,238호, 상표명 NASBA)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이들 참고 문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다)

[0085] 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 관련 유전자의 서열을 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 증폭할 수 있다. 또한, PCR 및 다른 시험관 내 증폭 방법은, 예를 들어 발견되는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하고, 샘플 내의 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하는 핵산을 제조하거나, 핵산 시퀀싱 또는 기타 목적에 유용할 수 있다. 시험관 내 증폭 방법을 통해 당업자를 지도하기에 충분한 기술의 예는 문헌[Berger, 상기 문헌], 문헌[Sambrook, 상기 문헌], 및 문헌[Ausubel, 상기 문헌]뿐만 아니라 Mullis 등의 미국 특허 제4,683,202호(1987); 및 문헌[Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)]에서 확인된다. 게놈 PCR 증폭을 위한 시판용 키트가 본 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 어드밴티지-GC 게놈 PCR 키트(Advantage-GC Genomic PCR Kit) (클론테크(Clontech))를 참조한다. 추가로, 예를 들어, T4 유전자 32 단백질 (보링거 만하임(Boehringer Mannheim))은 긴 PCR 생성물의 수율을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0086] **핵산 작제를 위한 합성 방법.** 본 발명의 단리된 핵산은 또한 알려진 방법에 의해 직접 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ausubel, 등, 상기 문헌] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하는데, 이는 상보성 서열과의 혼성화에 의해 또는 단일 가닥을 주형으로서 사용하여 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 당업자라면 DNA의 화학적 합성이 약 100개 이상의 염기의 서열로 제한될 수 있는 반면, 더 긴 서열은 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 얻어질 수 있음을 인식할 것이다.

[0087] **제조합 발현 카세트.** 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 제조합 발현 카세트를 추가로 제공한다. 본 발명의 핵산 서열, 예를 들어 본 발명의 항체를 암호화하는 cDNA 또는 게놈 서열을 사용하여 하나 이상의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 제조합 발현 카세트를 작제할 수 있다. 제조합 발현 카세트는 전형적으로 의도되는 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 유도할 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 본 발명의 핵산의 발현을 유도하기 위해 이중성 및 비-이중성(즉, 내인성) 프로모터 둘 모두를 사용할 수 있다.

[0088] 일부 실시 형태에서, 프로모터, 인핸서, 또는 다른 요소로서의 역할을 하는 단리된 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향조절 또는 하향조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 비-이중성 형태의 적절한 위치(상류, 하류 또는 인트론 내)에 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체 내에서 또는 시험관 내에서 변경될 수 있다.

[0089] **벡터 및 숙주 세포.** 본 발명은 또한, 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 제조합 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포, 및 제조합 기술에 의한 하나 이상의 항-TNF 항체의 생산에 관한 것이다 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]; 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌]을 참조한다.

- [0090] 폴리뉴클레오티드는 숙주 내에서의 증식을 위해 선택가능한 마커를 함유하는 벡터에 선택적으로 결합될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물, 예를 들어 인산칼슘 침전물 내에, 또는 하전된 지질과의 복합체 내에 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 적합한 패키징(packaging) 세포주를 사용하여 시험관 내에서 패키징된 후, 숙주 세포 내로 형질도입된다.
- [0091] DNA 삽입물은 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 구조물은 전사 개시를 위한 부위, 종결을 위한 부위 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 바람직하게는 시작점에 있는 번역 개시 부위 및 번역될 mRNA의 말단에 적절하게 위치한 종결 코돈(예를 들어, UAA, UGA, 또는 UAG)을 포함할 것이며, 포유류 또는 진핵 세포 발현에는 UAA 및 UAG가 바람직하다.
- [0092] 발현 벡터는 바람직하게, 그러나 선택적으로 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함할 것이다. 그러한 마커는, 예를 들어, 진핵 세포 배양을 위한 메토타렉세이트(MTX), 다이하이드로폴레이트 리덕타아제(DHFR, 미국 특허 제 4,399,216호; 제4,634,665호; 제4,656,134호; 제4,956,288호; 제5,149,636호; 제5,179,017호), 암피실린, 네오마이신(G418), 마이코페놀산, 또는 글루타민 신테타아제(GS, 미국 특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 제5,827,739호) 내성 및 *E. 콜라이(E. coli)* 및 다른 박테리아 또는 원핵세포에서의 배양을 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함하지만 이에 한정되지 않는다(상기 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 상술한 숙주 세포에 적절한 배양 배지 및 조건이 본 기술 분야에 알려져 있다. 적절한 벡터는 당업자에게 명백할 것이다. 숙주 세포 내로의 벡터 구조물의 도입은 인산칼슘 형질주입, DEAE-텍스트란 매개 형질주입, 양이온성 지질 매개 형질주입, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 문헌[Sambrook, 상기 문헌, 챕터 1-4 및 16-18]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 1, 9, 13, 15, 16]과 같이 본 기술 분야에 기재되어 있다.
- [0093] 본 발명의 하나 이상의 항체는 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있고, 분비 신호뿐만 아니라 추가의 이중성 기능성 영역 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 정제 동안, 또는 후속 취급 및 저장 동안 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선시키기 위해 항체의 N-말단에 첨가될 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티가 정제를 용이하게 하기 위해 본 발명의 항체에 첨가될 수 있다. 이러한 영역은 항체 또는 적어도 하나의 이의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Sambrook, 상기 문헌, 챕터 17.29-17.42 및 18.1-18.74]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, 챕터 16, 17, 및 18]에 기재되어 있다.
- [0094] 당업자는 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산의 발현에 이용가능한 많은 발현 시스템에 대해 잘 알고 있다.
- [0095] 대안적으로, 본 발명의 핵산은 본 발명의 항체를 암호화하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포에서 (조작에 의한) 턴온(turn on)에 의해 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호 및 제5,733,761호에 기재되어 있는 바와 같이 본 기술 분야에 알려져 있다.
- [0096] 항체, 이의 특정 부분 또는 변이체의 생성에 유용한 세포 배양물의 예는 포유류 세포이다. 포유류 세포 시스템은 종종 세포의 단일층 형태로 존재할 수 있지만, 포유류 세포 현탁액 또는 생물반응기도 사용될 수 있다. 온전한 글리코실화 단백질을 발현할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 본 기술 분야에 개발되어 있고, COS-1(예를 들어, ATCC CRL 1650), COS-7(예를 들어, ATCC CRL1651), HEK293, BHK21(예를 들어, ATCC CRL-10), CHO(예를 들어, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예를 들어, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함하며, 이들은, 예를 들어 미국 버지니아주 매나서스 소재의 American Type Culture Collection(www.atcc.org)으로부터 용이하게 입수가 가능하다. 바람직한 숙주 세포는 림프구 기원의 세포, 예컨대 골수종 및 림프종 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 실시 형태에서, 재조합 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.
- [0097] 이들 세포에 대한 발현 벡터는 하기 발현 제어 서열 중 하나 이상, 비제한적인 예로서 복제 기원; 프로모터(예를 들어, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 제5,168,062호; 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 제5,266,491호), 하나 이상의 인간 번역글로불린 프로모터; 인핸서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예를 들어, SV40 라지 T Ag 폴리 A 부가 부위), 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., 상기 문헌]; 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]을 참조한다. 본 발

명의 핵산 또는 단백질 생성에 유용한 다른 세포가 알려져 있고/있거나, 예를 들어 세포주 및 하이브리도마의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 카탈로그 (www.atcc.org) 또는 다른 공지의 또는 상업 공급원으로부터 이용가능하다.

[0098] 진핵 숙주 세포가 사용될 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결자 서열은 전형적으로 벡터에 통합된다. 종결자 서열의 예는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사물의 정확한 스플라이싱을 위한 서열도 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40으로부터의 VP1 인트론이다 (문헌[Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781, (1983)]). 추가로, 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 숙주 세포 내의 복제를 조절하는 유전자 서열은 벡터 내로 혼입될 수 있다.

[0099] **항체의 정제.** 항-TNF 항체는 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하지만 이에 한정되지 않는 잘 알려진 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 ("HPLC")도 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 문헌[Colligan, Current Protocols in Immunology] 또는 문헌[Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 예를 들어, 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10]을 참조한다.

[0100] 본 발명의 항체는 천연 정제된 생성물, 화학적 합성 절차의 생성물, 및 예를 들어 효모, 고등 식물, 곤충, 및 포유류 세포를 포함하는 진핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물을 포함한다. 재조합 생산 절차에 사용된 숙주에 따라, 본 발명의 항체는 글리코실화되거나 비-글리코실화될 수 있으며, 글리코실화가 바람직하다. 이러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Sambrook, 상기 문헌, 섹션 17.37-17.42]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, 챕터 10, 12, 13, 16, 18, 및 20], 문헌[Colligan, Protein Science, 상기 문헌, 챕터 12-14]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0101] **항-TNF 항체**

[0102] 서열 번호 1, 2, 및 3의 중쇄 가변 CDR 영역의 전부 및/또는 서열 번호 4, 5, 및 6의 경쇄 가변 CDR 영역의 전부를 포함하는 본 발명의 단리된 항체는 임의의 적합한 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 본 명세서에 개시된 항체 아미노산 서열, 또는 임의의 단리되거나 제조된 항체를 포함한다. 바람직하게는, 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 TNF에 결합함으로써 단백질의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 실질적으로 중화시킨다. 하나 이상의 TNF 단백질 또는 단편의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 바람직하게는 실질적으로 중화시키는 항체, 이의 특정 부분, 또는 변이체는 단백질 또는 단편에 결합함으로써 TNF 수용체에 대한 TNF의 결합을 통해 또는 다른 TNF-의존성 또는 TNF-매개 기전을 통해 매개되는 활성을 억제할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중화 항체"는 TNF-의존성 활성을 검정에 따라 약 20 내지 120% 만큼, 바람직하게는 약 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 이상 만큼 억제할 수 있는 항체를 지칭한다. TNF-의존성 활성을 억제하는 항-TNF 항체의 능력은 바람직하게는 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 하나 이상의 적합한 TNF 단백질 또는 수용체 검정에 의해 평가된다. 본 발명의 인간 항체는 임의의 부류(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등) 또는 동종형일 수 있으며, 카파 또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 인간 항체는 IgG 중쇄 또는 정의된 단편, 예를 들어, 동종형, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 하나 이상을 포함한다. 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 하나 이상의 인간 경쇄(예를 들어, IgG, IgA) 및 IgM(예를 들어, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$) 트랜스유전자를 포함하는 트랜스제닉 마우스 또는 다른 트랜스제닉 인간외 포유류를 사용함으로써 이러한 유형의 항체가 제조될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 항-인간 TNF 인간 항체는 IgG1 중쇄 및 IgG1 경쇄를 포함한다.

[0103] 본 발명의 하나 이상의 항체는 하나 이상의 TNF 단백질, 서브유닛, 단편, 부분, 또는 이들의 임의의 조합에 특이적인 하나 이상의 특정 에피토프에 결합한다. 하나 이상의 에피토프는 상기 단백질의 하나 이상의 부분을 포함하는 하나 이상의 항체 결합 영역을 포함하고, 에피토프는 바람직하게는 상기 단백질의 하나 이상의 세포외, 가용성, 친수성, 외부, 또는 세포질 부분으로 이루어진다. 하나 이상의 특정 에피토프는 서열 번호 9의 연속 아미노산의 전체 특정 부분에 대한 1 내지 3 개 이상의 아미노산 중 하나 이상의 아미노산 서열의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0104] 일반적으로, 본 발명의 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 하나 이상의 중쇄 가변 영역의 하나 이상의 인간 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2, 및 CDR3) 또는 변이체 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 인간 상보성 결

정 영역(CDR1, CDR2, 및 CDR3) 또는 변이체를 포함하는 항원-결합 영역을 포함할 것이다. 비제한적인 예로서, 항체 또는 항원-결합 부분 또는 변이체는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3, 및/또는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 특정 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 상응하는 CDR 1, 2, 및/또는 3의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 1, 2, 및/또는 3)을 갖는 하나 이상의 중쇄 CDR(즉, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)의 적어도 일부를 포함하는 항원-결합 영역을 가질 수 있다. 다른 특정 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 부분 또는 변이체는 상응하는 CDR 1, 2, 및/또는 3의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 4, 5, 및/또는 6)을 갖는 하나 이상의 경쇄 CDR(즉, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)의 적어도 일부를 포함하는 항원-결합 영역을 가질 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 3 개의 중쇄 CDR 및 3 개의 경쇄 CDR은 본 명세서에 기재된 바와 같은 mAb TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV118, TNV32, TNV86 중 하나 이상의 상응하는 CDR의 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 항체는 통상의 기술을 사용하여 항체의 다양한 부분 (예를 들어, CDR, 프레임워크)을 함께 화학적으로 연결하거나, 통상의 재조합 DNA 기술 방법을 사용하여 항체를 암호화하는 (즉, 하나 이상의) 핵산 분자를 제조하고 발현시키거나, 임의의 다른 적절한 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0105] 항-TNF 항체는 정의된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시 형태에서, 항-TNF 항체는 임의로 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및/또는 임의로 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 경쇄 가변 영역 중 하나 이상을 포함한다. 파지 디스플레이와 같은 적합한 방법(문헌[Katsube, Y., et al., *Int J Mol. Med*, 1(5):863-868 (1998)]) 또는 트랜스제닉 동물을 사용하는 방법을 사용하여, 본 기술 분야에 알려지고/알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이, 인간 TNF에 결합하고 정의된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자 및 기능적으로 재배열될 수 있는 인간 면역글로불린 경쇄 유전자로부터의 DNA를 포함하는 트랜스유전자를 포함하는 트랜스제닉 마우스를 인간 TNF 또는 이의 단편으로 면역화하여 항체의 생산을 유도할 수 있다. 필요한 경우, 항체 생성 세포가 단리될 수 있고, 하이브리도마 또는 다른 무한증식 항체-생성 세포는 본 명세서에 기재된 및/또는 본 기술 분야에 알려진 바와 같이 제조될 수 있다. 대안적으로, 항체, 특정 부분 또는 변이체는 적합한 숙주 세포에서 코딩 핵산 또는 이의 일부를 사용하여 발현될 수 있다.

[0106] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항체, 항원-결합 단편, 면역글로불린 사슬 및 CDR에 관한 것이다. 바람직하게는, 그러한 항체 또는 항원-결합 단편 및 그러한 사슬 또는 CDR을 포함하는 항체는 높은 친화도(예를 들어, 약 10^{-9} M 이하의 K_D)로 인간 TNF에 결합할 수 있다. 본 명세서에 기재된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환 및 아미노산 결실 및/또는 삽입을 포함하는 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 제1 아미노산의 것들과 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성(예를 들어, 전하, 구조, 극성, 소수성/친수성)을 갖는 제2 아미노산에 의한 제1 아미노산의 대체를 지칭한다. 보존적 치환은 하기 군 내의 하나의 아미노산의 다른 아미노산에 의한 대체를 포함한다: 라이신(K), 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 아스파테이트 (D) 및 글루타메이트 (E); 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q), 세린 (S), 트레오닌 (T), 티로신 (Y), K, R, H, D 및 E; 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 아이소류신 (I), 프롤린 (P), 페닐알라닌 (F), 트립토판 (W), 메티오닌 (M), 시스테인 (C) 및 글라이신 (G); F, W 및 Y; C, S 및 T.

[0107] **아미노산 코드.** 본 발명의 항-TNF 항체를 구성하는 아미노산은 종종 약어로 표시된다. 아미노산 표기는 본 기술 분야에서 잘 이해되는 바와 같이 아미노산을 그의 1문자 코드, 그의 3문자 코드, 명칭, 또는 3뉴클레오타이드 코돈(들)에 의해 표기함으로써 표시할 수 있다 (문헌[Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994] 참조):

1 문자 코드	3 문자 코드	명칭	3 뉴클레오타이드 코드(들)
A	Ala	알라닌	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	시스테인	UGC, UGU
D	Asp	아스파르트산	GAC, GAU
E	Glu	글루탐산	GAA, GAG
F	Phe	페닐알라닌	UUC, UUU
G	Gly	글리신	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	히스티딘	CAC, CAU
I	Ile	아이소류신	AUA, AUC, AUU
K	Lys	라이신	AAA, AAG
L	Leu	류신	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	메티오닌	AUG
N	Asn	아스파라긴	AAC, AAU
P	Pro	프롤린	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	글루타민	CAA, CAG
R	Arg	아르기닌	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	세린	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	트레오닌	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	발린	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	트립토판	UGG
Y	Tyr	티로신	UAC, UAU

[0108]

[0109]

본 명세서에 특정된 바와 같이, 본 발명의 항-TNF 항체는 천연 돌연변이 또는 인간에 의한 조작으로부터의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 포함할 수 있다.

[0110]

물론, 당업자가 실행할 아미노산 치환의 수는 상기 기재된 것들을 포함하는 다수의 인자에 따라 달라진다. 일반적으로 말하면, 임의의 주어진 항-TNF 항체, 단편, 또는 변이체에 대한 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실의 수는 본 명세서에 특정된 바와 같이 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 개 이하, 예컨대 1 내지 30 개 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값일 것이다.

[0111]

기능에 필수적인 본 발명의 항-TNF 항체 내의 아미노산을 본 기술 분야에 알려진 방법, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌, 챕터 8, 15]; 문헌[Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989)])에 의해 확인할 수 있다. 후자의 절차는 분자 내의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이어서, 생성되는 돌연변이 분자를 하나 이상의 TNF 중화 활성과 같으나 이에 한정되지 않는 생물학적 활성에 대해 시험한다. 결정화, 핵자기 공명, 또는 광친화도 표지화(문헌[Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992)] 및 문헌[de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)])와 같은 구조 분석에 의해 항체 결합에 결정적인 부위를 또한 확인할 수 있다.

[0112]

본 발명의 항-TNF 항체는 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 중 하나 이상의 연속 아미노산 중 1 개 내지 전부로부터 선택된 하나 이상의 부분, 서열, 또는 조합을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0113]

추가로, 항-TNF 항체는 서열 번호 7, 8 중 하나 이상의 연속 아미노산의 70 내지 100% 중 하나 이상의 폴리펩티드를 임의로 포함할 수 있다.

[0114]

일 실시 형태에서, 면역글로불린 사슬, 또는 이의 부분(예를 들어 가변 영역, CDR)의 아미노산 서열은 서열 번호 7, 8 중 하나 이상의 상응하는 사슬의 아미노산 서열에 대해 약 70 내지 100%의 동일성(예를 들어, 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, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)을 갖는다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열 번호 8의 서열과 비교할 수 있거나, 중쇄 CDR3의 아미노산 서열을 서열 번호 7과 비교할 수 있다. 바람직하게는, 70 내지 100%의 아미노산 서열 동일성 (즉, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값)을 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 적합한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여

결정한다.

- [0115] 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 서열 번호 7, 8에 제공된다. 본 발명의 항체 또는 이의 특정 변이체는 본 발명의 항체로부터의 임의의 수의 연속 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며, 여기서 그 수는 항-TNF 항체 내의 연속 잔기의 수의 10 내지 100%로 이루어진 정수의 군으로부터 선택된다. 선택적으로, 연속 아미노산의 이러한 하위서열(subsequence)의 길이는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250개 이상의 아미노산 또는 그 범위 내의 임의의 범위 또는 값이다. 추가로, 상기 하위서열의 수는 1 내지 20, 예를 들어 적어도 2, 3, 4 또는 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 정수일 수 있다.
- [0116] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 생물학적으로 활성인 항체를 포함한다. 생물학적으로 활성인 항체는 천연(비-합성), 내인성, 또는 관련되고 알려진 항체의 것의 20%, 30%, 또는 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60%, 또는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80%, 90%, 또는 95% 내지 100% 이상인 고유 활성(specific activity)을 갖는다. 효소 활성 및 기질 특이성의 검정 방법 및 정량화 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0117] 다른 양태에서, 본 발명은 유기 모이어티의 공유 부착에 의해 변형된, 본 명세서에 기재된 인간 항체 및 항원-결합 단편에 관한 것이다. 이러한 변형은 약물동태학적 특성이 개선된 (예를 들어, 생체내 혈청 반감기 증가) 항체 또는 항원-결합 단편을 생성할 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지형 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 친수성 중합체기는 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있으며, 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르기는 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.
- [0118] 본 발명의 변형된 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접 또는 간접적으로 공유결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 결합되는 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산"은 모노-카르복실산 및 다이-카르복실산을 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "친수성 중합체기"는 옥탄 중에서보다 수중에서 더 가용성인 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리라이신은 옥탄 중에서보다 수중에서 더 가용성이다. 따라서, 폴리라이신의 공유 부착에 의해 변형된 항체가 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체의 변형에 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 예를 들어 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등), 탄수화물 (예를 들어, 텍스트란, 셀룰로오스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예를 들어, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 (예를 들어, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 엔티티(entity)로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 예를 들어, PEG₅₀₀₀ 및 PEG_{20,000}이 사용될 수 있으며, 여기서 아래첨자는 달톤 단위의 중합체의 평균 분자량이다. 친수성 중합체기는 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환된 친수성 중합체를 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 아민기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트와 커플링될 수 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트 (예를 들어, N,N-카르보닐 다이이미다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 히드록실기와 커플링될 수 있다.
- [0119] 본 발명의 항체의 변형에 적합한 지방산과 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나, 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 발명의 항체를 변형시키기에 적합한 지방산은, 예를 들어 n-도데카노에이트(C₁₂, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C₁₄, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C₁₈, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C₂₀, 아라키테이트), n-도코사노에이트(C₂₂, 베헤네이트), n-트라이아콘타노에이트(C₃₀), n-테트라콘타노에이트(C₄₀), 시스-Δ⁹-옥타데카노에이트(C₁₈, 올레에이트), 모든 시스-Δ^{5,8,11,14}-에이코사테트라에노에이트(C₂₀, 아라키도네이트), 옥탄다이오산, 테트라데칸다이오산, 옥타데칸다이오산, 도코산다이오산 등을 포함된다. 적합한 지방산 에스테르에는 선형 또는 분지형 저급 알킬기 포함하는 다이카르복실산의 모노-에스테르가 포함된다. 저급 알킬기는 1 내지 약 12 개, 바람직하게는 1 내지 약 6 개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.
- [0120] 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "변형제"는 활성화기를 포함하는 적합한 유기기 (예를 들어

어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 지칭한다. "활성화기"는 적절한 조건 하에 제2 화학기와 반응하여 변형체와 제2 화학기 사이의 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화기에는 토실레이트, 메실레이트, 할로(클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시석신이미딜 에스테르(NHS) 등과 같은 친전자성 기가 포함된다. 티올과 반응할 수 있는 활성화기에는, 예를 들어 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴로일, 피리딜 다이설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등이 포함된다. 알데히드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자와 커플링될 수 있고, 아지드기는 3가 인산기와 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포리미드 결합을 형성할 수 있다. 활성화기를 분자 내로 도입하기에 적합한 방법은 본 기술 분야에 알려져 있다 (예를 들어, 문헌[Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]을 참조한다). 활성화기는 유기기(예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접 결합되거나, 링커 모이어티, 예를 들어 2가 C₁ 내지 C₁₂ 기(여기서 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소, 또는 황과 같은 헤테로원자에 의해 대체될 수 있음)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티에는, 예를 들어, 테트라에틸렌 글리콜, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ 및 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 가 포함된다. 예를 들어, 모노-Boc-알킬다이아민 (예를 들어, 모노-Boc-에틸렌다이아민, 모노-Boc-다이아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이미드 (EDC)의 존재 하에 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 링커 모이어티를 포함하는 변형체를 제조할 수 있다. 기재된 바와 같이, 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나, 말레산 무수물과 반응시키고 생성되는 생성물을 환화하여 지방산의 활성화 말레이미도 유도체를 생성할 수 있는 1차 아민을 노출시키기 위해, 트라이플루오로아세트산(TFA)으로 처리함으로써 생성물로부터 Boc 보호기를 제거할 수 있다. (예를 들어, 그의 전체 교시 내용이 본 명세서에 참고로 포함된 WO 92/16221(Thompson 등)을 참조한다.)

[0121] 본 발명의 변형된 항체는 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 변형체와 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민-반응성 변형체, 예를 들어 PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 부위 비특이적 방식으로 항체에 결합될 수 있다. 변형된 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 이황화 결합 (예를 들어, 사슬내 이황화 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편을 티올-반응성 변형체와 반응시켜 본 발명의 변형된 항체를 제조할 수 있다. 본 발명의 항체의 특이적인 부위에 결합하는 유기 모이어티를 포함하는 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예컨대 역단백질 분해(reverse proteolysis)(문헌[Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992)]; 문헌[Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994)]; 문헌[Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997)]; 문헌[Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996)]; 문헌[Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)]), 및 문헌[Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다

[0122] **항-Tnf 항체에 대한 항-개별특이형 항체 조성물.** 단클론 또는 키메라 항-TNF 항체에 더하여, 본 발명은 또한 본 발명의 그러한 항체에 특이적인 항-개별특이형(항-Id) 항체에 관한 것이다. 항-Id 항체는 다른 항체의 항원-결합 영역과 일반적으로 관련된 독특한 결정자를 인식하는 항체이다. 항체 또는 그의 CDR 함유 영역을 갖는 Id 항체의 공급원과 동일한 종 및 유전자 유형의 동물(예를 들어, 마우스 품종)을 면역화함으로써 항-Id를 제조할 수 있다. 면역화 동물은 면역화 항체의 개별특이형 결정자를 인식하고 반응하여 항-Id 항체를 생성할 것이다. 항-Id 항체는 또한 "면역원"으로서 사용되어 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하여, 소위 항-항-Id 항체를 생산할 수 있다.

[0123] **항-Tnf 항체 조성물.** 본 발명은 또한, 비-천연 발생 조성물, 혼합물, 또는 형태로 제공되는, 본 명세서에 기재되고/되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 1 개 이상, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상, 5 개 이상, 6 개 이상의 이의 항-TNF 항체를 포함하는 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8의 연속 아미노산의 70 내지 100%, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 항-TNF 항체 아미노산 서열의 1 개 또는 2 개 이상의 전장, C- 및/또는 N-말단 결실 변이체, 도메인, 단편, 또는 특정 변이체를 포함하는 비-천연 발생 조성물을 포함한다. 바람직한 항-TNF 항체 조성물은 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6의 70 내지 100%의 항-TNF 항체 서열 중의 일부, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체를 함유하는 하나 이상의 CDR 또는 LBR로서 1 개 또는 2 개 이상의 전장, 단편, 도메인, 또는 변이체를 포함한다. 추가로 바람직한 조성물은 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6의 70 내지 100% 중 하나 이상의 40 내지 99%, 또는 이의 특정 단편, 도메인, 또는 변이체를 포함한다. 본 기술 분야에 알려지거나 본 발명에 기재된 바와 같이, 그러한 조성 백분율은 액체 또는 건조 용액, 혼합물, 현탁액, 에멀전, 또는 콜로이드로서 중

량, 부피, 농도, 몰 농도, 몰랄 농도를 기준으로 한다.

[0124]

본 발명의 항-TNF 항체 조성물은, 그러한 조정, 치료, 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에 대한 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하고, 임의로 하나 이상의 TNF 길항제(비제한적인 예를 들어, TNF 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 또는 단편, 이의 융합 단백질, 또는 소분자 TNF 길항제), 항류마티스제(예를 들어, 메토타렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노미드, 설파살진), 근육 이완제, 안정제, 비스테로이드 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제(예를 들어, 아미노글리코사이드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 설펜아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 항건선제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 제제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항궤양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴(예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티프(예를 들어, G-CSF, Neupogen), 사르그라모스티프(GM-CSF, Leukine), 면역화, 면역글로불린, 면역억제제(예를 들어, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병제, 불안 완화제, 수면제, 교감신경자극제, 자극제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입용 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파(Pulmozyme), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는, 하나 이상의 조성물 또는 약제학적 조성물의 임의의 적합한 유효량을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 사이토카인의 비제한적인 예는 IL-1 내지 IL-23 중 임의의 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 적합한 투여량은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]을 참조하며, 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0125]

그러한 항암제 또는 항감염제는 하나 이상의 본 발명의 항체와 회합, 결합, 동시-제형화 또는 동시 투여되는 독소 분자를 또한 포함할 수 있다. 독소는 임의로 병리학적 세포 또는 조직을 선택적으로 살해하는 작용을 할 수 있다. 병리학적 세포는 암 또는 다른 세포일 수 있다. 그러한 독소는, 예를 들어 리신, 디프테리아 독소, 벵놈 독소, 또는 박테리아 독소 중 하나 이상으로부터 선택된 독소의 하나 이상의 기능적 세포독성 도메인을 포함하는 정제되거나 재조합된 독소 또는 독소 단편일 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 용어 독소는 또한, 사멸을 유발할 수 있는 독소 쇼크를 포함하는, 인간 및 다른 포유류에서 임의의 병리학적 병태를 야기할 수 있는 임의의 천연 발생 돌연변이 또는 재조합 박테리아 또는 바이러스에 의해 생산되는 내독소 및 외독소 둘 모두를 포함한다. 그러한 독소는 장독성 이. 콜라이 열-불안정성 장독소(LT), 열-안정성 장독소(ST), 시겔라(*Shigella*) 세포독소, 아에로모나스(*Aeromonas*) 장독소, 독성 쇼크 증후군 독소-1(TSST-1), 스탕필로코커스(*Staphylococcus*) 장독소 A(SEA), B(SEB), 또는 C(SEC), 스탕필로코커스 장독소 등을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 그러한 박테리아는 장독성 이. 콜라이(ETEC), 장출혈성 이. 콜라이(예를 들어, 혈청형 0157:H7의 균주), 스탕필로코커스 종(예를 들어, 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코커스 피오게네스(*Staphylococcus pyogenes*)), 시겔라 종(예를 들어, 시겔라 디센테리아(*Shigella dysenteriae*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 시겔라 보이디(*Shigella boydii*), 및 시겔라 소네이(*Shigella sonnei*)), 살모넬라 종(예를 들어, 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 콜레라-수이스(*Salmonella cholera-suis*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)), 클로스트리듐(*Clostridium*) 종(예를 들어, 클로스트리듐 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)), 캄플로박터(*Camphlobacter*) 종(예를 들어, 캄플로박터 제주니(*Camphlobacter jejuni*), 캄플로박터 페투스(*Camphlobacter fetus*)), 헬리옥박터(*Helioibacter*) 종(예를 들어, 헬리옥박터 파일로리(*Helioibacter pylori*)), 에어로모나스(*Aeromonas*) 종(예를 들어, 에어로모나스 소브리아(*Aeromonas sobria*), 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에어로모나스 카비아(*Aeromonas caviae*)), 플레이소모나스 시겔로이데스(*Pleisomonas shigelloides*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 비브리오(*Vibrio*) 종(예를 들어, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*ibrio parahemolyticus*)), 클렙시엘라(*Klebsiella*) 종, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 스트렙토코카이(*Streptococci*)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990)]; 문헌[Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991)]; 문헌[Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d.

Ed., Churchill Livingstone, New York (1990)]; 문헌[Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992]; 문헌[Wood et al, *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991)]; 문헌[Marrack et al, *Science*, 248:705-711 (1990)]을 참조하며, 이들 참고문헌의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0126] 본 발명의 항-TNF 항체 화합물, 조성물, 또는 조합은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 보조제 등과 같으나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 임의의 적합한 보조제(auxiliary)를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 보조제가 바람직하다. 이러한 무균 용액의 제조 방법의 비제한적인 예는 문헌[Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990]과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 문헌에 기재된 바와 같이 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 본 기술 분야에 잘 알려지거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 항-TNF 항체, 단편, 또는 변이체 조성물의 투여 방식, 용해도, 및/또는 안정성에 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체는 일상적으로 선택될 수 있다.

[0127] 본 조성물에 유용한 약제학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당류를 포함하는 당; 유도체화된 당, 예컨대 알디톨, 알도산, 에스테르화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이는 단독으로 또는 조합하여 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%를 차지하면서 개별적으로 또는 조합하여 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충 용량에서도 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글라이신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 바람직한 아미노산은 글라이신이다.

[0128] 본 발명에 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는, 예를 들어, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등과 같은 다당류; 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨), 미오이노시톨 등과 같은 알디톨을 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스 및 라피노스이다.

[0129] 항-TNF 항체 조성물은 완충제 또는 pH 조절제를 또한 포함할 수 있으며; 전형적으로, 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 석신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산 염; 트리스, 트로메타민 염산염 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 조성물에 사용하기에 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기산 염이다.

[0130] 추가로, 본 발명의 항-TNF 항체 조성물은 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체 당), 텍스트레이트(예를 들어, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향미제, 향미생물제, 감미제, 향산화제, 대전방지제, 계면활성제(예를 들어, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80"과 같은 폴리소르베이트), 지질(예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이트제(예를 들어, EDTA)와 같은 중합체 부형제/첨가제를 포함할 수 있다.

[0131] 본 발명에 따른 항-TNF 항체, 부분, 또는 변이체 조성물에 사용하기에 적합한 이들 및 추가의 알려진 약제학적 부형제 및/또는 첨가제는, 예를 들어 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995)], 및 문헌["Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)]에 열거된 바와 같이 본 기술 분야에 알려져 있으며, 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물 (예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제 (예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체 물질이다.

[0132] **제형.** 상기 언급된 바와 같이 본 발명은, 약제학적으로 허용가능한 제형 내에 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는, 바람직하게는 식염수 또는 선택된 염을 갖는 인산염 완충제인 안정한 제형과 더불어, 보존제를 함유하는 보존된 용액 및 제형 및 약제학적 또는 수의학적 용도에 적합한 다용도의 보존된 제형을 제공한다. 보존된 제형은 하나 이상의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐머큐릭 니트라이드, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘 (예를 들어, 6수화물), 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 데하이드로아세트산나트륨 및 티메로살, 또는 수성 희석제 중의 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 하나 이상의 공지의 보존제를 함유한다. 임의의 적합한 농도 또는 혼합물, 예컨대 0.001 내지 5%, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값, 비제한

적인 예를 들어 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, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값이 본 기술 분야에 알려진 바와 같이 사용될 수 있다. 비제한적인 예는 보존제를 포함하지 않거나, 0.1 내지 2%의 m-크레졸(예를 들어, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1 내지 3%의 벤질 알코올(예를 들어, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001 내지 0.5%의 티메로살(예를 들어, 0.005, 0.01), 0.001 내지 2.0%의 페놀(예를 들어, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005 내지 1.0%의 알킬파라벤(들)(예를 들어, 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%) 등을 포함한다.

[0133] 상기 언급된 바와 같이 본 발명은, 포장 재료, 및 임의로 수성 희석제 내의 처방된 완충제 및/또는 보존제와 함께 하나 이상의 항-TNF 항체의 용액을 포함하는 하나 이상의 바이알을 포함하는 제조 물품을 제공하며, 상기 포장 재료는 그러한 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 시간 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있음을 표시하는 표지를 포함한다. 본 발명은 포장 재료, 동결건조된 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 제1 바이알, 및 처방된 완충제 또는 보존제의 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알을 포함하는 제조 물품을 추가로 포함하며, 상기 포장 재료는 하나 이상의 항-TNF 항체를 수성 희석제 내에 재구성하여 24 시간 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있는 용액을 형성하도록 환자에게 지시하는 표지를 포함한다.

[0134] 본 발명에 따라 사용되는 하나 이상의 항-TNF 항체는 포유류 세포 또는 트랜스제닉 제조를 포함하는 제조합 수단에 의해 생산될 수 있거나, 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.

[0135] 본 발명의 생성물에서 하나 이상의 항-TNF 항체의 범위는 재구성시에, 습윤/건조 시스템에서의 경우, 약 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 1000 mg/ml 의 농도를 산출하는 양을 포함하지만, 더 낮거나 높은 농도가 사용가능하고 의도하는 전달 비히클에 좌우되며, 예를 들어 용액 제형은 경피 패치, 패, 경점막, 또는 삼투압 또는 마이크로 펌프 방법과는 상이할 것이다.

[0136] 바람직하게는, 선택적으로 수성 희석제는 약제학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 바람직한 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 데하이드로아세트산나트륨 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함한다. 제형 내에 사용되는 보존제의 농도는 항-미생물 효과를 내기에 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택된 보존제에 좌우되며, 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0137] 다른 부형제, 예를 들어 등장화제, 완충제, 산화방지제, 보존제 인헨서가 임의로 바람직하게 희석제에 첨가될 수 있다. 글리세린과 같은 등장화제는 공지의 농도에서 통상 사용된다. 생리학상 허용되는 완충제는 바람직하게는 향상된 pH 제어를 제공하기 위해 첨가된다. 제형은 약 pH 4 내지 약 pH 10과 같은 넓은 범위의 pH를 포함할 수 있고, 바람직한 범위는 약 pH 5 내지 약 pH 9이며, 가장 바람직한 범위는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 바람직하게는 본 발명의 제형은 약 6.8 내지 약 7.8의 pH를 갖는다. 바람직한 완충제는 인산염 완충제, 가장 바람직하게는 인산나트륨, 특히 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다.

[0138] 약제학적으로 허용가능한 가용화제, 예를 들어 Tween 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), Tween 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), Tween 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레이트), Pluronic F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉® 폴리올, 다른 블록 공중합체, 및 킬레이트제, 예컨대 EDTA 및 EGTA와 같은 다른 첨가제가 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 임의로 첨가될 수 있다. 이러한 첨가제는 펌프 또는 플라스틱 용기가 제형을 투여하기 위해 사용될 경우에 특히 유용하다. 약제학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재는 단백질 응집 성향을 완화시킨다.

[0139] 본 발명의 제형은 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 디하이드로아세테이트 및 티메로살 또는 수성 희석제 중의 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 보존제와 하나 이상의 항-TNF 항체를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중에 하나 이상의 항-TNF 항체와 보존제를 혼합하는 단계는 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 실행한다. 적합한 제형을 제조하기 위해, 예를 들어, 원하는 농도의 단백질 및 보존제를 제공하기에 충분한 양으로 완충 용액 중의 측정된 양의 하나 이상의 항-TNF 항체를 완충 용액 중의 원하는 보존제와 조합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를

들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0140] 특허 청구되는 제형은 투명한 용액으로서, 또는 물, 보존제, 및/또는 부형제, 바람직하게는 인산염 완충제 및/또는 식염수 및 선택된 염을 수성 희석제 중에 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 하나 이상의 항-TNF 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0141] 본 발명의 특허 청구되는 제조 물품은 즉시 내지 24 시간 이상의 기간에 걸쳐 투여하는 데 유용하다. 따라서, 본 발명에서 청구되는 제조 물품은 환자에게 상당한 이점을 준다. 본 발명의 제형은 임의로 약 2 내지 약 40℃의 온도에서 안전하게 저장되고 연장된 기간의 시간 동안 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있으며, 따라서 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96 시간 이상의 기간에 걸쳐 용액이 유지 및/또는 사용될 수 있음을 패키지 표지에 표시하는 것이 가능하다. 보존된 희석제가 사용된 경우, 상기 라벨은 1 내지 12달, 반년, 1년 반 및/또는 2년의 사용을 포함할 수 있다.

[0142] 본 발명에서 하나 이상의 항-TNF 항체의 용액은 수성 희석제 중에 하나 이상의 항체를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 혼합을 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 희석제를 제조하기 위하여, 예를 들어 원하는 농도의 단백질 및 임의로 보존제 또는 완충제를 제공하기에 충분한 양으로 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 하나 이상의 항체를 조합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0143] 특허 청구되는 생성물은 투명한 용액으로서, 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 하나 이상의 항-TNF 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있으며, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0144] 특허 청구되는 생성물은 투명한 용액, 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결된 하나 이상의 항-TNF 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알을 약국, 병원, 또는 그러한 다른 기관 및 시설에 제공함으로써 환자에게 간접적으로 제공될 수 있다. 이 경우 투명한 용액은 1리터 또는 그보다 훨씬 더 큰 크기일 수 있는데, 소량의 적어도 하나의 항체 용액을 1회 또는 다회 회수하여 소량의 바이알에 옮기고, 약국 또는 병원을 통해 고객 및/또는 환자에게 제공할 수 있는 큰 저장고를 제공한다.

[0145] 이들 단일 바이알 시스템을 포함하는 공인된 장치는, 예를 들어, Becton Dickenson(미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, www.bectondickenson.com), Disetronic(스위스 부르그도르프 소재, www.disetronic.com); 미국 오리곤주 포틀랜드 소재의 Bioject(www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical(영국 피터 버러 소재, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp(미국 미네소타주 미니애폴리스 소재, www.mediject.com)에 의해 제조되거나 개발된 바와 같은 용액 전달을 위한 펜-주입기 장치(pen-injector device), 예컨대 BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®], NovoPen[®], B-D[®]Pen, AutoPen[®], 및 OptiPen[®], GenotropinPen[®], GenotroNorm Pen[®], Humatro Pen[®], Reco-Pen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®]를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 공인된 장치는 HumatroPen[®]과 같은 재구성된 용액의 전달을 위한 카트리지 내의 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜-주입기 시스템을 포함한다.

[0146] 현재 특허 청구되는 생성물은 포장 재료를 포함한다. 포장 재료는 규제 당국이 요구하는 정보 이외에 제품을 사용할 수 있는 조건을 제공한다. 본 발명의 포장 재료는 2 개의 바이알, 습윤/건조 생성물에 대하여 하나 이상의 항-TNF 항체를 수성 희석제 중에 재구성하여 용액을 형성하고 용액을 2 내지 24 시간 이상의 기간에 걸쳐 사용하도록 하는 설명서를 환자에게 제공한다. 단일 바이알, 용액 생성물의 경우, 표지는 그러한 용액을 2 내지 24 시간 이상의 기간에 걸쳐 사용할 수 있음을 나타낸다. 현재 특허 청구되는 생성물은 인간의 의약품 용도로 유용하다.

[0147] 본 발명의 제형은 하나 이상의 항-TNF 항체 및 선택된 완충제, 바람직하게는 식염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중에 하나 이상의 항체

와 완충제를 혼합하는 단계는 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 실행한다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 적어도 하나의 항체를, 원하는 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기 충분한 양의 수중의 원하는 완충제와 배합한다. 이러한 방법의 변형법이 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0148] 특허 청구되는 안정하거나 보존된 제형은 투명한 용액으로서, 또는 수성 희석제 중의 보존제 또는 완충제 및 부형제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 하나 이상의 항-TNF 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 필요한 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있으며, 환자 치료의 단일 또는 다수의 사이클에 충분하므로 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0149] 본 명세서에 기재된 안정하거나 보존된 제형 또는 용액 중의 하나 이상의 항-TNF 항체는 SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 임플란트, 삼투압 펌프, 카트리지, 마이크로펌프, 또는 본 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 당업자가 인정하는 다른 수단을 포함하는 다양한 전달 방법을 통해 본 발명에 따라 환자에게 투여될 수 있다.

[0150] **치료적 응용.** 본 발명은 또한, 본 기술 분야에 공지되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 이중 인테그린 항체를 사용하여 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 하나 이상의 TNF 관련 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0151] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 비만, 면역 관련 질환, 심혈관 질환, 감염성 질환, 악성 질환, 또는 신경 질환 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 TNF 관련 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0152] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 류마티스 관절염, 연소성, 전신 발현 연소성 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 강직성 척추염, 위궤양, 혈청 음성 관절병증, 골관절염, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 전신 홍반성 루푸스, 항인지질 증후군, 홍채섬모체염/포도막염/시신경염, 특발성 폐섬유증, 전신 혈관염/베게너 육아종증, 유육종증, 고환염/정관 절제술 역전 과정, 알레르기성/아토피성 질환, 천식, 알레르기성 비염, 습진, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 결막염, 과민성 폐렴, 이식, 기관이식 거부반응, 이식편 대 숙주 질환, 전신 염증성 반응 증후군, 패혈증 증후군, 그람 양성 패혈증, 그람 음성 패혈증, 배양 음성 패혈증, 진균성 패혈증, 호중구감소성 열, 요로성 패혈증, 수막구균혈증, 외상/출혈, 화상, 전리방사선 노출, 급성 췌장염, 성인성 호흡곤란 증후군, 알코올-유도성 간염, 만성 염증성 병, 유육종증, 크론병, 겸상적혈구 빈혈증, 당뇨병, 신증, 아토피성 질환, 과민 반응, 알레르기성 비염, 고초열, 다년성 비염, 결막염, 자궁내막증, 천식, 담배진, 전신성 아나필락시스, 피부염, 악성 빈혈, 용혈성 질환, 혈소판 감소증, 임의의 기관 또는 조직의 이식편 거부반응, 신장 이식 거부반응, 심장 이식 거부반응, 간 이식 거부반응, 췌장 이식 거부반응, 폐 이식 거부반응, 골수이식(BMT) 거부반응, 피부 동종이식 거부반응, 연골 이식 거부반응, 뼈 이식편 거부반응, 소장 이식 거부반응, 태아 흉선 임플란트 거부반응, 부갑상선 이식 거부반응, 기관 또는 조직의 이종이식 거부반응, 동종이식 거부반응, 항-수용체 과민 반응, 그레이브스병, 레이노병, B형 인슐린-내성 당뇨병, 천식, 중증 근무력증, 항체 매개 세포독성, III형 과민 반응, 전신 홍반성 루푸스, POEMS 증후군(다발성 신경병증, 기관거대증, 내분비병증, 단클론 감마병증, 및 피부변성 증후군), 다발성 신경병증, 기관거대증, 내분비병증, 단클론 감마병증, 피부변성 증후군, 항인지질 증후군, 천포창, 피부경화증, 혼재성 결합조직 질환, 특발성 애디슨병, 당뇨병, 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변증, 백반, 혈관염, MI후 심장절개 증후군, IV형 과민증, 접촉성 피부염, 과민성 폐렴, 동종이식 거부반응, 세포내 유기체에 의한 육아종, 약물 과민증, 대사성/특발성, 윌슨병, 혈색소증, 알파-1-항트립신 결핍증, 당뇨병성 망막병증, 하시모토 갑상선염, 골다공증, 원발성 담즙성 간경변증, 갑상선염, 뇌척수염, 악액질, 남성 섬유증, 신생아 만성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 가족성 혈구탐식성 림프조직구증, 피부이상, 건선, 탈모증, 신증후군, 신장염, 사구체신염, 급성 신부전증, 혈액투석, 요독증, 독성, 자간전증, okt3 요법, 항-cd3 요법, 사이토카인 요법, 화학요법, 방사선 요법(비제한적인 예로서, 무력증, 빈혈, 악액질 등), 만성 살리실레이트 중독 등 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 면역 관련 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 참고로 포함되는 문헌 [Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999)], 문헌 [Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000)]을 참조한다.

[0153] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 심장 기절(cardiac stun) 증후군, 심근경색증, 울혈성

심부전, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 재협착, 당뇨병성 동맥경화성 질환, 고혈압, 동맥성 고혈압, 신혈관성 고혈압, 실신, 쇼크, 심혈관계 매독, 심부전, 폐심장증, 원발성 폐고혈압, 심 부정맥, 이소성 심방 박동, 심방 조동, 심방 세동(지속성 또는 발작성), 관류후 증후군, 심폐 바이패스 염증 반응, 혼돈성 또는 다소성 심방 빈맥, 규칙적인 좁은 QRS 빈맥, 특정 부정맥, 심실세동, 히스 다발(His bundle) 부정맥, 방실 차단, 다발 갈래 차단, 심근 허혈 장애, 관상 동맥 질환, 협심증, 심근경색증, 심근병증, 확장형 울혈성 심근병증, 제한성 심근병증, 심장 판막 질환, 심내막염, 심낭 질환, 심종양, 대동맥류 및 말초동맥류, 대동맥박리, 대동맥 염증, 배대동맥 및 그의 분지의 폐쇄, 말초 혈관 장애, 동맥 폐쇄성 장애, 말초 아테롬성 동맥경화성 질환, 폐쇄성 혈전혈관염, 기능성 말초 동맥 장애, 레이노 현상 및 레이노병, 말단청색증, 피부홍통증, 정맥 질환, 정맥혈전증, 정맥류성 정맥, 동정맥루, 림프부종, 지방부종, 불안정성 협심증, 재관류 손상, 펌프 후(post pump) 증후군, 허혈-재관류 손상 등 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 심혈관 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다. 그러한 방법은 그러한 조절, 치료, 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 임의로 포함할 수 있다.

[0154] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 급성 또는 만성 박테리아 감염, 박테리아, 바이러스, 및 진균 감염을 포함하는 급성 또는 만성 기생 또는 감염 과정, HIV 감염/HIV 신경병증, 수막염, 간염(A 형, B 형, 또는 C 형 등), 화농성 관절염, 복막염, 폐렴, 후두개염, 이. 콜라이 0157:h7, 용혈성 요독 증후군/혈전용해성 혈소판감소성 자반증, 말라리아, 뎅기 출혈열, 레슈마니아증, 한센병, 독성 쇼크 증후군, 스트렙토코커스 근염, 가스 괴저, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아비움(*mycobacterium avium*) 세포내감염(*intracellulare*), 뉴모시스티스 카리니(*pneumocystis carinii*) 폐렴, 골반 염증성 질환, 고환염/부고환염, 레지오넬라(*legionella*), 라임병, 인플루엔자 a, 엡스테인-바르 바이러스, 바이러스-관련 혈구탐식성 증후군, 활성 뇌염/무균성 수막염 등 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 감염성 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0155] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병(ALL), B-세포, T-세포, 또는 FAB ALL, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프모세포성 백혈병(CLL), 모발상세포 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS), 림프종, 호지킨병, 악성 림프종, 비-호지킨 림프종, 버키트 림프종, 다중 흑색종, 카포시 육종, 결장직장 암종, 췌장 암종, 비인두 암종, 악성 조직구종, 부신생물 증후군/악성종양의 과갈슘혈증, 고형 종양, 선암종, 육종, 악성 흑색종, 혈관종, 전이성 질환, 암 관련 뼈의 재흡수, 암 관련 골통 등 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 악성 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0156] 본 발명은 또한, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 신경 변성 질환, 다발성 경화증, 편두통, AIDS 치매 합병증, 탈수초 질환, 예컨대 다발성 경화증 및 급성 횡단성 척수염; 추체외로 및 소뇌 장애, 예컨대 피질 척수계 병변; 기저 신경질의 장애 또는 소뇌 장애; 과다운동성 운동 장애, 예컨대 헌팅턴 무도병 및 노인성 무도병; 약물 유도 운동 장애, 예컨대 CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도되는 것들; 운동저하 장애, 예컨대 파킨슨병; 진행성 핵상마비; 소뇌의 구조 병변; 척수소뇌 변성증, 예컨대 척수성 운동실조, 프리드리히 운동실조, 소뇌 피질 변성증, 다발성 체계 변성증(덴셀(Mencel), 데제린-토마스(Dejerine-Thomas), 사이-드래거(Shi-Drager), 및 마카도-조셉(Machado-Joseph)); 전신성 장애(레프섬 병, 무베타지질단백혈증, 운동실조, 모세혈관확장증, 및 미토콘드리아 다발계통 장애); 탈수초 코어 장애, 예컨대 다발성 경화증, 급성 횡단성 척수염; 및 운동 단위의 장애, 예컨대 신경성 근위축증(전각 세포 변성증, 예컨대 근위축성 측삭경화증, 유아 척수성 근위축증 및 연소성 척수성 근위축증); 알츠하이머 질환 중년의 다운 증후군; 미만성 루이소체병; 루이소체형 노인성 치매; 베르니케-코르사코프 증후군; 만성 알코올 의존증; 크로이츠펠트-야콥병; 아급성 경화성 범뇌염; 할러포르텐-스파츠 병; 및 권투 선수 치매를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 신경 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 선택적으로 적어도 하나의 TNF 항체 또는 특정 부분 또는 변이체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 이러한 조절, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)]을 참조한다.

[0157] 본 발명의 임의의 방법은 그러한 조절, 치료, 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 그러한 방법은 임의로 그러한 면역 질환의 치료를 위한 동시-투여 또는 병용 요법을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 하나 이상의 항-TNF 항체, 이의 특정 부분, 또는 변이체의 투여는 하나 이상의 TNF 길항제(비제한

적인 예를 들어, TNF-항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 또는 이의 단편, 융합 단백질, 또는 소분자 TNF 길항제), 항류마티스제(예를 들어, 메토티렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노미드, 설파살진), 근육 이완제, 안정제, 비스테로이드 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제(예를 들어, 아미노글리코사이드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤라이드, 페니실린, 설펜아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 항건선제, 코르티코스테로이드, 단백질동화 스테로이드, 당뇨병 관련 제제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항궤양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴(예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티(예를 들어, G-CSF, Neupogen), 사르그라마스티(AM-CSF, Leukine), 면역화, 면역글로불린, 면역억제제(예를 들어, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병제, 불안 완화제, 수면제, 교감신경자극제, 자극제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입용 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파(Pulmozyme), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 하나 이상을 사전에, 동시에, 및/또는 사후에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 적합한 투여량은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]을 참조하며, 이들 참고 문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0158] 본 발명의 조성물, 병용 요법, 동시-투여, 장치, 및/또는 방법에 적합한 TNF 길항제(하나 이상의 본 발명의 항체, 이의 특정 부분, 및 변이체를 추가로 포함함)는 항-TNF 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 TNF에 특이적으로 결합하는 수용체 분자; TNF 합성, TNF 방출, 또는 표적 세포에 대한 그의 작용을 방지 및/또는 억제하는 화합물, 예컨대 탈리도마이드, 테니맙, 포스포다이에스테라제 억제제(예를 들어, 펜톡시필린 및 울리프람), A2b 아데노신 수용체 작용제 및 A2b 아데노신 수용체 인핸서; TNF 수용체 신호전달을 방지 및/또는 억제하는 화합물, 예컨대 미토겐 활성화 단백질(MAP) 키나제 억제제; 막 TNF 절단을 차단 및/또는 억제하는 화합물, 예컨대 메탈로프로테이나제 억제제; TNF 활성을 차단 및/또는 억제하는 화합물, 예컨대 안지오텐신 전환 효소(ACE) 억제제(예를 들어, 캅토프릴); 및 TNF 생산 및/또는 합성을 차단 및/또는 억제하는 화합물, 예컨대 MAP 키나제 억제제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0159] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "중양 괴사 인자 항체", "TNF 항체", "TNF® 항체", 또는 단편 등은 시기 재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제8,000,000호, 원위치, 및/또는 바람직하게는 생체내에서 TNF® 활성을 감소, 차단, 억제, 제거, 또는 방해한다. 예를 들어, 본 발명의 적합한 TNF 인자 항체는 TNF®에 결합할 수 있고, 항-TNF 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 TNF®에 특이적으로 결합하는 이의 특정 돌연변이체 또는 도메인을 포함한다. 적합한 TNF 항체 또는 단편은 또한, TNF RNA, DNA, 또는 단백질 합성, TNF 방출, TNF 수용체 신호전달, 막 TNF 절단, TNF 활성, TNF 생산 및/또는 합성을 감소, 차단, 제거, 방해, 방지, 및/또는 억제할 수 있다.

[0160] 키메라 항체 cA2는 A2로 표기되는 고친화도 중화 마우스 항-인간 TNF® IgG1 항체의 항원 결합 가변 영역 및 카파 면역글로불린인 인간 IgG1의 불변 영역으로 이루어진다. 인간 IgG1 Fc 영역은 동종이계 항체 이펙터 기능을 개선하며, 순환 혈청 반감기를 증가시키고, 항체의 면역원성을 감소시킨다. 키메라 항체 cA2의 결합활성 및 에피토프 특이성은 쥐 항체 A2의 가변 영역으로부터 유래된다. 특정 실시 형태에서, 쥐 항체 A2의 가변 영역을 암호화하는 핵산에 대한 바람직한 공급원은 A2 하이브리도마 세포주이다.

[0161] 키메라 A2(cA2)는 용량 의존적 방식으로 천연 및 재조합 인간 TNF® 둘 모두의 세포독성 효과를 중화시킨다. 키메라 항체 cA2 및 재조합 인간 TNF®의 결합 검정으로부터, 키메라 항체 cA2의 친화도 상수는 $1.04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 인 것으로 계산되었다. 경쟁적 억제에 의해 단클론 항체 특이성 및 친화도를 결정하는 바람직한 방법은 문헌[Harlow, et al., *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988]; 문헌[Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000)]; 문헌[Kozbor et al., *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983)]; 문헌[Ausubel et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000)]; 및 문헌[Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983)]에서 확인할 수 있으며, 이들 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0162] 특정 실시 형태에서, 쥐 단클론 항체 A2는 c134A로 표기된 세포주에 의해 생산된다. 키메라 항체 cA2는

c168A로 표기된 세포주에 의해 생산된다.

[0163] 본 발명에 사용될 수 있는 단클론 항-TNF 항체의 추가의 예가 본 기술 분야에 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,231,024호; 문헌[Möller, A. et al., *Cytokine* 2(3):162-169 (1990)]; 미국 특허 출원 제07/943,852호(1992년 9월 11일자로 출원됨); 국제특허 공개 제WO 91/02078호(Rathjen 등, 1991년 2월 21일자로 공개됨); EPO 특허 공개 제0 218 868호(Rubin 등, 1987년 4월 22일자로 공개됨); EPO 특허 공개 제0 288 088호(Yone 등, 1988년 10월 26일자); 문헌[Liang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986)]; 문헌[Meager, et al., *Hybridoma* 6:305-311 (1987)]; 문헌[Fendly et al., *Hybridoma* 6:359-369 (1987)]; 문헌[Bringman, et al., *Hybridoma* 6:489-507 (1987)]; 및 문헌[Hirai, et al., *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987)]을 참조하며, 이들 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).

[0164] **TNF 수용체 분자.** 본 발명에 유용한 바람직한 TNF 수용체 분자는 높은 친화도로 TNF®에 결합하고(예를 들어, 국제특허 공개 제WO 92/07076호(Feldmann 등, 1992년 4월 30일자로 공개됨)); 문헌[Schall et al., *Cell* 61:361-370 (1990)]; 및 문헌[Loetscher et al., *Cell* 61:351-359 (1990)]을 참조하며, 이들 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨) 임의로 낮은 면역원성을 보유하는 것들이다. 특히, 55 kDa(p55 TNF-R) 및 75 kDa(p75 TNF-R) TNF 세포 표면 수용체가 본 발명에 유용하다. 수용체의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 기능부를 포함하는 이들 수용체의 절단 형태(예를 들어, 문헌[Corcoran et al., *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)] 참조)가 또한 본 발명에 유용하다. ECD를 포함하는 TNF 수용체의 절단 형태는 소변 및 혈청에서 30 kDa 및 40 kDa TNF® 억제성 결합 단백질로서 검출되었다(문헌[Engelmann, H. et al., *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)]). TNF 수용체 다량체 분자 및 TNF 면역수용체 융합 분자, 및 이의 유도체 및 단편 또는 부분은 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 TNF 수용체 분자의 추가의 예이다. 본 발명에 사용될 수 있는 TNF 수용체 분자는 증상의 양호한 내지 우수한 경감 및 낮은 독성으로 연장된 기간 동안 환자를 치료하는 그의 능력을 특징으로 한다. 낮은 면역원성 및/또는 높은 친화도와 더불어, 정의되지 않은 다른 특성이 달성되는 치료 결과에 기여할 수 있다.

[0165] 본 발명에 유용한 TNF 수용체 다량체 분자는 하나 이상의 폴리펩티드 링커 또는 다른 비펩티드 링커, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 통해 연결된 2개 이상의 TNF 수용체의 ECD의 전부 또는 기능부를 포함한다. 다량체 분자의 발현을 유도하기 위해 다량체 분자는 분비되는 단백질의 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 이들 다량체 분자 및 그의 생산 방법은 미국 특허 출원 제08/437,533호(1995년 5월 9일자로 출원됨)에 기재되어 있으며, 그 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0166] 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 TNF 면역수용체 융합 분자는 하나 이상의 면역글로불린 분자의 하나 이상의 부분 및 하나 이상의 TNF 수용체의 전부 또는 기능부를 포함한다. 이들 면역수용체 융합 분자는 단량체, 또는 이종다량체 또는 동종다량체로서 조립될 수 있다. 면역수용체 융합 분자는 또한 1가 또는 다가일 수 있다. 그러한 TNF 면역수용체 융합 분자의 예는 TNF 수용체/IgG 융합 단백질이다. TNF 면역수용체 융합 분자 및 그의 생산 방법은 본 기술 분야에 기재되어 있다(문헌[Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886 (1991)]; 문헌[Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991)]; 문헌[Peppel et al., *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991)]; 문헌[Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994)]; 문헌[Butler et al., *Cytokine* 6(6):616-623 (1994)]; 문헌[Baker et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994)]; 미국 특허 제5,447,851호(Beutler 등); 및 미국 특허 출원 제08/442,133호(1995년 5월 16일자로 출원됨), 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 면역수용체 융합 분자의 생산 방법은 또한 미국 특허 제5,116,964호(Capon 등); 미국 특허 제5,225,538호(Capon 등); 및 문헌[Capon et al., *Nature* 337:525-531 (1989)]에서 확인할 수 있으며, 이들 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0167] TNF 수용체 분자의 기능적 등가물, 유도체, 단편, 또는 영역은 TNF 수용체 분자의 부분, 또는 TNF 수용체 분자를 암호화하는 TNF 수용체 분자 서열의 부분을 지칭하며, 이는 본 발명에 사용될 수 있는 TNF 수용체 분자와 기능적으로 유사하기에(예를 들어, 높은 친화도로 TNF®에 결합하고 낮은 면역원성을 보유함) 충분한 크기 및 서열을 갖는다. TNF 수용체 분자의 기능적 등가물은 또한, 본 발명에 사용할 수 있는 TNF 수용체 분자와 기능적으로 유사한(예를 들어, 높은 친화도로 TNF®에 결합하고 낮은 면역원성을 보유함) 변형된 TNF 수용체 분자를 포함한다. 예를 들어, TNF 수용체 분자의 기능적 등가물은 "침묵(silent)" 코돈 또는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 함유할 수 있다(예를 들어, 하나의 산성 아미노산으로 다른 산성 아미노산을 치환함; 또는 동일하거나 상이한 소수성 아미노산을 암호화하는 하나의 코돈으로 소수성 아미노산을 암호화하는 다른 코돈을 치환함). 문헌[Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and

Wiley-Interscience, New York (1987-2000)]을 참조한다.

[0168] 사이토카인은 임의의 알려진 사이토카인을 포함한다. 예를 들어 문헌[CopewithCytokines.com]을 참조한다. 사이토카인 길항제는 임의의 항체, 단편 또는 모방체, 임의의 가용성 수용체, 단편 또는 모방체, 임의의 소분자 길항제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0169] **치료적 치료.** 본 발명의 임의의 방법은, TNF 매개 장애의 조절, 치료, 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에게 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 안전하고 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는, TNF 매개 장애를 치료하는 방법을 포함할 수 있다. 그러한 방법은 임의로 그러한 면역 질환의 치료를 위한 동시-투여 또는 병용 요법을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 하나 이상의 항-TNF 항체, 이의 특정 부분, 또는 변이체의 투여는 하나 이상의 TNF 길항제(비제한적인 예를 들어, TNF-항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 또는 이의 단편, 융합 단백질, 또는 소분자 TNF 길항제), 항류마티스제(예를 들어, 메토타렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 디오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노미드, 설파살진), 근육 이완제, 안정제, 비스테로이드 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제(예를 들어, 아미노글리코사이드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤라이드, 페니실린, 설펜아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 항건선제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 제제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항레앙제, 완하제, 항응고제, 에리트르포이에틴(예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티프(예를 들어, G-CSF, Neupogen), 사르그라마스티프(GM-CSF, Leukine), 면역화, 면역글로불린, 면역억제제(예를 들어, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병제, 불안 완화제, 수면제, 교감신경자극제, 자극제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입용 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사제, 도르나제 알파(Pulmozyme), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 하나 이상을 사전에, 동시에, 및/또는 사후에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0170] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안전한"은, 그것이 본 발명의 항-TNF 항체(예를 들어, 항-TNF 항체 폴리무마)를 이용하는 조성물, 용량, 투여 계획, 치료, 또는 방법에 관련될 때, 치료 표준 또는 다른 항 TNF 제제와 같은 다른 비교자에 비교하여 유해 사례(AE) 및 심각한 유해 사례(SAE)의 허용가능한 빈도 및/또는 허용가능한 중증도를 갖는 유리한 위험:이익 비를 지칭한다. 유해 사례는 의약품을 투여한 환자에서의 의외의 의학적 사건이다. 특히, "안전한"은, 그것이 본 발명의 항-TNF 항체를 이용하는 조성물, 용량, 투여 계획, 치료, 또는 방법에 관련될 때, 예를 들어, 주입 반응, 간담도 실험실 이상, TB를 포함하는 감염, 및 악성종양을 포함하는 유해 사례의 허용가능한 빈도 및/또는 허용가능한 중증도를 지칭한다.

[0171] 조성물, 용량, 투여 계획, 치료, 또는 방법과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "효능" 및 "효과적인"은, 본 발명의 항-TNF 항체(예를 들어, 항-TNF 항체 폴리무마)를 이용하는 특정 조성물, 용량, 투여량, 치료, 또는 방법의 유효성을 지칭한다. 효능은 본 발명의 제제에 반응하는 질환 경과의 변화에 기초하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-TNF 항체는 개선, 바람직하게는 치료되는 장애의 중증도를 반영하는 하나 이상의 지표의 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양 및 시간 동안 환자에게 투여된다. 치료의 양 및 시간이 충분한지 여부를 결정하기 위해 대상의 질병, 질환, 또는 병태의 정도를 반영하는 다양한 지표를 평가할 수 있다. 이러한 지표는, 예를 들어 문제의 장애의 질환 중증도, 증상, 또는 징후의 임상적으로 인정된 지표를 포함한다. 개선의 정도는 일반적으로 징후, 증상, 생검물, 또는 임상 증상의 개선 또는 질환 활성의 임의의 다른 척도를 나타내는 다른 시험 결과에 기초하여 결정할 수 있는 의사 또는 다른 적절하게 훈련된 개인에 의해 결정된다. 예를 들어, 본 발명의 항-TNF 항체는 강직성 척추염(AS)에 관련된 환자의 병태의 개선을 달성하기 위해 투여될 수 있다. AS에 관련된 환자의 병태의 개선은, 예를 들어, 강직성 척추염 질환 활성 점수(ASDAS), 베스 강직성 척추염 기능 지수(BASFI), 베스 강직성 척추염 계측 지수(BASMI), 36-항목 단축-양식 건강 조사 신체요소 개요(SF-36 PCS), 36-항목 단축-양식 건강 조사 정신요소 개요(SF-36 MCS), 및/또는 강직성 척추염 삶의 질(ASQoL) 설문으로부터의 결과를 포함하는 하나 이상의 기준을 사용하여 평가할 수 있다. ASDAS는 국제 척추관절염 평가 학회에 의해 개발된 AS에 사용하기 위한 질환 활성 점수(DAS)이다. ASDAS는, 예를 들어, 총 요통, 조조 강직의 지속시간, 말초 통증/종창 및 환자 전반적 평가를 포함하는 평가를 이용하는 수학적식을 사용하여 계산한다. BASFI는 10 개 문항의 평균으로서 표현되는 대상의 자가 평가이며, 이들 중 8 개는 대상의 기능적 해부학에 관한 것이고, 이들 중 2 개는 일상 생활에 대처하는 대상의 능력에 관한 것이다. BASMI는 평가를 외측 요추 굴곡, 이주-대-벽 거리, 요추 굴곡, 치간 거리, 및 경부 회전각을 포함하는 5 개의 평가에 대한 점수로 전

환함으로써 계산되는 총점이다. SF-36은 채점되는 8개의 다중-항목 척도로 이루어진 설문이고, SF-36 PSA 및 SF-36 MCS는 상이한 질환의 상대적 부담과 상이한 치료의 상대적 이익의 비교를 가능하게 하는 SF-36으로부터 유래된 요약 점수이다. ASQoL은 수면, 기분, 동기, 대처 능력, 일상 생활의 활동, 독립성, 관계, 및 사회 생활에 대한 통증의 영향과 관련된 문항에 대한 응답을 요청하는 18 개의 항목으로 이루어진 자가-투여 환자-보고 결과 매체이다.

[0172] 전형적으로, 병리학적 병태의 치료는 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물의 안전하고 효과적인 양 또는 투여량을 투여함으로써 이루어지며, 이는 조성물에 함유된 고유 활성에 따라, 합산하여 평균적으로 용량당 환자의 킬로그램당 약 0.01 내지 500 밀리그램 이상의 범위의 하나 이상의 항-TNF 항체, 바람직하게는 단일 또는 다중 투여당 환자의 킬로그램당 약 0.1 내지 100 밀리그램 이상의 항체이다. 대안적으로, 유효 혈청 농도는 단일 또는 다중 투여당 0.1 내지 5000 $\mu\text{g/ml}$ 혈청 농도를 포함할 수 있다. 적합한 투여량이 임상에게 알려져 있으며, 물론 특정 질환의 상태, 투여되는 조성물의 특정 활성 및 치료할 특정 환자에 따라 달라질 것이다. 일부 경우에, 원하는 치료량을 달성하기 위해, 모니터링되거나 계량되는 특정 투여량을 반복하여 개별 투여하는 반복 투여를 제공하는 것이 필요할 수 있으며, 이때 개별 투여는 원하는 1일 투여량 또는 효과가 달성될 때까지 반복된다.

[0173] 바람직한 용량은 임의로 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, 및/또는 100 내지 500 mg/kg/투여, 또는 이의 임의의 범위, 값, 또는 분율을 포함할 수 있거나, 단일 또는 다중 투여당 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, 및/또는 5000 $\mu\text{g/ml}$ 혈청 농도, 또는 이의 임의의 범위, 값, 또는 분율의 혈청 농도를 달성하기 위한 것이다.

[0174] 대안적으로, 투여되는 투여량은 알려진 인자, 예컨대 특정 제제의 약력학적 특징, 및 그의 투여 방식 및 경로; 수용자의 연령, 건강, 및 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도, 및 원하는 효과에 따라 변동될 수 있다. 일반적으로, 활성 성분의 투여량은 체중 1 킬로그램당 약 0.1 내지 100 밀리그램일 수 있다. 통상적으로, 원하는 결과를 얻기 위해, 0.1 내지 50, 바람직하게는 0.1 내지 10 밀리그램/킬로그램/투여 또는 서방형이 효과적이다.

[0175] 비제한적인 예로서, 인간 또는 동물의 치료는, 본 발명의 하나 이상의 항체 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 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, 또는 100 mg/kg/일의 1회 또는 주기적 투여량으로서, 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, 또는 40 일 중 하나 이상, 또는 대안적으로 또는 추가로 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, 또는 52 주 중 하나 이상, 또는 대안적으로 또는 추가로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 년 중 하나 이상, 또는 이들의 임의의 조합에, 단일, 주입, 또는 반복 용량을 사용하여 제공할 수 있다.

[0176] 체내 투여에 적합한 투여형(조성물)은 일반적으로 단위 또는 용기당 약 0.1 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유한다. 이러한 약제학적 조성물에서, 활성 성분은 대체로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5 내지 99.999 wt%의 양으로 존재할 것이다.

[0177] 비경구 투여의 경우, 항체는 약제학적으로 허용가능한 비경구 비히클과 함께 또는 별도로 제공되는 용액, 현탁액, 에멀전, 또는 동결건조 분말로서 제형화될 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 1 내지 10% 인간 혈청 알부민이다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예컨대 고정유가 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조 분말은 등장성 (예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성 (예를 들어, 완충제 및 보존제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형을 알려진 기술 또는 적합한 기술에 의해 살균시킨다.

- [0178] 적합한 약제학적 담체는 본 분야의 표준 참고문헌인 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol]의 최신판에 기재되어 있다.
- [0179] **대안적 투여.** 본 발명에 따른 하나 이상의 항-TNF 항체의 약제학적 유효량을 투여하기 위해 알려지고 개발된 많은 투여 방식이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 폐 투여가 하기 설명에서 사용되며, 다른 투여 방식이 적합한 결과를 보이면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0180] 본 발명의 TNF 항체는, 흡입 또는 본 명세서에서 기재되거나 본 기술 분야에 알려진 다른 방식에 의한 투여에 적합한 임의의 다양한 장치 및 방법을 사용하여, 용액, 에멀전, 콜로이드, 또는 현탁액으로서, 또는 건조 분말로서 담체 중에 전달될 수 있다.
- [0181] **비경구 제형 및 투여.** 비경구 투여용 제형은 통상적인 부형제로서 멸균수 또는 식염수, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물 기원의 오일, 수소화 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사를 위한 수성 또는 유성 현탁액은 알려진 방법에 따라 적당한 유화제 또는 습윤화제 및 현탁제를 사용하여 제조될 수 있다. 주사용 제제는 용매 중의 수용액 또는 멸균 주사용 용액 또는 현탁액과 같은 비독성의 비경구 투여가능한 희석제일 수 있다. 사용가능한 비히클 또는 용매로서, 물, 링거액, 등장성 염수 등이 허용되며; 통상의 용매 또는 현탁 용매로서, 멸균 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 천연 또는 합성 또는 반합성 지방 오일 또는 지방산; 천연 또는 합성 또는 반합성 모노- 또는 다이- 또는 트라이-글리세리드를 포함하는 임의의 종류의 비휘발성 오일 및 지방산이 사용될 수 있다. 비경구적 투여는 본 기술 분야에 공지되어 있으며, 미국 특허 제 5,851,198호에 기재된 기체 가압 무-바늘 주사 장치, 및 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제 5,839,446호에 기재된 레이저 천공 장치와 같은 통상적인 주사 수단을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0182] **대안적 전달.** 본 발명은 추가로, 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복막내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비강내, 또는 경피 수단에 의한 하나 이상의 항-TNF 항체의 투여에 관한 것이다. 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물은, 특히 액체 용액 또는 현탁액의 형태로 비경구(피하, 근육내, 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여에 사용하기 위해; 특히 크림 및 좌약과 같으나 이에 한정되지 않는 반고체 형태로 질 또는 직장 투여에 사용하기 위해; 정제 또는 캡슐의 형태와 같으나 이에 한정되지 않는 협측 또는 설하를 위해; 또는, 분말, 점비제(nasal drop), 또는 에어로졸 또는 소정 제제의 형태와 같으나 이에 한정되지 않는 비강내; 또는 피부 구조를 변형시키거나 경피 패치 내의 약물 농도를 증가시키기 위한 다이메틸 설포사이드와 같은 화학적 인헨서를 갖거나(전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994)], 단백질 및 펩티드를 함유하는 제형의 피부 상의 적용을 가능하게 하는 산화제(WO 98/53847), 또는 전기천공과 같이 일시적 수송 경로를 생성하거나 이온영동법과 같이 피부를 통해 하전된 약물의 이동성을 증가시키기 위한 전기장의 적용, 또는 음과영동과 같은 초음파의 적용(미국 특허 제4,309,989호 및 제4,767,402호)을 갖는, 겔, 연고, 로션, 현탁액, 또는 패치 전달 시스템과 같으나 이에 한정되지 않는 경피 투여를 위해 제조될 수 있다(상기 간행물 및 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).
- [0183] **폐/비강 투여.** 폐 투여의 경우, 바람직하게는 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물은 폐 또는 부비동(sinus)의 하 기도에 도달하기에 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명에 따라, 하나 이상의 항-TNF 항체는 흡입에 의한 치료제의 투여를 위해 본 기술 분야에 알려진 임의의 다양한 흡입 또는 비내 장치에 의해 전달될 수 있다. 환자의 부비강 또는 폐포 내에 에어로졸화된 제형을 침착시킬 수 있는 이들 장치는 정량 흡입기, 네블라이저(nebulizer), 건조 분말 발생기, 분무기 등을 포함한다. 항체의 폐 또는 비내 투여를 유도하기에 적합한 다른 장치 또한 본 기술 분야에 알려져 있다. 그러한 모든 장치는 에어로졸 중의 항체를 분배하기 위해 투여에 적합한 제형을 사용할 수 있다. 그러한 에어로졸은 용액(수성 및 비수성 둘 모두) 또는 고체 입자로 구성될 수 있다. Ventolin[®] 정량 흡입기와 같은 정량 흡입기는 전형적으로 추진제 기체를 사용하며, 흡기 중에 구동(actuation)을 필요로 한다 (예를 들어, WO 94/16970, WO 98/35888 참조). Turbuhaler[™](Astra), Rotahaler[®](Glaxo), Diskus[®](Glaxo), Spiros[™] 흡입기(Dura), Inhale Therapeutics에 의해 시판되는 장치, 및 Spinhaler[®] 분말 흡입기(Fisons)와 같은 건조 분말 흡입기는 혼합 분말의 호흡-구동을 사용한다(전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 US 4668218(Astra), EP 237507(Astra), WO 97/25086(Glaxo), WO 94/08552(Dura), US 5458135(Inhale), WO 94/06498(Fisons)). AERx[™](Aradigm), Ultravent[®] 네블라이저(Mallinckrodt), 및 Acorn

II[®] 네블라이저(Marquest Medical Products)(US 5404871(Aradigm), WO 97/22376)와 같은 네블라이저는 용액으로부터 에어로졸을 생성하는 반면에, 정량 흡입기, 건조 분말 흡입기 등은 소입자 에어로졸을 생성하며, 상기 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 구매가능한 흡입 장치의 이들 특이적 예는 본 발명의 실시예에 적합한 특이적 장치를 대표하는 것으로 의도되며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 바람직하게는, 하나 이상의 항-TNF 항체를 포함하는 조성물은 건조 분말 흡입기 또는 분무기에 의해 전달된다. 본 발명의 하나 이상의 항체를 투여하기 위한 흡입 장치의 몇몇 바람직한 특성이 있다. 예를 들어, 흡입 장치에 의한 전달은 유리하게는 신뢰성 있고, 재현가능하며, 정확하다. 양호한 호흡성을 위해, 흡입 장치는, 예를 들어 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 내지 5 μm 의 작은 건조 입자를 임의로 전달할 수 있다.

[0184] **분무로서의 TNF 항체 조성물의 투여.** TNF 항체 조성물 단백질을 포함하는 분무는 하나 이상의 항-TNF 항체의 현탁액 또는 용액을 압력 하에 노즐에 통과시킴으로써 생성할 수 있다. 노즐 크기 및 구성, 적용된 압력, 및 액체 공급 속도는 원하는 출력 및 입자 크기를 달성하도록 선택될 수 있다. 전기분무는, 예를 들어 모세관 또는 노즐 공급과 연결된 전기장에 의해 생성될 수 있다. 유리하게는, 분무기에 의해 전달되는 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물 단백질의 입자는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm , 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm 범위의 입자 크기를 갖는다.

[0185] 분무기와 함께 사용하기에 적합한 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물 단백질의 제형은 전형적으로 용액 1 ml 당 또는 gm 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값, 비제한적인 예를 들어 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, 또는 100 mg/ml 또는 mg/gm의 농도로 수용액중의 항체 조성물 단백질을 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장화제, 보존제, 계면활성제, 및 바람직하게는 아연과 같은 제제를 포함할 수 있다. 제형은 또한, 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 항체 조성물 단백질의 안정화를 위한 부형제 또는 제제를 포함할 수 있다. 항체 조성물 단백질의 제형화에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 항체 조성물 단백질의 제형화에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 항체 조성물 단백질 제형은 또한, 에어로졸을 형성함에 있어서 용액의 연무화(atomization)에 의해 야기되는 항체 조성물 단백질의 표면-유도 응집을 감소시키거나 방지할 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상의 계면활성제가 사용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 약 0.001 내지 14 중량%의 범위일 것이다. 본 발명의 목적상 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. TNF 항체, 또는 특정 부분 또는 변이체와 같은 단백질의 제형화를 위해 본 기술 분야에 알려진 추가의 제제가 또한 제형 내에 포함될 수 있다.

[0186] **네블라이저에 의한 TNF 항체 조성물의 투여.** 항체 조성물 단백질은 제트 네블라이저 또는 초음파 네블라이저와 같은 네블라이저에 의해 투여될 수 있다. 전형적으로, 제트 네블라이저에서는, 압축 공기 공급원을 사용하여 오리피스(orifice)를 통해 고속 공기 제트를 생성한다. 노즐 너머로 기체가 팽창함에 따라 저압 영역이 생성되고, 이는 액체 저장소에 연결된 모세관을 통해 항체 조성물 단백질의 용액을 흡인한다. 모세관으로부터의 액체 흐름은 그것이 튜브에서 나감에 따라 불안정한 필라멘트 및 소적으로 전단되어, 에어로졸을 생성한다. 주어진 제트 네블라이저로부터 원하는 성능 특성을 달성하기 위해 소정 범위의 구성, 유속, 및 배플 유형이 사용될 수 있다. 초음파 네블라이저에서는, 고주파 전기 에너지를 사용하여 진동, 기계적 에너지를 생성하며, 전형적으로는 압전 변환기(piezoelectric transducer)를 사용한다. 이 에너지는 직접 또는 커플링 유체를 통해 항체 조성물 단백질의 제형에 전달되어 항체 조성물 단백질을 포함하는 에어로졸을 생성한다. 유리하게는, 네블라이저에 의해 전달되는 항체 조성물 단백질의 입자는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm , 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm 범위의 입자 크기를 갖는다.

[0187] 제트 또는 초음파 네블라이저와 함께 사용하기에 적합한 하나 이상의 항-TNF 항체의 제형은 전형적으로 용액 1 ml 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 농도의 하나 이상의 항-TNF 항체 단백질을 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장화제, 보존제, 계면활성제, 및 바람직하게는 아연과 같은 제제를 포함할 수 있다. 제형은 또한 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물 단백질의 안정화를 위한 부형제 또는 제제를 포함할 수 있다. 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물 단백질의 제형화에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 하나 이상의 항-TNF 항체의 제형화에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 하나 이상의 항-TNF 항체 제형은 또한, 에어로졸 형성시에 용액의 연무화에 의해 야기되는 하나 이상의 항-TNF 항체의 표면-유도 응집을 감소시키거나 방지할 수

있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상의 계면활성제가 사용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 0.001 내지 4 중량%의 범위일 것이다. 본 발명의 목적상 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노-올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 항체 단백질과 같은 단백질의 제형화를 위해 본 기술 분야에 알려진 추가의 제제가 또한 제형 내에 포함될 수 있다.

[0188] **정량 흡입기에 의한 TNF 항체 조성물의 투여.** 정량 흡입기(MDI)에서는, 추진제, 하나 이상의 항-TNF 항체, 및 임의의 부형제 또는 다른 첨가제가 액화 압축 기체를 포함하는 혼합물로서 캐니스터(canister) 내에 함유된다. 계량 밸브의 구동은 바람직하게는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm , 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm 의 크기 범위의 입자를 함유하는 에어로졸로서 혼합물을 방출한다. 제트 밀링(jet-milling), 분무 건조, 임계점 응축 등을 포함하는, 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 생성된 항체 조성물 단백질의 제형을 사용함으로써 원하는 에어로졸 입자 크기를 얻을 수 있다. 바람직한 정량 흡입기는 3 M 또는 Glaxo에 의해 제조되고 하이드로플루오로카본 추진제를 사용하는 것들을 포함한다.

[0189] 정량 흡입기 장치와 함께 사용하기 위한 하나 이상의 항-TNF 항체의 제형은 일반적으로, 예를 들어 계면 활성제의 보조를 받아 추진제 중에 현탁된 비수성 매질 중의 현탁액으로서 하나 이상의 항-TNF 항체를 함유하는 미세 분할된 분말을 포함할 것이다. 추진제는 이러한 목적을 위해 사용되는 임의의 통상의 재료, 예컨대 트라이클로로플루오로메탄, 다이클로로다이플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134 a(하이드로플루오알칸-134 a), HFA-227(하이드로플루오알칸-227) 등을 포함하는, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 또는 하이드로카본일 수 있다. 바람직하게는 추진제는 하이드로플루오로카본이다. 계면활성제는 화학적 분해 등에 대해 활성 체제를 보호하기 위해 추진제 중의 현탁액으로서의 하나 이상의 항-TNF 항체를 안정화하도록 선택될 수 있다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트라이올레이트, 대두 레시틴, 올레산 등을 포함한다. 일부 경우에 에탄올과 같은 용매를 사용하는 용액 에어로졸이 바람직하다. 단백질의 제형화를 위해 본 기술 분야에 알려진 추가의 제제가 또한 제형 내에 포함될 수 있다.

[0190] 본 명세서에 기재되지 않은 장치를 통한 하나 이상의 항-TNF 항체 조성물의 폐 투여에 의해 본 발명의 방법이 달성될 수 있음을 당업자는 인식할 것이다.

[0191] **경구 제형 및 투여.** 경구용 제형은 장 벽의 투과성을 인공적으로 증가시키기 위한 보조제(예를 들어, 레소르시놀 및 비이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르 및 n-헥사데실폴리에틸렌 에테르)의 동시-투여와 더불어, 효소적 분해를 억제하기 위한 효소 억제제(예를 들어, 췌장 트립신 억제제, 다이아이소프로필플루오로포스페이트(DFF) 및 트라실올)의 동시-투여에 의존한다. 경구 투여용 고체-유형 투여형의 활성 성분 화합물은 수크로스, 락토스, 셀룰로오스, 만니톨, 트레할로스, 라피노스, 말티톨, 텍스트란, 전분, 한천, 아르기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트래거캔스 고무, 아라비아 고무, 젤라틴, 콜라겐, 카제인, 알부민, 합성 또는 반합성 중합체, 및 글리세라이드를 포함하는 하나 이상의 첨가제와 혼합될 수 있다. 이들 투여형은 또한 다른 유형(들)의 첨가제, 예를 들어, 비활성 희석제, 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘, 파라벤, 보존제, 예컨대 소르브산, 아스코르브산, 알파-토코페롤, 항산화제, 예컨대 시스테인, 붕해제, 결합제, 증점제, 완충제, 감미제, 향미제, 방향제 등을 함유할 수 있다.

[0192] 정제 및 환제는 장용 코팅 제제로 추가로 가공될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 의학적 용도로 허용가능한 에멀전, 시럽, 엘릭시르, 현탁액, 및 용액 제제를 포함한다. 이들 제제는 상기 분야에서 통상적으로 사용되는 비활성 희석제, 예를 들어 물을 함유할 수 있다. 리포솜 또한 인슐린 및 헤파린에 대한 약물 전달 시스템으로서 기재되었다(미국 특허 제4,239,754호). 더 최근에는, 혼합 아미노산의 인공 중합체(프로테이노이드)의 미소구체가 의약품을 전달하기 위해 사용되었다(미국 특허 제4,925,673호). 추가로, 생물학적 활성 체제를 경구 전달하기 위해 사용되는, 미국 특허 제5,879,681호 및 미국 특허 제5,587,753호에 기재된 담체 화합물이 본 기술 분야에 알려져 있다.

[0193] **점막 제형 및 투여.** 점막 표면을 통한 흡수를 위해 하나 이상의 항-TNF 항체를 투여하는 조성물 및 방법은 복수의 마이크론 미만의 입자, 점막부착성 거대분자, 생물활성 펩티드, 및 에멀전 입자의 점막부착을 달성함으로써 점막 표면을 통한 흡수를 촉진하는 수성 연속상을 포함하는 에멀전을 포함한다(미국 특허 제5,514,670호). 본 발명의 에멀전의 적용에 적합한 점막 표면은 각막, 결막, 협측, 설하, 비강, 질, 폐, 위, 장, 및 직장 투여 경로를 포함할 수 있다. 질 또는 직장 투여용 제형, 예를 들어 좌제는 부형제로서, 예를 들어 폴리알킬렌글리콜, 바셀린, 코코아 버터 등을 함유할 수 있다. 비강내 투여용 제형은 고체일 수 있으며, 부형제로서, 예를 들어

락토스를 함유할 수 있거나, 점비제의 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 협측 투여용 부형제는 당, 스테아르산 칼슘, 스테아르산마그네슘, 전호화 전분(pregelatinated starch) 등을 포함한다(미국 특허 제5,849,695호)

[0194] **경피 제형 및 투여.** 경피 투여를 위해, 하나 이상의 항-TNF 항체는 리포솜 또는 중합체 나노입자, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 또는 미소구체(달리 언급되지 않는 한, 집합적으로 마이크로입자로 지칭됨)와 같은 전달 장치 내에 캡슐화된다. 폴리락트산, 폴리글리콜산, 및 이의 공중합체와 같은 폴리하이드록시산, 폴리오르토에스테르, 폴리아나하이드라이드, 및 폴리포스파진과 같은 합성 중합체, 및 콜라겐, 폴리아미노산, 알부민 및 다른 단백질, 알기네이트 및 다른 다당류와 같은 천연 중합체, 및 이들의 조합으로 이루어진 마이크로입자를 포함하는 다수의 적합한 장치가 알려져 있다(미국 특허 제5,814,599호).

[0195] **장기간의 투여 및 제형.** 장기간의 시간에 걸쳐, 예를 들어, 단일 투여로부터 1 주 내지 1 년의 기간 동안 대상에게 본 발명의 화합물을 전달하는 것이 간혹 바람직할 수 있다. 다양한 서방성 데포(depot) 또는 임플란트 투여형이 이용될 수 있다. 예를 들어, 투여형은 체액 중의 낮은 용해도를 갖는 화합물의 약제학적으로 허용가능한 비독성 염, 예를 들어, (a) 인산, 황산, 시트르산, 타르타르산, 탄닌산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌 모노- 또는 다이-설폰산, 폴리갈락투론산 등과 같은 다염기산을 갖는 산 부가염; (b) 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과 같은 다가 금속 양이온을 갖거나, 예를 들어 N,N'-다이벤질-에틸렌다이아민 또는 에틸렌다이아민으로부터 형성된 유기 양이온을 갖는 염; 또는 (c) (a)와 (b)의 조합, 예를 들어 아연 탄네이트 염을 함유할 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물, 또는 바람직하게는 방금 기재된 것들과 같은 비교적 불용성인 염은 겔, 예를 들어, 주사용으로 적합한, 예를 들어 참깨유를 갖는 알루미늄 모노스테아레이트 겔로 제형화될 수 있다. 특히 바람직한 염은 아연 염, 아연 탄네이트 염, 파모에이트 염 등이다. 다른 유형의 주사용 서방성 데포 제형은, 예를 들어 미국 특허 제3,773,919호에 기재된 바와 같은 폴리락트산/폴리글리콜산 중합체와 같은 천천히 분해되는 비독성 비항원성 중합체에 캡슐화되기 위해 분산된 화합물 또는 염을 함유할 것이다. 화합물, 또는 바람직하게는 상기 기재된 것들과 같은 비교적 불용성인 염은 또한 특히 동물에 사용하기 위해, 콜레스테롤 매트릭스 실라스틱 펠렛으로 제형화될 수 있다. 추가의 서방성 데포 또는 임플란트 제형, 예를 들어 기체 또는 액체 리포솜이 문헌에 알려져 있다(미국 특허 제5,770,222호 및 문헌["Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978]).

[0196] 본 발명을 일반적으로 기재하였지만, 이는 예시로서 제공되고 제한으로서 의도되지 않는 하기 실시예를 참조함으로써 더 용이하게 이해될 것이다.

[0197] **실시예 1: 포유류 세포에서의 TNF 항체의 클로닝 및 발현.**

[0198] 전형적인 포유류 발현 벡터는 mRNA 전사의 개시를 매개하는 하나 이상의 프로모터 요소, 항체 코딩 서열, 및 전사의 종결 및 전사체의 폴리아데닐화에 필요한 신호를 함유한다. 추가의 요소는 인핸서, 코작(Kozak) 서열 및 RNA 스플라이싱의 공여 및 수용 부위에 인접하는 개재된 서열을 포함한다. 고 효율 전사는 SV40으로부터의 초기 및 후기 프로모터, 레트로바이러스, 예를 들어 RSV, HTLVI, HIV로부터의 긴 말단 반복체 (LTR), 및 사이토메갈로바이러스 (CMV)의 초기 프로모터로 달성될 수 있다. 그러나, 세포성 인자도 사용될 수 있다 (예를 들어, 인간 액틴 프로모터). 본 발명의 실시예 사용하기에 적합한 발현 벡터는, 예를 들어 pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, 또는 pLNCX(Clontech Labs, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-), 또는 pcDNA3.1/Hygro (+/-)(Invitrogen), PSVL 및 PMSG(Pharmacia, 스웨덴 웁살라 소재), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146), 및 pBC12MI(ATCC 67109)와 같은 벡터를 포함한다. 사용될 수 있는 포유류 숙주 세포는 인간 HeLa 293, H9 및 Jurkat 세포, 마우스 NIH3T3 세포 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV 1, 케일 QC1-3 세포, 마우스 L 세포 및 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 포함한다.

[0199] 대안적으로, 유전자는 염색체 내로 혼입된 유전자를 함유하는 안정적인 세포주에서 발현될 수 있다. dhfr, gpt, 네오마이신, 또는 하이그로마이신과 같은 선택가능한 마커를 이용하는 동시-형질주입은 형질주입된 세포의 확인 및 단리를 가능하게 한다

[0200] 형질주입된 유전자는 또한 대량의 암호화된 항체를 발현하도록 증폭될 수 있다. DHFR (디하이드로폴레이트 환원효소) 마커는 목적 유전자의 수백 또는 심지어 수천 개의 카피를 운반하는 세포주를 개발하는 데 유용하다. 다른 유용한 선택 마커는 효소 글루타민 합성효소(GS)이다(문헌[Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991)]; 문헌[Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)]). 이러한 마커를 사용하여, 포유류 세포를 선택 배지에서 증식시켜, 최고의 내성을 갖는 세포를 선별한다. 이러한 세포주는 염색체 내로 혼입된 증폭된 유전자(들)를 함유한다. 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 및 NSO 세포는 항체 생성에 종종 사용된다.

- [0201] 발현 벡터 pC1 및 pC4는 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus)의 강력한 프로모터(LTR)(문헌[Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)]) + CMV-인헨서의 단편(문헌[Boshart, et al., Cell 41: 521-530(1985)])을 함유한다. 예를 들어, 제한효소 절단 부위 BamHI, XbaI 및 Asp718을 갖는 다중 클로닝 부위는 목적 유전자의 클로닝을 용이하게 한다. 벡터는 3' 인트론에 더하여 쥐 프리프로인솔린 유전자의 폴리아데닐화 및 종결 신호를 함유한다.
- [0202] **CHO 세포에서의 클로닝 및 발현.** TNF 항체의 발현을 위해 벡터 pC4를 사용한다. 플라스미드 pC4는 플라스미드 pSV2-dhfr (ATCC 기탁 번호 37146)의 유도체이다. 플라스미드는 SV40 초기 프로모터의 조절 하에 마우스 DHFR 유전자를 포함한다. 이러한 플라스미드로 형질주입된, 다이하이드로폴레이트 활성이 결여된 차이니즈 햄스터 난소- 또는 다른 세포는 화학요법제 메토틱렉세이트로 보충된 선택 배지 (예를 들어, 알파 마이너스 MEM, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 미국 메릴랜드주 게이트스버그 소재)에서 세포를 배양하여 선택할 수 있다. 메토틱렉세이트(MTX)에 내성인 세포에서 DHFR 유전자의 증폭은 잘 문서화되어 있다(예를 들어, 문헌[F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978)]; 문헌[J. L. Hamlin and C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990)]; 및 문헌[M. J. Page and M. A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)] 참조). 표적 효소인, DHFR 유전자의 증폭 결과물로서의 DHFR을 과다생성함으로써 약물에 내성을 보이는, 증가하는 농도의 MTX에서 세포를 증식시켰다. 제2 유전자가 DHFR 유전자에 연결되면, 일반적으로 동시 증폭되고 과발현된다. 증폭된 유전자(들)의 1,000개 초과 카피를 운반하는 세포주의 개발을 위해 상기 방법을 사용할 수 있음이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 이어서, 메토틱렉세이트를 제거하면, 숙주 세포의 하나 이상의 염색체(들) 내로 혼입된 증폭된 유전자를 포함하는 세포주가 수득된다.
- [0203] 플라스미드 pC4는 관심 유전자의 발현을 위해 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복(LTR)의 강력한 프로모터(문헌[Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)]) + 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)의 전초기 유전자의 인헨서로부터 단리된 단편(문헌[Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985)])을 함유한다. 프로모터의 하류에는 유전자의 통합을 가능하게 하는 BamHI, XbaI, 및 Asp718 제한 효소 절단 부위가 있다. 이들 클로닝 부위 뒤에, 플라스미드는 쥐 프리프로인솔린 유전자의 3' 인트론 및 폴리아데닐화 부위를 함유한다. 또한, 다른 고효율 프로모터, 예를 들어 인간 베타-액틴 프로모터, SV40 초기 또는 후기 프로모터, 또는 다른 레트로바이러스, 예를 들어 HIV 및 HTLV1로부터의 긴 말단 반복체가 발현을 위해 사용될 수 있다. 포유류 세포에서 조절되는 방식으로 TNF를 발현하기 위해 Clontech의 Tet-Off 및 Tet-On 유전자 발현 시스템 및 유사한 시스템을 사용할 수 있다(문헌[M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)]). mRNA의 폴리아데닐화를 위해, 예를 들어 인간 성장 호르몬 또는 글로빈 유전자로부터의 다른 신호도 사용될 수 있다. 염색체 내로 통합된 관심 유전자를 운반하는 안정적인 세포주는 또한 선택가능한 마커, 예컨대 gpt, G418, 또는 하이그로마이신으로 동시-형질주입시에 선택될 수 있다. 초기에 하나 초과 선택가능한 마커, 예를 들어 G418과 메토틱렉세이트를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0204] 플라스미드 pC4를 제한 효소로 분해한 후, 본 기술 분야에 공지된 방법으로 송아지 장 포스파타제를 사용하여 탈인산화한다. 이어서, 벡터를 1% 아가로스 겔로부터 단리한다.
- [0205] 이어서, 단리된 가변 및 불변 영역을 암호화하는 DNA 및 탈인산화된 벡터를 T4 DNA 리가제로 라이게이션한다. 이어서, 대장균 HB101 또는 XL-1 블루 세포를 형질전환하고, 예를 들어 제한 효소 분석을 사용하여 플라스미드 pC4가 삽입된 단편을 포함하는 박테리아를 확인한다.
- [0206] 활성 DHFR 유전자가 결여된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포가 형질주입에 사용된다. 리포펙틴을 사용하여 5 μ g의 발현 플라스미드 pC4를 0.5 μ g의 플라스미드 pSV2-neo와 함께 동시 형질주입한다. 플라스미드 pSV2-neo는 우성 선택가능한 마커, G418을 포함하는 항생제의 군에 대한 내성을 부여하는 효소를 암호화하는 Tn5로부터의 neo 유전자를 함유한다. 1 μ g /ml의 G418로 보충된 알파 마이너스 MEM 중에 세포를 접종한다. 2 일 후에, 세포를 트립신처리하고 하이브리도마 클로닝 플레이트(독일 소재의 Greiner) 내에서 10, 25, 또는 50 ng/ml의 메토틱렉세이트 + 1 μ g /ml의 G418로 보충된 알파 마이너스 MEM 중에 접종한다. 약 10 내지 14 일 후에, 단일 클론을 트립신처리한 후, 상이한 농도의 메토틱렉세이트(50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM)를 사용하여 6-웰 페트리 접시 또는 10 ml 플라스크에 접종한다. 이어서, 가장 높은 농도의 메토틱렉세이트에서 성장하는 클론을 심지어 더 높은 농도의 메토틱렉세이트 (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)를 함유하는 새로운 6-웰 플레이트로 옮긴다. 100 내지 200 mM의 농도에서 성장하는 클론을 수득할 때까지 동일한 절차를 반복한다. 예를 들어, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 또는 역상 HPLC 분석에 의해 원하는 유전자 생성물의 발현을 분석한다.
- [0207] **실시예 2: 트랜스제닉 마우스를 사용하는 인간 TNF와 반응성인 고친화도 인간 IgG 단클론 항체의 생성.**

- [0208] **요약.** 하나 이상의 TNF-매개 질환의 치료를 위한 TNF의 작용을 억제하기 위해 치료적으로 사용될 수 있는 고친화도의 완전 인간 단클론 항체를 생성하기 위해 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 함유하는 트랜스제닉 마우스가 사용되었다. 중쇄 및 경쇄 둘 모두에 대한 인간 가변 및 불변 영역 항체 트랜스유전자를 함유하는 (CBA/J × C57/BL6/J) F₂ 하이브리드 마우스를 인간 재조합 TNF로 면역화한다(문헌[Taylor et al., Intl. Immunol. 6:579-591 (1993)]; 문헌[Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994)]; 문헌[Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996)]; 문헌[Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)]). 몇몇 융합체는 완전 인간 TNF 반응성 IgG 단클론 항체의 하나 이상의 패널을 산출하였다. 완전 인간 항-TNF 항체는 추가로 특성화된다. 모두가 IgG1κ이다. 그러한 항체는 1×10^9 내지 9×10^{12} 의 어딘가에서 친화도 상수를 갖는 것으로 확인된다. 이들 전체 인간 단클론 항체의 의외로 높은 친화도는, 이들이 TNF 관련 질환, 병리학, 또는 장애에서 치료적 응용을 위한 적합한 후보가 되게 한다.
- [0209] **약어.** BSA - 소 혈청 알부민; CO₂ - 이산화탄소; DMSO - 다이메틸 설펍사이드; EIA - 효소 면역검정; FBS - 소 태아 혈청; H₂O₂ - 과산화수소; HRP - 호스래디쉬 퍼옥시다아제; ID - 피내; Ig - 면역글로불린; TNF - 조직 괴사 인자 알파; IP - 복강내; IV - 정맥내; Mab - 단클론 항체; OD - 광학 밀도; OPD - o-페닐렌다이아민 다이하이드로클로라이드; PEG - 폴리에틸렌 글리콜; PSA - 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신; RT - 실온; SQ - 피하; v/v - 부피당 부피; w/v - 부피당 중량.
- [0210] **재료 및 방법.**
- [0211] **동물.** 인간 항체를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스는 본 기술 분야에 알려져 있고 구매가능하며(예를 들어, 미국 캘리포니아주 산호세 소재의 GenPharm International; 미국 캘리포니아주 프리몬트 소재의 Abgenix 등으로부터), 이는 인간 면역글로불린을 발현하지만 마우스 IgM 또는 Igκ는 발현하지 않는다. 예를 들어, 그러한 트랜스제닉 마우스는 V(D)J 결합, 중쇄 클래스 스위칭, 및 체세포 돌연변이를 받아 인간 서열 면역글로불린의 레퍼토리를 생산하는 인간 서열 트랜스유전자를 함유한다(문헌[Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994)]). 경쇄 트랜스유전자는, 예를 들어, 생식세포계열 인간 Vκ 영역의 거의 절반을 포함하는 효모 인공 염색체 클론으로부터 부분적으로 유래될 수 있다. 또한, 중쇄 트랜스유전자는 인간 μ 및 인간 γ1(문헌[Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)]) 및/또는 γ3 불변 영역 둘 모두를 암호화할 수 있다. 적절한 유전자형 계통으로부터 유래된 마우스를 면역화 및 융합 과정에 사용하여, TNF에 대한 전체 인간 단클론 항체를 생성할 수 있다.
- [0212] **면역화.** 하나 이상의 면역화 일정을 사용하여 항-TNF 인간 하이브리도마를 생성할 수 있다. 하기 예시적인 면역화 프로토콜 후에 최초 몇몇 융합을 수행할 수 있지만, 다른 유사한 알려진 프로토콜이 사용될 수 있다. 몇 마리의 14 내지 20 주령의 자성 마우스 및/또는 수술적으로 거세된 트랜스제닉 웅성 마우스를 100 내지 400 μL의 최종 부피(예를 들어, 200) 중에 동일한 부피의 TITERMAX 또는 완전 프로인트 보조제로 유화시킨 1 내지 1000 μg의 재조합 인간 TNF로 IP 및/또는 ID 면역화한다. 각각의 마우스는 또한 임의로 2 개의 SQ 부위 각각에 100 μL 생리 식염수 중의 1 내지 10 μg을 받을 수 있다. 이어서, 마우스는 1 내지 7, 5 내지 12, 10 내지 18, 17 내지 25, 및/또는 21 내지 34 일 후에 동일한 부피의 TITERMAX 또는 불완전 프로인트 보조제로 유화시킨 TNF로 IP(1 내지 400 μg) 및 SQ(1 내지 400 μg × 2) 면역화될 수 있다. 12 내지 25 일 및 25 내지 40 일 후에 항-응고제 없이 후안와 천공에 의해 마우스를 채혈할 수 있다. 이어서, 혈액을 1 시간 동안 RT에서 응고시키고, 혈청을 수집하고, 알려진 방법에 따라 TNF EIA 검정을 사용하여 적정한다. 반복된 주사가 역가(titer)의 증가를 야기하지 않을 때 융합을 수행한다. 그 시점에, 100 μL 생리 식염수에 희석된 1 내지 400 μg TNF의 최종 IV 부스터 주사를 마우스에게 제공할 수 있다. 3 일 후에, 경추 탈골에 의해 마우스를 안락사시키고, 비장을 무균적으로 제거하고, 100 U/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 및 0.25 μg/mL 암포테리신 B(PSA)를 함유하는 10 mL의 차가운 인산염 완충 식염수(PBS) 중에 침지시킬 수 있다. 비장을 PSA-PBS로 멸균적으로 관류함으로써 비장세포를 수확한다. 세포를 차가운 PSA-PBS 중에 1 회 세척하고, 트리판 블루 염료 배제를 사용하여 계수하고, 25 mM Hepes를 함유하는 RPMI 1640 배지에 재현탁시킨다.
- [0213] **세포 융합.** 예를 들어 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 알려진 방법에 따라 쥐과 골수종 세포 대 생존가능한 비장 세포의 1:1 내지 1:10 비로 융합을 실행할 수 있다. 비제한적인 예로서, 비장 세포 및 골수종 세포를 함께 펠렛화할 수 있다. 이어서, 37°C에서 1 mL의 50%(w/v) PEG/PBS 용액(PEG 분자량 1,450, Sigma) 중에 30 초에 걸쳐 펠렛을 천천히 재현탁시킬 수 있다. 이어서, 25 mM Hepes(37°C)를 함유하는 10.5 mL의 RPMI 1640 배지를 1 분에 걸쳐 천천히 첨가함으로써 융합을 중단시킬 수 있다. 융합된 세포를 500 내지 1500 rpm에서 5 분

동안 원심분리한다. 이어서, 세포를 HAT 배지(25 mM Hepes, 10% Fetal Clone I 혈청(Hyclone), 1 mM 피루브산 나트륨, 4 mM L-글루타민, 10 $\mu\text{g/mL}$ 겐타마이신, 2.5% Origen 배양 보충물(Fisher), 10% 653-조건화 RPMI 1640/Hepes 배지, 50 μM 2-메르캅토에탄올, 100 μM 하이포잔틴, 0.4 μM 아미노프테린, 및 16 μM 티미딘을 함유하는 RPMI 1640 배지)에 재현탁시킨 후, 200 μL /웰로 15 개의 96-웰 평탄 바닥 조직 배양 플레이트 내에 플레이트한다. 이어서, 플레이트를 7 내지 10 일 동안 5% CO_2 및 95% 공기를 함유하는 가습된 37 $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에 넣는다.

[0214] **마우스 혈청 중의 인간 IgG 항-TNF 항체의 검출.** 고체상 EIA를 사용하여 인간 TNF에 특이적인 인간 IgG 항체에 대한 마우스 혈청을 스크리닝할 수 있다. 약술하면, 플레이트를 PBS 중의 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 TNF로 하룻밤 코팅할 수 있다. 0.02%(v/v) Tween 20을 함유하는 0.15 M 식염수에 세척한 후, PBS 중의 1%(w/v) BSA, 200 μL /웰로 RT에서 1 시간 동안 웰을 차단할 수 있다. 플레이트를 즉시 사용하거나 향후 사용을 위해 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동시킨다. 마우스 혈청 희석액을 TNF 코팅된 플레이트 상에서 1 시간 동안 RT에서 50 μL /웰로 인큐베이션한다. 플레이트를 세척한 후, RT에서 1 시간 동안 1% BSA-PBS에 1:30,000으로 희석된 50 μL /웰의 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(Fc 특이적)로 프로빙한다. 플레이트를 다시 세척하고, 100 μL /웰의 시트레이트-포스페이트 기질 용액(0.1 M 시트르산 및 0.2 M 인산나트륨, 0.01% H_2O_2 및 1 mg/mL OPD)을 RT에서 15 분 동안 첨가한다. 이어서 정지 용액(4 N 황산)을 25 μL /웰로 첨가하고, 자동화 플레이트 분광광도계를 통해 490 nm에서 OD를 판독한다.

[0215] **하이브리도마 상청액 중의 완전 인간 면역글로불린의 검출.** 적합한 EIA를 사용하여, 전체 인간 면역글로불린을 분리하는 성장 양성 하이브리도마를 검출할 수 있다. 약술하면, 96 웰 팝-아웃 플레이트(VWR, 610744)를 탄산나트륨 완충제 중의 10 $\mu\text{g/mL}$ 염소 항-인간 IgG Fc로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 코팅할 수 있다. 플레이트를 세척하고 1% BSA-PBS로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 차단하고 즉시 사용하거나 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동시킨다. 희석되지 않은 하이브리도마 상청액을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션한다. 플레이트를 세척하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 1% BSA-PBS에 1:10,000으로 희석된 HRP 표지된 염소 항-인간 카파로 프로빙한다. 이어서, 플레이트를 상기 기재된 바와 같이 기질 용액과 함께 인큐베이션한다.

[0216] **전체 인간 항-TNF 반응성의 결정.** 상기와 같이, 적합한 RIA 또는 다른 검정을 사용하여 하이브리도마를 TNF에 대한 반응성에 대해 동시에 검정할 수 있다. 예를 들어, 상기와 같이 상청액을 염소 항-인간 IgG Fc 플레이트 상에서 인큐베이션하고 세척한 후, 웰당 적절한 계수를 갖는 방사성표지된 TNF로 RT에서 1 시간 동안 프로빙한다. 웰을 PBS로 2 회 세척하고, 결합된 방사성표지된 TNF를 적합한 계수기를 사용하여 정량화한다.

[0217] 인간 IgG1 κ 항-TNF 분비 하이브리도마를 세포 배양에서 확장시키고, 제한 희석에 의해 연속적으로 서브클로닝할 수 있다. 생성된 클론 집단을 확장시키고 냉동 배지(95% FBS, 5% DMSO) 중에 동결보존하고 액체 질소 중에 저장할 수 있다.

[0218] **동종형 결정.** 항체의 동종형 결정은 특정 역가에 대해 마우스 면역 혈청을 스크리닝하기 위해 사용되는 것과 유사한 포맷으로 EIA를 사용하여 수행할 수 있다. TNF를 상기 기재된 바와 같이 96-웰 플레이트 상에 코팅하고, 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 정제된 항체를 RT에서 1 시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션할 수 있다. 플레이트를 세척하고, RT에서 1 시간 동안 1% BSA-PBS에 1:4000으로 희석된 HRP 표지된 염소 항-인간 IgG₁ 또는 HRP 표지된 염소 항-인간 IgG₃으로 프로빙한다. 플레이트를 다시 세척하고, 상기 기재된 바와 같이 기질 용액과 함께 인큐베이션한다.

[0219] **인간 TNF와 인간 항-인간 TNF 항체의 결합 동역학.** 예를 들어, TNF 포획 EIA 및 BIAcore 기술을 사용하여 항체에 대한 결합 특징을 적합하게 평가할 수 있다. 상기 기재된 바와 같은 검정에서 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 TNF로 코팅된 EIA 플레이트에의 결합에 대해 정제된 인간 TNF 항체의 등급화된 농도를 평가할 수 있다. 이어서, 상대 결합 효율을 나타내는 반-로그 플롯으로서 OD가 제시될 수 있다.

[0220] 정량적 결합 상수는, 예를 들어 하기와 같이, 또는 임의의 다른 알려진 적합한 방법에 의해 얻어질 수 있다. BIAcore CM-5(카르복시메틸) 칩을 BIAcore 2000 단위에 넣는다. HBS 완충제(0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v P20 계면활성제, pH 7.4)를 안정한 기준선이 얻어질 때까지 5 μL /분으로 칩의 플로우 셀 위로 유동시킨다. 200 μL 의 물 중의 15 mg의 EDC(N-에틸-N'-(3-다이메틸-아미노프로필)-카르보다이이미드 하이드로클로라이드)의 용액(100 μL)을 200 μL 의 물 중의 2.3 mg의 NHS(N-하이드록시석신아미드)의 용액 100 μL 에 첨가한다. 40 μL 의 생성되는 용액을 칩 상에 주입한다. 6 μL 의 인간 TNF 용액(10 mM 아세트산나트륨 중의 15 $\mu\text{g/mL}$, pH 4.8)을 칩 상에 주입하여, 약 500 RU의 증가를 유발한다. 완충제를 TBS/Ca/Mg/BSA 작동 완충

제(20 mM 트리스, 0.15 M 염화나트륨, 2 mM 염화칼슘, 2 mM 아세트산마그네슘, 0.5% Triton X-100, 25 $\mu\text{g/mL}$ BSA, pH 7.4)으로 변경하고, 칩 위로 하룻밤 유동시켜 그것을 평형화하고 임의의 미반응 석신이미드 에스테르를 가수분해하거나 캡핑한다.

[0221] 항체를 작동 완충제 중에 33.33, 16.67, 8.33, 및 4.17 nM로 용해시킨다. 유속을 30 $\mu\text{L/min}$ 으로 조정하고 기기 온도를 25°C로 조정한다. 동역학 실험을 위해 2 개의 플로우 셀을 사용하며, 하나는 그 위에 TNF가 고정된 것이고(샘플) 두 번째는 유도체화되지 않은 플로우 셀이다(블랭크). 120 μL 의 각각의 항체 농도를 30 $\mu\text{L/min}$ 으로 플로우 셀 위에 주입한 후(회합 단계), 중단되지 않는 360 초의 완충제 유동(해리 단계)이 이어진다. 2 M 구아니딘 티오시아네이트의 각각 30 μL 의 순차적 2 회 주입에 의해 칩의 표면을 재생한다(조직 피사 인자 알파/항체 복합체가 해리됨).

[0222] 데이터의 분석은 본 기술 분야에 알려진 바와 같이 BIA 평가 3.0 또는 CLAMP 2.0을 사용하여 실행한다. 각각의 항체 농도에 대해, 샘플 센소그램으로부터 블랭크 센소그램을 감산한다. 해리(k_d, sec^{-1}) 및 회합($k_a, \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$) 둘 모두에 대해 전반적 적합(global fit)을 실행하고 해리 상수(K_D, mol)를 계산한다(k_d/k_a). 포획된 항체의 RU가 100 을 초과할 만큼 항체 친화도가 충분히 높은 경우에는, 항체의 추가 회석이 실행된다.

[0223] 결과 및 토의

[0224] **항-인간 TNF 단클론 항체의 생성.** 몇몇 융합을 수행하고 각각의 융합을 15 개의 플레이트에 접종하며(1440 웰/융합), 이는 인간 TNF에 특이적인 수십 개의 항체를 산출한다. 이들 중에서, 일부는 인간 및 마우스 Ig 사슬의 조합으로 이루어진 것으로 확인된다. 나머지 하이브리도마는 인간 중쇄 및 경쇄만으로 이루어진 항-TNF 항체를 분비한다. 인간 하이브리도마 중 모두가 IgG1 κ 일 것으로 예상된다.

[0225] **인간 항-인간 TNF 항체의 결합 동역학** 이들 하이브리도마 중 대부분 또는 전부로부터 정제된 항체가 농도-의존적 방식으로 TNF에 결합함이 ELISA 분석에 의해 확인되었다. 도 1 내지 도 2는 이들 항체의 상대 결합 효율의 결과를 나타낸다. 이 경우에, 항체의 동족 항원(에피토프)에 대한 항체의 결합활성을 측정한다. EIA 플레이트에 직접 TNF를 결합시키는 것은 단백질의 변성을 야기할 수 있고, 외견상의 결합 친화도는 비변성 단백질에 대한 결합을 반영할 수 없음에 유의하여야 한다. 소정 범위의 농도에 걸쳐 50 퍼센트의 결합이 확인된다.

[0226] 인간 항체의 BIAcore 분석을 사용하여 정량적 결합 상수가 얻어지며, 인간 단클론 항체 중 몇 개는 1×10^{-9} 내지 7×10^{-12} 범위의 K_D 로 매우 높은 친화도인 것으로 밝혀진다.

[0227] 결론.

[0228] 인간 TNF로 면역화된 인간 가변 및 불변 영역 항체 트랜스유전자를 함유하는 하이브리드 마우스로부터의 비장세포를 이용하여 몇몇 융합을 수행한다. IgG1 κ 동종형의 몇몇 완전 인간 TNF 반응성 IgG 단클론 항체의 세트가 생성된다. 완전 인간 항-TNF 항체를 추가로 특성화한다. 생성된 항체 중 몇 개는 친화도 상수가 1×10^9 내지 9×10^{12} 였다. 이들 전체 인간 단클론 항체의 의외로 높은 친화도는, 이들이 TNF-의존성 질환, 병리학, 또는 관련 병태에서 치료적 응용에 적합하게 한다.

[0229] 실시예 3: 인간 TNF α 에 대해 반응성인 인간 IgG 단클론 항체의 생성.

[0230] **요약.** 중쇄 및 경쇄 둘 모두에 대해 인간 가변 및 불변 영역 항체 트랜스유전자를 함유하는 (CBA/J $\times$ C57BL/6J) F₂ 하이브리드 마우스(1 내지 4 마리)를 재조합 인간 TNF α 로 면역화하였다. GenTNV로 명명된 하나의 융합은 고정된 재조합 인간 TNF κ 에 결합하는 8 개의 전체적 인간 IgG1 α 단클론 항체를 산출하였다. 확인 직후에, 8 개의 세포주를 추가의 특성화를 위해 분자 생물학으로 이전하였다. 이들 Mab는 서열이 전체적으로 인간이므로, 이들은 인간에서 cA2(Remicade)보다 덜 면역원성일 것으로 예상된다.

[0231] **약어.** BSA - 소 혈청 알부민; CO₂ - 이산화탄소; DMSO - 다이메틸 설펝사이드; EIA - 효소 면역검정; FBS - 소 태아 혈청; H₂O₂ - 과산화수소; HC - 중쇄; HRP - 호스래디쉬 퍼옥시다아제; ID - 피내; Ig - 면역글로불린; TNF - 조직 피사 인자 알파; IP - 복강내; IV - 정맥내; Mab - 단클론 항체; OD - 광학 밀도; OPD - o-페닐렌 다이아민 다이하이드로클로라이드; PEG - 폴리에틸렌 글리콜; PSA - 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신; RT - 실온; SQ - 피하; TNF α - 종양 피사 인자 알파; v/v - 부피당 부피; w/v - 부피당 중량.

- [0232] **서론.** 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 함유하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 제조한 인간 TNF α 에 특이적인 전체적 인간 단클론 항체를 생성하였다. cA2(Remicade)가 TNF α -매개 질환에 관여하는 염증 과정을 치료적으로 억제하기 위해 사용되듯이, 혈청 반감기의 증가 및 면역원성에 관련된 부작용의 감소의 이점과 함께 이들 독특한 항체가 사용될 수 있기를 희망한다.
- [0233] **재료 및 방법.**
- [0234] **동물.** 마우스 IgM 또는 Ig κ 가 아닌 인간 면역글로불린을 발현하는 트랜스제닉 마우스는 GenPharm International에 의해 개발되었다. 이들 마우스는 *V(D)J* 결합, 중쇄 클래스 스위칭, 및 체세포 돌연변이를 받아 항원-특이적 인간 면역글로불린(1)의 레퍼토리를 생산하는 기능적 인간 항체 트랜스유전자를 함유한다. 경쇄 트랜스유전자는, 생식세포계열 인간 V_{κ} 유전자좌의 거의 절반을 포함하는 효모 인공 염색체 클론으로부터 부분적으로 유래된다. 몇몇 VH 유전자에 더하여, 중쇄(HC) 트랜스유전자는 인간 μ 및 인간 $\gamma 1(2)$ 및/또는 $\gamma 3$ 불변 영역 둘 모두를 암호화한다. HCo12/KCo5 유전자형 계통으로부터 유래된 마우스를 면역화 및 융합 과정에 사용하여 본 명세서에 기재된 단클론 항체를 생성하였다.
- [0235] **인간 TNF α 의 정제.** Sepharose 4B(Pharmacia)에 커플링된 TNF α 수용체-Fc 융합 단백질(p55-sf2)(5)로 패킹된 컬럼을 사용하여 친화도 크로마토그래피에 의해 C237A 세포로부터의 조직 배양 상청액으로부터 인간 TNF α 를 정제하였다. 세포 상청액을 그의 부피의 1/9의 10x 돌베코 PBS(D-PBS)와 혼합하고 4°C에서 4 mL/min으로 컬럼에 통과시켰다. 이어서, 컬럼을 PBS로 세척하고 TNF α 를 0.1 M 시트르산나트륨, pH 3.5로 용출시키고, 2 M 트리스-HCl pH 8.5로 중화시켰다. 정제된 TNF α 를 10 mM 트리스, 0.12 M 염화나트륨 pH 7.5로 완충제 교환하고, 0.2 μ m 주사기 필터를 통해 여과하였다.
- [0236] **면역화.** 대략 16 주령의 자성 GenPharm 마우스를, 제0일, 제12일, 및 제28일에 동일한 부피의 Titermax 보조제로 유화시킨 TNF α (로트 JG102298 또는 JG102098) 총 100 μ g으로 IP(200 μ L) 및 ID(꼬리의 기부에서 100 μ L) 면역화하였다. 제21일 및 제35일에 항-응고제 없이 후안와 천공에 의해 마우스를 채혈하였다. 혈액을 RT에서 1 시간 동안 응고시키고, 혈청을 수집하고, TNF α 고체상 EIA 검정을 사용하여 적정하였다. 제28일의 주사 후 7 주 동안 마우스가 휴식하도록 한 후에 GenTNV로 명명된 융합을 수행하였다. 이어서, TNF α 에 대해 1:160의 특이적 인간 IgG 역가를 갖는 마우스에게 100 μ L의 생리 식염수에 희석된 50 μ g의 TNF α 의 최종 IV 부스터 주사를 제공하였다. 3 일 후에, 경추 탈골에 의해 마우스를 안락사시키고, 비장을 무균적으로 제거하고, 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 및 0.25 μ g/mL 암포테리신 B(PSA)를 함유하는 10 mL의 차가운 인산염 완충 식염수(PBS) 중에 침지시켰다. 비장을 PSA-PBS로 멸균적으로 관류함으로써 비장세포를 수확하였다. 세포를 차가운 PSA-PBS 중에 1 회 세척하고, Coulter 계수기를 사용하여 계수하고, 25 mM Hepes를 함유하는 RPMI 1640 배지에 재현탁시켰다.
- [0237] **세포주.** 비-분비 마우스 골수종 융합 파트너, 653을 5-14-97에 Centocor의 제품 개발군으로부터 세포 생물학 서비스(CBS) 그룹 내로 수용하였다. 세포주를 10%(v/v) FBS(Cell Culture Labs), 1 mM 피루브산나트륨, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-글루타민(모두 JRH Biosciences로부터 입수함)으로 보충된 RPMI 배지(JRH Biosciences) 중에 확장시키고, 95% FBS 및 5% DMSO(Sigma) 중에 동결보존한 후, CBS 내의 증기상 액체 질소 냉동기에 저장하였다. 세포 은행은 멸균상태였고(Quality Control Centocor, 댈버른 소재) 마이코플라스마가 없었다(Bionique Laboratories). 융합될 때까지 세포를 대수기 배양으로 유지하였다. 이들을 PBS에 세척하고, 계수하고, 융합 전에 트리판 블루 염료 배제를 통해 생존력을 결정하였다(>95%).
- [0238] Centocor의 분자 생물학에서 생성된, C237A로 명명된 제조한 세포주에 의해 인간 TNF α 가 생산되었다. 세포주를 5%(v/v) FBS(Cell Culture Labs), 2 mM L-글루타민(모두 JRH Biosciences로부터 입수함), 및 0.5 :g/mL 마이코페놀산으로 보충된 IMDM 배지(JRH Biosciences) 중에 확장시키고, 95% FBS 및 5% DMSO(Sigma) 중에 동결보존한 후, CBS 내의 증기상 액체 질소 냉동기에 저장하였다(13). 세포 은행은 멸균상태였고(Quality Control Centocor, 댈버른 소재) 마이코플라스마가 없었다(Bionique Laboratories).
- [0239] **세포 융합.** 1:1 비의 653 쥐과 골수종 세포 및 생존가능한 쥐과 비장 세포를 사용하여 세포 융합을 실행하였다. 약술하면, 비장 세포 및 골수종 세포를 함께 펠렛화하였다. 펠렛을 37°C에서 1 mL의 50%(w/v) PEG/PBS 용액(1,450 g/몰의 PEG 분자량, Sigma) 중에 30 초 기간에 걸쳐 천천히 재현탁시켰다. 10.5 mL의 RPMI 배지(첨가제 없음)(JRH)(37°C)를 1 분에 걸쳐 천천히 첨가함으로써 융합을 중단하였다. 융합된 세포를 750 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 이어서, 세포를 HAT 배지(10% 소 태아 혈청(JRH), 1 mM 피루브산나트륨, 2 mM L-글루타민, 10 μ g/mL 겐타마이신, 2.5%의 Origen 배양 보충물(Fisher), 50 μ M 2-메르캅토에탄올, 1% 653-조건화 RPMI 배지, 100 μ M 하이포잔틴, 0.4 μ M 아미노프테린, 및 16 μ M 티미딘을 함유하는

RPMI/HEPES 배지)에 재현탁시킨 후, 200 μ L/웰로 5 개의 96-웰 평탄 바닥 조직 배양 플레이트 내에 플레이팅하였다. 이어서, 플레이트를 7 내지 10 일 동안 5% CO₂ 및 95% 공기를 함유하는 가습된 37°C 인큐베이터에 넣었다.

[0240] 마우스 혈청 중의 인간 IgG 항-TNF α 항체의 검출. 고체상 EIA를 사용하여 인간 TNF α 에 특이적인 인간 IgG 항체에 대한 마우스 혈청을 스크리닝하였다. 약술하면, 플레이트를 PBS 중의 1 μ g/mL의 TNF α 로 하룻밤 코팅하였다. 0.02%(v/v) Tween 20을 함유하는 0.15 M 식염수에 세척한 후, PBS 중의 1%(w/v) BSA, 200 μ L/웰로 RT에서 1 시간 동안 웰을 차단하였다. 플레이트를 즉시 사용하거나 향후 사용을 위해 -20°C에서 냉동시켰다. 마우스 혈청을 RT에서 1 시간 동안 50 μ L/웰로 인간 TNF α -코팅된 플레이트 상에서 2-배 연속 희석으로 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 후, RT에서 1 시간 동안 1% BSA-PBS에 1:30,000으로 희석된 50 μ L/웰의 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(Fc 특이적)(Accurate)로 프로빙하였다. 플레이트를 다시 세척하고, 100 μ L/웰의 시트레이트-포스페이트 기질 용액(0.1 M 시트르산 및 0.2 M 인산나트륨, 0.01% H₂O₂, 및 1 mg/mL OPD)을 RT에서 15 분 동안 첨가하였다. 이어서 정지 용액(4 N 황산)을 25 μ L/웰로 첨가하고, 자동화 플레이트 분광광도계를 사용하여 490 nm에서 OD를 판독하였다.

[0241] 하이브리도마 상청액 중의 전체적 인간 면역글로불린의 검출. GenPharm 마우스는 마우스 및 인간 면역글로불린 사슬 둘 모두를 생성할 수 있기 때문에, 2 개의 별도의 EIA 검정을 사용하여 인간 경쇄 및 인간 중쇄 둘 모두의 존재에 대해 성장-양성 하이브리도마 클론을 시험하였다. 상기 기재된 바와 같이 플레이트를 코팅하고 희석하지 않은 하이브리도마 상청액을 플레이트 상에서 1 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 1% BSA-HBSS에 1:10,000으로 희석된 HRP-접합 염소 항-인간 카파(Southern Biotech) 항체 또는 1% BSA-HBSS에 1:30,000으로 희석된 HRP-접합 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 항체로 1 시간 동안 37°C에서 프로빙하였다. 이어서, 플레이트를 상기 기재된 바와 같이 기질 용액과 함께 인큐베이션하였다. 항-인간 카파 및 항-인간 IgG Fc EIA 포맷 둘 모두에서 양성 신호를 제공하지 않은 하이브리도마 클론은 폐기하였다.

[0242] 동종형 결정. 항체의 동종형 결정은 특정 역가에 대해 마우스 면역 혈청을 스크리닝하기 위해 사용되는 것과 유사한 포맷으로 EIA를 사용하여 수행하였다. EIA 플레이트를 염소 항-인간 IgG(H+ L)로 탄산나트륨 완충제 중의 10 :g/mL로 4 EC 에서 하룻밤 코팅하고, 상기 기재된 바와 같이 차단하였다. 24 웰 배양물로부터의 순수 상청액을 RT에서 1 시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, RT에서 1 시간 동안 1% BSA-PBS에 1:4000으로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄(Binding Site)로 프로빙하였다. 플레이트를 다시 세척하고, 상기 기재된 바와 같이 기질 용액과 함께 인큐베이션하였다.

[0243] 결과 및 토의. 전체적 인간 항-인간 TNF α 단클론 항체의 생성. 재조합 인간 TNF α 단백질로 면역화된 GenPharm 마우스로부터 GenTNV로 명명된 하나의 융합을 수행하였다. 이러한 융합으로부터, 196 개의 성장-양성 하이브리드를 스크리닝하였다. 인간 TNF α 와 반응성인 전체적 인간 IgG 항체를 분비하는 8 개의 하이브리도마 세포주를 확인하였다. 이들 8 개의 세포주 각각은 인간 IgG1 κ 동종형의 면역글로불린을 분비하고, 제한 희석에 의해 모두 2 회 서브클로닝하여 안정한 세포주를 얻었다(90% 초과로 균질함). 세포주 명칭 및 각각의 C 코드 표기가 표 1에 열거되어 있다. 각각의 세포주를 액체 질소에 저장된 12-바이알 연구 세포 은행에 냉동시켰다.

[0244] 8 개의 세포주 각각에 대해 24-웰 배양 접시의 웰로부터 수집한 모 세포를 2-18-99에 형질주입 및 추가의 특성화를 위해 분자 생물학 그룹에 인계하였다.

[0245] [표 1]

[0246] GenTNV 세포주 표기

명칭	C 코드 표기
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

[0247]

[0248] 결론.

[0249] Centocor에서 제조된 재조합 인간 TNF α 로 면역화한 인간 가변 및 불변 영역 항체 트랜스유전자를 함유하는 하 이브리드 마우스로부터의 비장세포를 이용하여 GenTNV 융합을 수행하였다. IgG1 κ 동종형의 전체적 인간 TNF α -반응성 IgG 단클론 항체 8 개가 생산되었다. 추가의 특성화 및 개발을 위해 모 세포주를 분자 생물학 그룹에 이전하였다. 이들 새로운 인간 항체 중 하나는 Remicade와 비교하여 감소된 면역원성 및 알레르기-유형 합병증의 잠재적인 이익을 갖는 항염증에 유용한 것으로 입증될 수 있다.

[0250] 참고문헌

[0251] Taylor, et al., International Immunology 6:579-591 (1993).

[0252] Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994).

[0253] Neuberger, M. Nature Biotechnology 14:826 (1996).

[0254] Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996).

[0255] Scallon, et al., Cytokine 7:759-770 (1995).

[0256] 실시예 4: 인간 항-TNF α 항체를 발현하는 세포주의 클로닝 및 제조.

[0257] 요약. TNV 표기를 갖는 8 개의 인간 단클론 항체(mAb)의 패널은 고정된 인간 TNF α 에 외견상 높은 결합활성으로 결합하는 것으로 확인되었다. 8 개의 mAb 중 7 개는 재조합 TNF 수용체에 대한 huTNF α 결합을 효율적으로 차단하는 것으로 나타났다. 7 개의 mAb를 암호화하는 DNA의 서열 분석에 의해 모든 mAb가 인간 V 영역을 가졌음이 확인되었다. 또한, 8 개의 mAb의 원래의 패널이 TNV14, TNV15, TNV148, 및 TNV196로 나타낸 4 개의 별개의 mAb 만을 함유하도록, 3 쌍의 mAb가 서로 동일하였음이 DNA 서열에 의해 밝혀졌다. mAb의 추정된 아미노산 서열의 분석 및 시험관내 TNF α 중화 데이터의 결과에 기초하여, 추가의 연구를 위해 mAb TNV148 및 TNV14를 선택하였다.

[0258] 데이터베이스 검색 중에 TNV148 중쇄 내의 위치 75(프레임워크 3)에 있는 프롤린 잔기가 동일한 하위군의 다른 인간 항체 내의 그 위치에서 확인되지 않았으므로, 알려진 생식세포계열 프레임워크 e 서열에 그것을 일치시키기 위하여 부위-지정 DNA 돌연변이유발을 수행하여 그 위치에 세린 잔기를 암호화하였다. 세린 변형된 mAb를 TNV148B로 표기하였다. 2000년 10월 7일자로 출원되고 발명의 명칭이 "IL-12 항체, 조성물, 방법, 및 용도(IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses)"이며 WO 02/12500으로서 공개된, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 출원 제60/236,827호에 개시된 최근에 클로닝된 다른 인간 mAb의 중쇄 및 경쇄 유전자(12B75)에 기초한 새로 제조된 발현 벡터 내로 TNV148B 및 TNV14의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 PCR-

증폭 DNA를 클로닝하였다.

[0259] P3X63Ag8.653(653) 세포 또는 Sp2/0-Ag14(Sp2/0) 마우스 골수종 세포를 각각의 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드로 형질주입하고 높은 수준의 재조합 TNV148B 및 TNV14(rTNV148B 및 rTNV14) mAb를 생산하는 세포주에 대해 2라운드의 서브클로닝을 통해 스크리닝하였다. 성장 곡선 및 시간 경과에 따른 mAb 생산의 안정성의 평가에 의해 653-형질주입체 클론 C466D 및 C466C는 소모된 배양물에서 대략 125 :g/ml의 rTNV148B mAb를 안정하게 생산한 반면에 Sp2/0 형질주입체 1.73-12-122(C467A)는 소모된 배양물에서 대략 25 :g/ml의 rTNV148B mAb를 안정하게 생산한 것으로 나타났다. 유사한 분석에 의해 Sp2/0-형질주입체 클론 C476A는 소모된 배양물에서 18 :g/ml의 rTNV14를 생산한 것으로 나타났다.

[0260] 서론. 인간 TNF α -면역화 GenPharm/Medarex 마우스(HCo12/KCo5 유전자형)로부터 유래된 8 개의 mAb의 패널은 인간 TNF α 에 결합하고 전체적 인간 IgG1, 카파 동종형을 갖는 것으로 이전에 나타났다. 단순 결합 검정을 사용하여, TNF α 가 재조합 TNF 수용체에 결합하는 것을 차단하는 그들의 능력을 평가함으로써, 본 발명의 예시적인 mAb가 TNF α -중화 활성을 가질 가능성이 있는지 여부를 결정하였다. 그러한 결과, DNA 서열 결과, 및 mAb 중 몇개의 시험관내 특성화에 기초하여, 추가로 특성화할 mAb로서 TNV148이 선택되었다.

[0261] TNV148 mAb를 암호화하는 DNA 서열을 클로닝하고, 적합한 불변 영역을 암호화하는 유전자 발현 벡터 내로 적합되도록 변형하고, 잘 특성화된 653 및 Sp2/0 마우스 골수종 세포 내로 도입하고, 생성되는 형질주입 세포주를 원래의 하이브리도마 세포주보다 40-배 더 많은 mAb를 생산하는 서브클론이 확인될 때까지 스크리닝하였다.

[0262] **재료 및 방법.**

[0263] **시약 및 세포.** TRIZOL 시약은 Gibco BRL로부터 구매하였다. 프로테이나제 K는 Sigma Chemical Company로부터 입수하였다. 역전사효소는 Life Sciences, Inc.로부터 입수하였다. Taq DNA 폴리머라제는 Perkin Elmer Cetus 또는 Gibco BRL로부터 입수하였다. 제한 효소는 New England Biolabs로부터 구매하였다. QIAquick PCR 정제 키트는 Qiagen으로부터 입수하였다. QuikChange 부위-지정 돌연변이유발 키트는 Stratagene으로부터 구매하였다. Wizard 플라스미드 미니프렙 키트 및 Rnasin은 Promega로부터 입수하였다. Optiplate는 Packard로부터 입수하였다. ¹²⁵요오드는 Amersham으로부터 구매하였다. 주문제작 올리고뉴클레오티드는 Keystone/Biosource International로부터 구매하였다. 본 연구에 사용된 올리고뉴클레오티드의 명칭, 식별 번호, 및 서열은 표 2에 나타낸다.

[0264] [표 2]

[0265] **TNV mAb 유전자를 클로닝하거나 조작하거나 서열분석하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드.**

[0266] 올리고뉴클레오티드 5'14s 및 HuH-J6에 의해 암호화되는 아미노산은 서열 위에 나타낸다. 'M' 아미노산 잔기는 번역 시작 코돈을 나타낸다. 올리고뉴클레오티드 5'14s 및 HuH-J6 내의 밑줄 친 서열은 각각 BsiWI 및 BstBI 제한 부위를 표시한다. HuH-J6 내의 사선은 엑손/인트론 경계에 상응한다. 서열이 (-) 스트랜드에 상응하는 올리고뉴클레오티드는 3'-5' 배향으로 작성되어 있음에 유의한다.

명칭	ID	서열
HGI-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (서열 번호 10)
HGI-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (서열 번호 11)
HGIhg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5'(서열 번호 12)
HGI-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (서열 번호 13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (서열 번호 14)
HuK-3Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATT-5' (서열 번호 15)
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (서열 번호 16)
BsiWI	M D W T W S I	(서열 번호 17)
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (서열 번호 18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (서열 번호 19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (서열 번호 20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCCTC-3' (서열 번호 21)
5'73 s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCCTC-3' (서열 번호 22)
T V T V S S	BstBI	(서열 번호 23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5' (서열 번호 24)
SalI	M D M R V	(서열 번호 25)
LK7s	362	5'-TTTGTGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (서열 번호 26)
LVgs	363	5'-TTTGTGACACCATGGAAGCCCAGCTC-3' (서열 번호 27)
T K V D I K	Afl2	(서열 번호 28)
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAAAATTCGGCGCCTTT (서열 번호 29)
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATC-3' (서열 번호 30)
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAAGGTTCTTGTGCGACATAG-5' (서열 번호 31)

[0267]

[0268]

653 마우스 골수종 세포의 단일 냉동 바이알을 얻었다. 바이알을 그 날에 해동시키고, T 플라스크에서 IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민(배지) 중에 확장시켰다. 이들 세포를 본 명세서에 기재된 항-TNF DNA로 2 내지 3 주 후에 형질주입시킬 때까지 연속 배양 중에 유지하였다. 배양물 중의 일부를 해동일 후 5 일에 수확하고, 원심분리에 의해 펠렛화하고, 95% FBS, 5% DMSO 중에 재현탁시키고, 30 개의 바이알 내로 분취하고, 냉동시키고, 향후 사용을 위해 저장하였다. 유사하게, Sp2/0 마우스 골수종 세포의 단일 냉동 바이알을 얻었다. 바이알을 해동시키고, 상기 기재된 바와 같이 새로운 냉동물을 제조하고, 냉동된 바이알을 CBC 냉동기 박스 AA 및 AB에 저장하였다. 이들 세포를 해동시키고, 본 명세서에 기재된 모든 Sp2/0 형질주입에 사용하였다.

[0269]

수용체에 대한 TNF 결합의 억제에 대한 검정. TNV mAb를 함유하는 하이브리도마 세포 상청액을 사용하여, 재조합 TNF 수용체 융합 단백질인 p55-sf2에 대한 ¹²⁵I-표지된 TNF α의 결합을 차단하는 mAb의 능력에 대해 검정하였다(문헌[Scallion et al. (1995) *Cytokine* 7:759-770]). PBS 중의 0.5 :g/ml의 p55-sf2 50 :l를 Optiplate에 첨가하여 37°C에서 1 시간 인큐베이션 중에 웰을 코팅하였다. 희석제로서 PBS/0.1% BSA를 사용하여 8 개의 TNV 세포 상청액의 연속 희석액을 96-웰 둥근 바닥 플레이트 내에 제조하였다. 항-IL-18 mAb를 함유하는 세포 상청액을 음성 대조군으로서 포함시켰고, cA2(항-TNF 키메라 항체, Remicade, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제5,770,198호)로 스파이킹된 동일한 항-IL-18 상청액을 양성 대조군으로서 포함시켰다. 5 ng/ml

의 최종 TNF α 농도를 갖도록 125 I-표지된 TNF α (58 $^{\circ}\text{C}$ /i:g, D. Shehey)를 100 :1의 세포 상청액에 첨가하였다. 혼합물을 RT에서 1 시간 동안 사전 인큐베이션하였다. 코팅된 Optiplate를 세척하여 미결합 p55-sf2를 제거하고 50 :1의 125 I-TNF α /세포 상청액 혼합물을 Optiplate에 이전하였다. RT에서 2 시간 후에, Optiplate를 PBS-Tween으로 3 회 세척하였다. 100 :1의 Microscint -20을 첨가하고, 결합된 cpm을 TopCount 감마 계수기를 사용하여 결정하였다.

[0270] V 유전자의 증폭 및 DNA 서열 분석. 하이브리도마 세포를 PBS에 1 회 세척한 후, RNA 제조를 위해 TRIZOL 시약을 첨가하였다. 7×10^6 내지 1.7×10^7 세포를 1 ml의 TRIZOL에 재현탁시켰다. 200 μl 의 클로로포름을 첨가한 후에 튜브를 격렬하게 진탕하였다. 샘플을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분 동안 원심분리하였다. 수성상을 새로운 마이크로로피지 튜브에 이전하고 동일한 부피의 아이소프로판올을 첨가하였다. 튜브를 격렬하게 진탕하고 실온에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 1 ml의 70% 에탄올로 1 회 세척하고 진공 건조기 내에서 잠시 건조시켰다. RNA 펠렛을 40 μl 의 DEPC-처리된 물로 재현탁시켰다. 1% 아가로스 겔에서 0.5 μl 를 분별함으로써 RNA 제조물의 품질을 결정하였다. 사용할 때까지 RNA를 -80 $^{\circ}\text{C}$ 냉동기에 저장하였다.

[0271] 중쇄 및 경쇄 cDNA를 제조하기 위하여, 11.5 μl 의 부피 내에 3 μl 의 RNA 및 1 μg 의 올리고뉴클레오타이드 119 (중쇄) 또는 올리고뉴클레오타이드 117(경쇄)(표 1 참조)을 포함하는 혼합물을 제조하였다. 수조 내에서 10 분 동안 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 혼합물을 인큐베이션한 후, 10 분 동안 얼음 상에서 냉각시켰다. 2.5 μl 의 10X 역전사효소 완충제, 10 μl 의 2.5 mM dNTP, 1 μl 의 역전사효소(20 단위), 및 0.4 μl 의 리보뉴클레아제 억제제 RNasin(1 단위)으로 구성된 별도의 혼합물을 제조하였다. 이 혼합물 13.5 μl 를 냉각된 RNA/올리고뉴클레오타이드 혼합물 11.5 μl 에 첨가하고, 반응물을 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, cDNA 합성 반응물을 사용할 때까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 냉동기에 저장하였다.

[0272] 가변 영역 코딩 서열을 PCR 증폭하기 위한 주형으로서 정제하지 않은 중쇄 및 경쇄 cDNA를 사용하였다. 5 개의 올리고뉴클레오타이드 쌍(366/354, 367/354, 368/354, 369/354, 및 370/354, 표 1)을 중쇄 DNA의 증폭을 프라이밍하는 그들의 능력에 대해 동시에 시험하였다. 2 개의 올리고뉴클레오타이드 쌍(362/208 및 363/208)을 경쇄 DNA의 증폭을 프라이밍하는 그들의 능력에 대해 동시에 시험하였다. 50 μl 의 총 부피 내에 2 단위의 PLATINUMTM 고충실도(HIFI) Taq DNA 폴리머라제를 사용하여 PCR 반응을 실행하였다. 각각의 반응은 2 μl 의 cDNA 반응물, 10 pmol의 각각의 올리고뉴클레오타이드, 0.2 mM의 dNTP, 5 μl 의 10 $\times$ HIFI 완충제, 및 2 mM의 황산마그네슘을 포함하였다. 열 사이클러 프로그램은 5 분 동안 95 $^{\circ}\text{C}$ 에 이어서 30 사이클의 (30 초 동안 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 초 동안 62 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 분 동안 68 $^{\circ}\text{C}$)였다. 이어서, 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분 동안의 최종 인큐베이션이 있었다.

[0273] 직접 DNA 서열분석을 위한 PCR 생성물을 제조하기 위하여, 제조자의 프로토콜에 따라 QIAquickTM PCR 정제 키트를 사용하여 그들을 정제하였다. 50 μl 의 멸균수를 사용하여 DNA를 스핀 컬럼으로부터 용출시킨 후, 진공 건조기를 사용하여 10 μl 의 부피까지 건조시켰다. 이어서, 20 μl 의 총 부피에 대해 1 μl 의 정제된 PCR 생성물, 10 μM 의 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 4 μl 의 BigDye TerminatorTM 준비 반응 믹스, 및 14 μl 의 멸균수로 DNA 서열분석 반응을 설정하였다. 올리고뉴클레오타이드 쌍 367/354로 제조된 중쇄 PCR 생성물을 올리고뉴클레오타이드 프라이머 159 및 360으로 서열분석하였다. 올리고뉴클레오타이드 쌍 363/208로 제조된 경쇄 PCR 생성물을 올리고뉴클레오타이드 34 및 163으로 서열분석하였다. 서열분석을 위한 열 사이클러 프로그램은 25 사이클의 (30 초 동안 96 $^{\circ}\text{C}$, 15 초 동안 50 $^{\circ}\text{C}$, 4 분 동안 60 $^{\circ}\text{C}$)에 이어서 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤이었다. 반응 생성물을 폴리아크릴아미드 겔을 통해 분별하고 ABI 377 DNA 서열분석기를 사용하여 검출하였다.

[0274] 아미노산을 변화시키기 위한 부위-지정 돌연변이유발. TNV148 mAb 내의 세린 잔기로 Pro⁷⁵를 대체하기 위하여 TNV148 중쇄 가변 영역 DNA 서열 내의 단일 뉴클레오타이드를 변화시켰다. 제조자에 의해 기재된 바와 같은 QuikChangeTM 부위-지정 돌연변이유발 방법을 사용하여, 이 변화를 실행하기 위해 상보적인 올리고뉴클레오타이드, 399 및 400(표 1)을 설계하고 주문하였다. 2 개의 올리고뉴클레오타이드를 먼저 15% 폴리아크릴아미드 겔을 통해 분별하고 주요 밴드를 정제하였다. 10 ng 또는 50 ng의 TNV148 중쇄 플라스미드 주형(p1753), 5 μl 의 10x 반응 완충제, 1 μl 의 dNTP 믹스, 125 ng의 프라이머 399, 125 ng의 프라이머 400, 및 1 μl 의 Pfu DNA 폴리머라제를 사용하여 돌연변이유발 반응물을 제조하였다. 멸균수를 첨가하여 총 부피를 50 μl 로 만들었다. 이어서, 반응 혼합물을 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 초 동안, 그리고 이어서 30 초 동안 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 분 동안 55 $^{\circ}\text{C}$, 1 분 동안 64 $^{\circ}\text{C}$, 및 7 분 동안 68 $^{\circ}\text{C}$ 의 순차적 인큐베이션으로 14 회 사이클링 후, 2 분 동안 30 $^{\circ}\text{C}$ (1 사이클)에서 인큐베이션하도록 프로그래밍된 열 사이클러 내에서 인큐베이션하였다. 이들 반응은 돌연변이유발 올리고뉴

클레오티드를 그 외에는 동일한 새로 합성된 플라스미드에 통합하도록 설계되었다. 원래의 TNV148 플라스미드를 제거하기 위하여, 샘플을 1 μ l의 DpnI 엔도뉴클레아제의 첨가 후 1 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였으며, 이는 원래의 메틸화된 플라스미드만을 절단한다. 이어서, 1 μ l의 반응물을 사용하여 표준 열-쇼크 방법에 의해 Epicurian Coli XL1-Blue 수퍼컴피턴트 이. 콜라이를 형질전환하고, LB-암피실린 한천 플레이트 상에 플레이팅한 후에 형질전환된 박테리아를 확인하였다. 제조자에 의해 기재된 바와 같이 Wizard™ 키트를 사용하여 플라스미드 미니프렘을 제조하였다. Wizard™ 컬럼으로부터 샘플을 용출시킨 후에, 플라스미드 DNA를 에탄올로 침전시켜 플라스미드 DNA를 추가로 정제하고, 이어서 20 μ l의 멸균수에 재현탁시켰다. 이어서, DNA 서열 분석을 수행하여, 원하는 염기 변화를 가진 플라스미드 클론을 확인하고, TNV148 코딩 서열 내로 다른 염기 변화가 의도하지 않게 도입되지 않았음을 확인하였다. 1 μ l의 플라스미드에, 섹션 4.3에 기재된 것과 동일한 파라미터를 사용하여, 3 μ l의 BigDye 믹스, 1 μ l의 pUC19 정방향 프라이머, 및 10 μ l의 멸균수로 제조된 사이클 서열분석 반응을 적용하였다.

[0275] 12B75 유전자로부터의 발현 벡터의 작제. 몇몇 재조합 DNA 단계를 수행하여, 2000년 10월 7일자로 출원되고 발명의 명칭이 "IL-12 항체, 조성물, 방법, 및 용도"이며 WO 02/12500으로서 공개된, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 출원 제60/236,827호에 개시된 12B75-암호화 중쇄 및 경쇄 유전자의 이전에 클로닝된 게놈 카피로부터의 새로운 인간 IgG1 발현 벡터 및 새로운 인간 카파 발현 벡터를 각각 제조하였다. 임의의 적절한 설계된 PCR-증폭된 가변 영역에 의한 기존의 가변 영역 서열의 단순한 1-단계 대체를 허용하도록 최종 벡터를 설계하였다.

[0276] 플라스미드 p1560에서 12B75 중쇄 유전자를 변형시키기 위하여, 프로모터 및 가변 영역을 함유하는 6.85 kb BamHI/HindIII 단편을 p1560으로부터 pUC19로 이전하여 p1743을 제조하였다. p1560에 비교하여 이 플라스미드의 더 작은 크기는, 제조자의 프로토콜에 따라 번역 개시 부위의 바로 상류에 독특한 BsiWI 클로닝 부위를 도입하기 위한 QuikChange™ 돌연변이유발(올리고뉴클레오티드 BsiWI-1 및 BsiWI-2를 사용함)의 사용을 가능하게 하였다. 생성되는 플라스미드를 p1747로 명명하였다. 가변 영역의 3' 말단에 BstBI 부위를 도입하기 위하여, SalI 및 BstBI 부위를 갖는 5' 올리고뉴클레오티드 프라이머를 설계하였다. 이 프라이머를 pUC 역방향 프라이머와 함께 사용하여 p1747로부터 2.75 kb 단편을 증폭하였다. 이어서, 이 단편을 12B75 가변 영역 및 HindIII 부위 내의 천연 발생 SalI 부위 내로 다시 클로닝함으로써, 독특한 BstBI 부위를 도입하였다. p1750으로 표기되는 생성되는 중간체 벡터는 BsiWI 및 BstBI 말단을 갖는 가변 영역 단편을 수용할 수 있었다. 불변 영역이 12B75 유전자로부터 또한 유래된 중쇄 벡터의 버전을 제조하기 위하여, HindIII 부위의 하류에 EcoRI 부위를 갖도록 p1750 내의 BamHI-HindIII 삽입물을 pBR322에 이전하였다. 이어서, 생성되는 플라스미드 p1768을 HindIII 및 EcoRI로 분해하고, 큰 BamHI-BamHI 단편을 p1560으로부터 pBC 내로 클로닝함에 의해 유래된 서브클론인, p1744로부터의 5.7 kb HindIII-EcoRI 단편에 라이게이션하였다. 이어서, 생성되는 플라스미드 p1784를 BsiWI 및 BstBI 말단을 갖는 TNV Ab cDNA 단편에 대한 벡터로서 사용하였다. 추가의 작업을 실행하여 발현 벡터 p1788 및 p1798을 제조하였으며, 이는 12B75 유전자로부터의 IgG1 불변 영역을 포함하고 그들이 얼마나 많은 12B75 중쇄 J-C 인트론을 함유하는지에 의해 서로 상이하다.

[0277] 플라스미드 p1558 내의 12B75 경쇄 유전자를 변형하기 위하여, 12B75 프로모터 및 가변 영역을 함유하는 5.7 kb SalI/AflIII 단편을 p1558로부터 플라스미드 L28의 XhoI/AflIII 부위 내로 이전하였다. 이러한 새로운 플라스미드 p1745는 돌연변이유발 단계를 위한 더 작은 주형을 제공하였다. 올리고뉴클레오티드(C340salI 및 C340sal2)를 사용하여, QuikChange™ 돌연변이유발에 의해 가변 영역의 5' 말단에 독특한 SalI 제한 부위를 도입하였다. 생성되는 중간체 벡터 p1746은 가변 영역 단편이 클로닝될 수 있는 독특한 SalI 및 AflIII 제한 부위를 가졌다. P1746 내로 클로닝된 임의의 가변 영역 단편은 바람직하게는 경쇄 유전자의 3' 절반과 결합될 것이다. 이 목적을 위해 사용될 수 있는 12B75 경쇄 유전자의 3' 절반으로부터 제한 단편을 제조하기 위해, 올리고뉴클레오티드 BAHN-1 및 BAHN-2를 서로 어닐링하여, 제한 부위 BsiWI, AflIII, HindII, 및 NotI을 함유하고 KpnI 및 SacI 부위 내로 라이게이션될 수 있는 말단을 함유하는 이중-가닥 링커를 형성하였다. 이 링커를 pBC의 KpnI 부위와 SacI 부위 사이에 클로닝하여 플라스미드 p1757을 제공하였다. P1558을 AflIII로 분해한 후, HindIII으로 부분적으로 분해함으로써 생성된, 12B75 경쇄 불변 영역을 함유하는 7.1 kb 단편을 p1757의 AflIII 부위와 HindII 부위 사이에 클로닝하여 p1762를 수득하였다. 이러한 새로운 플라스미드는 BsiWI 및 AflIII에 대한 독특한 부위를 함유하였으며, 프로모터 및 가변 영역을 함유하는 BsiWI/AflIII 단편을 그 안으로 이전하여 유전자의 2 개의 절반을 통합할 수 있었다.

[0278] 발현 플라스미드의 cDNA 클로닝 및 조립. 모든 RT-PCR 반응물(상기 참조)을 클레노우 효소로 처리하여 DNA 말단을 추가로 채웠다. 중쇄 PCR 단편을 제한 효소 BsiWI 및 BstBI로 분해한 후, 플라스미드 L28의 BsiWI 부위와

BstBI 부위 사이에 클로닝하였다(12B75-기반 중간체 벡터 p1750이 아직 제조되지 않았기 때문에 L28을 사용함). 클로닝된 삽입물의 DNA 서열 분석은 생성되는 작제물이 정확하고 PCR 증폭 중에 도입된 오류가 없음을 나타냈다. 이들 L28 플라스미드 작제물(TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B, 및 TNV196에 대한)에 대해 배정된 식별 번호를 표 3에 나타낸다.

[0279] TNV14, TNV148, 및 TNV148B 중쇄에 대한 BsiWI/BstBI 삽입물을 L28 벡터로부터 새로 제조된 중간체 벡터 p1750로 이전하였다. 이들 중간체 플라스미드에 대해 배정된 식별 번호를 표 2에 나타낸다. TNV15 및 TNV196에 대해서는 이러한 클로닝 단계 및 후속 단계를 실행하지 않았다. 이어서, 가변 영역을 2 개의 상이한 인간 IgG1 발현 벡터 내로 이전하였다. 제한 효소 EcoRI 및 HindIII을 사용하여 가변 영역을 Centocor의 이전에 사용된 IgG1 벡터 p104로 이전하였다. Gm(f+) 동종이형의 IgG1을 암호화하는 생성되는 발현 플라스미드는 p1781(TNV14), p1782(TNV148), 및 p1783(TNV148B)로 표기된다(표 2 참조). 가변 영역을 또한 12B75(GenPharm) 유전자로부터 유래된 IgG1 불변 영역의 상류에 클로닝하였다. G1m(z) 동종이형의 IgG1을 암호화하는 그러한 발현 플라스미드가 또한 표 3에 열거되어 있다.

[0280] [표 3]

[0281] 다양한 중쇄 및 경쇄 플라스미드에 대한 플라스미드 식별 번호.

[0282] L28 벡터 또는 pBC 벡터는 초기 Ab cDNA 클론을 나타낸다. 그러한 플라스미드 내의 삽입물을 불완전한 12B75-기반 벡터에 이전하여 중간체 플라스미드를 제조하였다. 하나의 추가의 이전 단계는, 선형화된 후에 세포 내로 도입되거나 세포 형질주입 전에 mAb 유전자 삽입물을 정제하기 위해 사용된 최종 발현 플라스미드를 생성하였다. (ND) = 실행되지 않음.

Gm(f+)	G1m(z)			
128 벡터	중간체	발현	발현	
<u>Mab</u>	<u>플라스미드 ID</u>	<u>플라스미드 ID</u>	<u>플라스미드 ID</u>	<u>플라스미드 ID</u>
중쇄				
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 벡터	중간체	발현		
<u>플라스미드 ID</u>	<u>플라스미드 ID</u>	<u>플라스미드 ID</u>		
경쇄				
TNV14	p1748	p1755	p1775	
TNV15	p1748	p1755	p1775	
TNV148	p1749	p1756	p1776	
TNV196	p1749	p1756	p1776	

[0283]

[0284] 경쇄 PCR 산물을 제한 효소 SalI 및 SacII로 분해한 후, 플라스미드 pBC의 SalI 부위와 SacII 부위 사이에 클로닝하였다. 하나의 아미노산에 의해 상이한 2 개의 상이한 경쇄 버전을 p1748 및 p1749로 표기하였다(표 2). DNA 서열 분석에 의해 이들 작제물이 정확한 서열을 가졌음을 확인하였다. 이어서 p1748 및 p1749 내의 SalI/AflIII 단편을 중간체 벡터 p1746의 SalI 부위와 AflIII 부위 사이에 클로닝하여 각각 p1755 및 p1756을 제조하였다. 이어서, p1755 및 p1756으로부터의 BsiWI/AflIII 단편을 새롭게 제조된 작제물 p1762로 이전함으로써 경쇄 유전자의 이들 5' 절반을 유전자의 3' 절반에 결합시켜, 각각 최종 발현 플라스미드 p1775 및 p1776을 제조하였다(표 2).

[0285] 세포 형질주입, 스크리닝, 및 서브클로닝. 다양한 TNV 발현 플라스미드로 마우스 골수종 세포의 총 15 회의 형질주입을 수행하였다(결과 및 토의 섹션의 표 3 참조). 이들 형질주입은, (1) 숙주 세포가 Sp2/0이었는지, 또

는 653이었는지 여부; (2) 중쇄 불변 영역이 Centocor의 이전의 IgG1 벡터에 의해 암호화되었는지, 또는 12B75 중쇄 불변 영역에 의해 암호화되었는지; (3) mAb가 TNV148B, TNV148, TNV14, 또는 새로운 HC/LC 조합이었는지; (4) DNA가 선형화된 플라스미드였는지, 또는 정제된 Ab 유전자 삽입물이었는지 여부; 및 (5) 중쇄 유전자 내의 완전한 J-C 인트론 서열의 존재 또는 부재에 의해 구별되었다. 또한, 몇몇 형질주입을 반복하여 많은 수의 클론이 스크리닝될 수 있는 가능성을 증가시켰다.

[0286] 이전에 기재된 바와 같은 표준 조건 하에(문헌[Knight DM et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:1443-1453]) 전기천공에 의해 중쇄 및 경쇄 DNA(각각 8 내지 12 :g)의 혼합물로 Sp2/0 세포 및 653 세포를 각각 형질주입시켰다. 형질주입 번호 1, 2, 3, 및 16의 경우, 형질주입 전에 제한 효소를 이용하는 분해에 의해 적절한 발현 플라스미드를 선형화하였다. 예를 들어, SalI 및 NotI 제한 효소를 사용하여 TNV148B 중쇄 플라스미드 p1783 및 경쇄 플라스미드 p1776을 각각 선형화 하였다. 나머지 형질주입의 경우, BamHI로 중쇄 플라스미드를 분해하고 BsiWI 및 NotI로 경쇄 플라스미드를 분해함으로써, mAb 유전자만을 함유한 DNA 삽입물을 플라스미드 벡터로부터 분리하였다. 이어서, mAb 유전자 삽입물을 아가로스 겔 전기영동 및 Qiex 정제 수지에 의해 정제하였다. 정제된 유전자 삽입체로 형질주입된 세포를, 선택가능한 마커의 공급원으로서의 3 내지 5 :g의 PstI-선형화된 pSV2gpt 플라스미드(p13)로 동시에 형질주입시켰다. 전기천공에 이어서, 세포를 IMDM, 15% FBS, 2 mM 글루타민 중에 96-웰 조직 배양 접시 내에 접종하고, 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터 내에 인큐베이션하였다. 2 일 후에, 동일 부피의 IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민, 2 × MHX 선택(1 × MHX= 0.5 :g/ml 마이코페놀산, 2.5 :g/ml 하이포잔틴, 50 :g/ml 잔틴)을 첨가하고, 콜로니가 형성되는 동안 추가로 2 내지 3 주 동안 플레이트를 인큐베이션하였다.

[0287] 콜로니를 갖는 웰로부터 수집한 세포 상청액을 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 인간 IgG에 대해 검정하였다. 약술하면, 세포 상청액의 다양한 희석액을 다클론 염소 항-인간 IgG Fc 단편으로 코팅된 96-웰 EIA 플레이트 내에 인큐베이션한 후, 결합된 인간 IgG를 알칼라인 포스파타제-접합된 염소 항-인간 IgG(H+ L) 및 적절한 색 기질을 사용하여 검출하였다. 세포 상청액에서 측정되고 있는 동일한 정제된 mAb를 표준으로서 사용한 표준 곡선을 각각의 EIA 플레이트 상에 포함시켜 상청액 중의 인간 IgG의 정량화를 가능하게 하였다. 소모된 배양물에서의 추가의 생산 결정을 위해, 대부분의 인간 IgG를 생산하는 것으로 보이는 이들 콜로니 내의 세포를 24-웰 플레이트 내로 계대배양하고, 이어서 최고-생산 모 클론을 확인하였다.

[0288] 더 높은 생산 서브클론을 확인하고 더 균질한 세포주를 제조하기 위해 최고-생산 모 클론을 서브클로닝하였다. IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민, 1 × MHX 중의 1 세포/웰 또는 4 세포/웰로 96-웰 조직 배양 플레이트를 접종하고, 콜로니가 분명해질 때까지 12 내지 20 일 동안 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터 내에 인큐베이션하였다. 웰당 1 개의 콜로니를 함유하는 웰로부터 세포 상청액을 수집하고, 상기 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 분석하였다. 선택된 콜로니를 24-웰 플레이트에 계대배양하고, 배양물을 소모되게 한 후, 그들의 상청액 중의 인간 IgG 수준을 정량화함으로써 최고-생산 서브클론을 확인하였다. 선택된 제1 라운드 서브클론에 제2 라운드의 서브클로닝을 적용할 때 이 과정을 반복하였다. 최상의 제2 라운드 서브클론을 개발을 위한 세포주로서 선택하였다.

[0289] 세포 서브클론의 특성화. 최상의 제2 라운드 서브클론을 선택하고, 성장 곡선을 수행하여 mAb 생산 수준 및 세포 성장 특징을 평가하였다. 30 ml의 IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민, 및 1X MHX(또는 무혈청 배지) 중의 1 × 10⁵ 세포/ml로 T75 플라스크를 접종하였다. 300 μl의 분취물을 24 hr 간격으로 취하고, 생존 세포 밀도를 결정하였다. 생존 세포의 수가 1 × 10⁵ 세포/ml 미만이 될 때까지 분석을 계속하였다. 세포 상청액의 수집된 분취물을 존재하는 항체의 농도에 대해 검정하였다. 표준으로서 rTNV148B 또는 rTNV14 JG92399를 사용하여 ELISA 검정을 수행하였다. 다클론 염소 항-인간 IgG Fc로 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 1 시간 동안 샘플을 인큐베이션하고, 1:1000 희석에서 알칼라인 포스파타제-접합된 염소 항-인간 IgG(H+ L)로 결합된 mAb를 검출하였다.

[0290] 다양한 양의 MHX 선택의 존재 하에 성장 속도를 비교하는 목적으로 2 개의 세포주에 대해 상이한 성장 곡선 분석을 또한 실행하였다. MHX가 없는 배지(IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민) 내로 세포주 C466A 및 C466B를 해동시키고, 추가로 2 일 동안 배양하였다. 이어서, 둘 모두의 세포 배양물을 MHX 없음, 0.2X MHX, 또는 1X MHX(1X MHX = 0.5 :g/ml 마이코페놀산, 2.5 :g/ml 하이포잔틴, 50 :g/ml 잔틴) 중 어느 하나를 함유하는 3 개의 배양물로 분할하였다. 1 일 후에, 새로운 T75 플라스크를 1 × 10⁵ 세포/ml의 출발 밀도에서 배양물로 접종하고, 세포를 24 시간 간격으로 1 주 동안 계수하였다. mAb 생산에 대한 분취물은 수집하지 않았다. SOP PD32.025에 제공된 수확식을 사용하여 이들 샘플에 대해 배가 시간을 계산하였다.

- [0291] 추가의 연구를 수행하여 시간 경과에 따른 mAb 생산의 안정성을 평가하였다. MHX 선택이 있거나 없는 IMDM, 5% FBS, 2 mM 글루타민 중에 24 웰 플레이트 내에서 배양물을 성장시켰다. 배양물이 융합성이 되었을 때마다 배양물을 새로운 배양물로 분할한 후, 더 오래된 배양물을 소모되게 하였다. 이 시점에, 상청액의 분취량을 취하고 4℃에서 저장하였다. 55 내지 78 일의 기간에 걸쳐 분취량을 취하였다. 이 기간의 중점에, 상기 약화된 바와 같이 항-인간 IgG Fc ELISA에 의해 상청액을 존재하는 항체의 양에 대해 시험하였다.
- [0292] **결과 및 토의.**
- [0293] **제조합 수용체에 대한 TNF 결합의 억제**
- [0294] 하이브리도마 세포 상청액에 함유된 8 개의 TNV mAb가 수용체에 대한 TNF α 결합을 차단할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 단순 결합 검정을 수행하였다. 이들 각각의 세포 상청액 중의 TNV mAb의 농도를 인간 IgG에 대한 표준 ELISA 분석에 의해 먼저 결정하였다. 이어서, 제조합 p55 TNF 수용체/IgG 융합 단백질인 p55-sf2를 EIA 플레이트 상에 코팅하고, 다양한 양의 TNV mAb의 존재 하에 125 I-표지된 TNF α 를 p55 수용체에 결합시켰다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 8 개의 TNV mAb 중의 하나(TNV122)를 제외한 모두가 p55 수용체에 대한 TNF α 결합을 효율적으로 차단하였다. 실제로, TNV mAb는 음성 대조군 하이브리도마 상청액 내로 스카이킹된 cA2 양성 대조군 mAb보다 TNF α 결합을 억제함에 있어서 더 효과적인 것으로 보였다. 이들 결과는 TNV mAb가 세포-기반 검정 및 생체내에서 TNF α 생물활성을 차단할 가능성이 매우 높았음을 나타내는 것으로 해석되었으며, 따라서 추가의 분석이 타당해졌다.
- [0295] **DNA 서열 분석.**
- [0296] **RNA가 인간 mAb를 암호화한다는 것의 확인.**
- [0297] 수용체 결합 검정에서 TNF α -차단 활성을 나타낸 7 개의 TNV mAb(TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV148, 및 TNV196)를 특성화하는 제1 단계로서, 이들 mAb를 생산하는 7 개의 하이브리도마 세포주로부터 총 RNA를 단리하였다. 이어서, 각각의 RNA 샘플을 사용하여, 완전 신호 서열, 완전 가변 영역 서열, 및 각각의 mAb에 대한 불변 영역 서열의 일부를 포함한 인간 항체 중쇄 또는 경쇄 cDNA를 제조하였다. 이어서, 이들 cDNA 생성물을 PCR 반응에서 증폭하고, 단편을 먼저 클로닝하는 단계 없이, PCR-증폭된 DNA를 직접 서열분석하였다. 서열분석된 중쇄 cDNA는 마우스에 존재하는 5 개의 인간 생식세포계열 유전자 중의 하나인 DP-46과 90% 초과로 동일하였다(도 2). 유사하게, 서열분석된 경쇄 cDNA는 마우스에 존재하는 인간 생식세포계열 유전자 중의 하나와 100% 또는 98% 동일하였다(도 3). 이들 서열 결과에 의해, cDNA로 전사되고 서열분석된 RNA 분자가 인간 항체 중쇄 및 인간 항체 경쇄를 암호화하였음이 확인되었다. 가변 영역이 신호 서열 코딩 서열의 5' 말단에 맵핑되는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 PCR 증폭되었으므로, 신호 서열의 최초 몇개의 아미노산은 원래의 TNV 변역 생성물의 실제 서열이 아니고, 그들은 제조합 TNV mAb의 실제 서열을 나타낸다는 것에 유의해야 한다.
- [0298] **독특한 중쇄 mAb.**
- [0299] 각각의 mAb에 대한 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 전체 가변 영역에 대한 cDNA 서열의 분석에 의해, TNV32는 TNV15와 동일하고, TNV118은 TNV14와 동일하며, TNV86은 TNV148과 동일함이 밝혀졌다. 수용체 결합 검정의 결과는 DNA 서열 분석과 일치하였으며, 즉, TNV86 및 TNV148 둘 모두는 TNF 결합을 차단함에 있어서 TNV118 및 TNV14 둘 모두보다 대략 4 배 더 양호하였다. 그러므로, 후속 연구는 단지 4 개의 독특한 TNV mAb, TNV14, TNV15, TNV148, 및 TNV196에 집중하였다.
- [0300] **4 개의 mAb의 관련성**
- [0301] DNA 서열 결과에 의해, 4 개의 TNV mAb의 중쇄를 암호화하는 유전자가 모두 서로 고도로 상동성이며, 모두 동일한 생식세포계열 유전자, DP-46으로부터 유래된 것으로 보인다는 것이 밝혀졌다(도 2). 또한, 중쇄 CDR3 서열 각각이 그렇게 유사하고 동일한 길이므로, 그리고 그들이 모두 J6 엑손을 사용하므로, 그들은 단일 VDJ 유전자 재배열 사례에 이어서 각각의 mAb를 독특하게 만든 체세포 변화에 의해 발생한 것으로 보였다. DNA 서열 분석에 의해, 4 개의 mAb 사이에 단지 2 개의 별개의 경쇄 유전자가 존재함이 밝혀졌다(도 3). TNV14 및 TNV15의 경쇄 가변 영역 코딩 서열은 서로 동일하고 인간 카파 사슬의 Vg/38K 패밀리의 대표적인 생식세포계열 서열과 동일하다. TNV148 및 TNV196 경쇄 코딩 서열은 서로 동일하지만 2 개의 뉴클레오타이드 위치에서 생식세포계열 서열과 상이하다(도 3).
- [0302] 4 개의 mAb의 추정된 아미노산 서열에 의해 실제 mAb의 관련성이 밝혀졌다. 4 개의 mAb는 4 개의 별개의 중쇄를 함유하지만(도 4), 단지 2 개의 별개의 경쇄만을 함유한다(도 5). TNV mAb 서열과 생식세포계열 서열 사이

의 차이는 주로 CDR 도메인에 국한되었지만, mAb 중쇄 중 3 개는 또한 프레임워크 영역에서 생식세포계열 서열과 상이하였다(도 4). DP-46 생식세포계열-암호화 Ab 프레임워크 영역에 비교하여, TNV14는 동일하였으며, TNV15는 1 개의 아미노산에 의해 상이하였고, TNV148은 2 개의 아미노산에 의해 상이하였으며, TNV196은 3 개의 아미노산에 의해 상이하였다.

[0303] cDNA의 클로닝, 부위-특이적 돌연변이유발, 및 최종 발현 플라스미드의 조립. cDNA의 클로닝. PCR 증폭된 가변 영역의 DNA 서열에 기초하여, 발현 벡터 내로 클로닝될 코딩 서열을 적응시킬 목적으로 PCR 증폭의 다른 라운드를 수행하기 위해 새로운 올리고뉴클레오타이드를 주문하였다. 중쇄의 경우, 이러한 제2 라운드의 PCR의 생성물을 제한 효소 BsiWI 및 BstBI로 분해하고, 플라스미드 벡터 L28(표 2에 나타낸 플라스미드 식별 번호) 내로 클로닝하였다. 경쇄의 경우, 제2 라운드 PCR 생성물을 SalI 및 AflIII로 분해하고, 플라스미드 벡터 pBC 내로 클로닝하였다. 이어서, 개별 클론을 서열분석하여, 그들의 서열이 PCR 산물의 직접 서열분석으로부터 얻어진 이전의 서열과 동일하다는 것을 확인하였으며, 이에 의해 잠재적으로 불균질한 분자 집단에서 각각의 위치에 가장 풍부한 뉴클레오타이드가 밝혀졌다.

[0304] TNV148을 변화시키기 위한 부위-특이적 돌연변이유발. mAb TNV148 및 TNV196은 TNF α 생물활성을 증하시킴에 있어서 차선의 mAb(TNV14)보다 4 배 더 강력한 것으로 일관되게 관찰되었다. 그러나, 상기 기재된 바와 같이, TNV148 및 TNV196 중쇄 프레임워크 서열은 생식세포계열 프레임워크 서열과 상이하였다. TNV148 중쇄 서열과 다른 인간 항체의 비교는, 다수의 다른 인간 mAb가 프레임워크 1 내의 위치 28에서 Ile 잔기를 함유한 반면에(성숙한 서열만을 계수함), 프레임워크 3 내의 위치 75에서의 Pro 잔기는 그 위치에서 특이한 아미노산임을 나타냈다.

[0305] TNV196 중쇄의 유사한 비교는 프레임워크 3 내의 생식세포계열 서열과 상이한 3 개의 아미노산이 인간 mAb에서 회귀할 수 있음을 시사하였다. 인간에게 투여될 경우에 이들 차이는 TNV148 및 TNV196을 면역원성이 되게 할 수 있는 가능성이 있었다. TNV148은 단지 하나의 관심 아미노산 잔기를 가졌고, 이 잔기는 TNF α 결합에 중요하지 않은 것으로 여겨졌기 때문에, 위치 75에서 Pro 잔기 대신에 생식세포계열 Ser 잔기가 암호화되도록 부위-특이적 돌연변이유발 기술을 사용하여(플라스미드 p1753에서) TNV148 중쇄 코딩 서열 내의 단일 뉴클레오타이드를 변화시켰다. 생성되는 플라스미드를 p1760으로 명명하였다(표 2 참조). 생성되는 유전자 및 mAb를 TNV148B로 명명하여 그것을 원래의 TNV148 유전자 및 mAb와 구별하였다(도 5 참조).

[0306] 최종 발현 플라스미드의 조립. 계놈 단편으로서 이전에 클로닝된 12B75 중쇄 및 경쇄 유전자에 기초한 새로운 항체 발현 벡터를 제조하였다. 상이한 TNV 발현 플라스미드를 제조하였지만(표 2 참조), 각각의 경우에, 5' 측면 서열, 프로모터, 및 인트론 인핸서는 각각의 12B75 유전자로부터 유래되었다. 경쇄 발현 플라스미드의 경우, 완전 J-C 인트론, 불변 영역 코딩 서열, 및 3' 측면 서열 또한 12B75 경쇄 유전자로부터 유래되었다. 최종 생산 세포주(p1781 및 p1783, 하기 참조)를 생성한 중쇄 발현 플라스미드의 경우, 인간 IgG1 불변 영역 코딩 서열은 Centocor의 이전에 사용된 발현 벡터(p104)로부터 유래되었다. 중요하게는, 본 명세서에 보고된 최종 생산 세포주는 원래의 하이브리도마 유래 TNV mAb(G1m(z))와는 상이한 TNV mAb의 동종이형(Gm(f+))을 발현한다. 이는 GenPharm 마우스로부터 유래된 12B75 중쇄 유전자는 CH1 도메인의 C-말단에서 Arg 잔기를 암호화하는 반면에, Centocor의 IgG1 발현 벡터 p104는 그 위치에서 Lys 잔기를 암호화하기 때문이다. 다른 중쇄 발현 플라스미드(예를 들어 p1786 및 p1788)를 제조하였으며, 여기서 J-C 인트론, 완전 불변 영역 코딩 서열, 및 3' 측면 서열은 12B75 중쇄 유전자로부터 유래되었지만, 그러한 유전자로 형질주입된 세포주는 생산 세포주로서 선택되지 않았다. 최종 발현 플라스미드를 생성할 향후 PCR-증폭된 V 영역의 1-단계 클로닝을 가능하게 하도록 신중하게 벡터를 설계하였다.

[0307] PCR 증폭된 가변 영역 cDNA를 L28 또는 pBC 벡터로부터 중간-단계, 12B75-기반 벡터로 이전하였으며, 이는 프로모터 영역 및 J-C 인트론의 일부를 제공하였다(플라스미드 식별 번호에 대해서는 표 2 참조). 이어서, 항체 유전자의 5' 절반을 함유하는 제한 단편을 이들 중간-단계 벡터로부터 최종 발현 벡터로 이전하였으며, 이는 각각의 유전자의 3' 절반을 제공하여 최종 발현 플라스미드를 형성하였다(플라스미드 식별 번호에 대해서는 표 2 참조).

[0308] 세포 형질주입 및 서브클로닝. 발현 플라스미드를 제한 분해에 의해 선형화하거나, 각각의 플라스미드 내의 항체 유전자 삽입물을 플라스미드 골격으로부터 정제해내었다. Sp2/0 및 653 마우스 골수종 세포를 전기천공에 의해 중쇄 및 경쇄 DNA로 형질주입시켰다. 15 개의 상이한 형질주입을 실행하였으며, 이들 중 대부분은 Ab, Ab 유전자의 특이적 특성, 유전자가 선형화된 전체 플라스미드 상에 있는지, 또는 정제된 유전자 삽입물 상에 있는지 여부, 및 숙주 세포주에 의해 정의되는 바와 같이 독특하였다(표 4에 요약됨). 마이코페놀산에 대해 내성인

클론으로부터의 세포 상청액을 ELISA에 의해 인간 IgG의 존재에 대해 검정하고, 정제된 rTNV148B를 참조 표준 곡선으로서 사용하여 정량화하였다.

[0309] **최고-생산 rTNV148B 세포주**

[0310] rTNV148B 형질주입 2로부터의 최선-생산 653 모 세포주 중 10 개(소모된 24-웰 배양물 중에 5 내지 10 :g/ml를 생산함)를 서브클로닝하여 더 높은 생산 세포주에 대해 스크리닝하고 더 균질한 세포 집단을 제조하였다. 모 세포주 2.320, 2.320-17, 및 2.320-20의 서브클론 중 2 개는 소진된 24-웰 배양물 중에 대략 50 :g/ml를 생산하였으며, 이는 그들의 모 세포주에 비해 5 배 증가였다. 서브클로닝된 세포주 2.320-17 및 2.320-20의 서브클로닝의 제2 라운드가 이어졌다.

[0311] 각각의 mAb를 암호화하는 중쇄 및 경쇄 플라스미드의 식별 번호를 나타낸다. 정제된 mAb 유전자 삽입물을 이용하여 실행된 형질주입의 경우, 플라스미드 p13(pSV2gpt)를 gpt 선택가능한 마커의 공급원으로서 포함시켰다. 중쇄 불변 영역은 Remicade를 암호화하기 위해 사용된 동일한 인간 IgG1 발현 벡터('구')에 의해, 또는 12B75(GenPharm/Medarex) 중쇄 유전자 내에 함유된 불변 영역('신')에 의해 암호화되었다. H1/L2는 TNV14 중쇄 및 TNV148 경쇄로 구성된 "신규" mAb를 지칭한다. 플라스미드 p1783 및 p1801은 단지 그들의 중쇄 유전자가 얼마나 많은 J-C 인트론을 함유하는지에 의해 상이하다. 세포 클론에 대한 일반 명칭의 최초 숫자를 정의하는 형질주입 번호는 우측에 나타낸다. 본 명세서에 기재된 rTNV148B-생산 세포주 C466(A, B, C, D) 및 C467A는 각각 형질주입 번호 2 및 1로부터 유래되었다. rTNV14-생산 세포주 C476A는 형질주입 번호 3으로부터 유래되었다.

[0312] [표 4]

[0313] **세포 형질주입의 요약.**

플라스미드	HC	DNA			
형질주입 번호					
mAb	HC/LC/gpt	벡터	포맷	Sp2/0	653
rTNV148B	1783/1776	구	선형	1	2
rTNV14	1781/1775	구	선형	3	-
rTNV148B	1788/1776/13	신	삽입물	4,6	5,7
rTNV14	1786/1775/13	신	삽입물	8,10	9,11
rTNV148	1787/1776/13	신	삽입물	12	17
rH1/L2	1786/1776/13	신	삽입물	13	14
rTNV148B	1801/1776	구	선형	16	

[0314]

[0315] 소모된 24-웰 배양 상청액에 대한 ELISA 분석은 이들 제2 라운드 서브클론이 모두 98 내지 124 :g/ml를 생산하였음을 나타냈으며, 이는 제1 라운드 서브클론에 비해 2 배 이상의 증가였다. 표 5에 나타난 바와 같이 이들 653 세포주에 C 코드 표기를 배정하였다.

[0316] rTNV148B 형질주입 1로부터의 최선-생산 Sp2/0 모 세포주 중 3 개를 서브클로닝하였다. 모 세포주 1.73의 2 회 라운드의 서브클로닝은 소모된 24-웰 배양물 중에 25 :g/ml를 생산한 클론의 확인으로 이어졌다. 이러한 Sp2/0 세포주를 C467A로 표기하였다(표 5).

[0317] **최고-생산 rTNV14 세포주**

[0318] rTNV14 형질주입 3으로부터의 최선-생산 Sp2/0 모 세포주 중 3 개를 1 회 서브클로닝하였다. 서브클론 3.27-1은 19 :g/ml의 생산으로 소모된 24-웰 배양물에서 최고-생산자인 것으로 확인되었다. 이 세포주를 C476A로 표기하였다(표 5).

[0319] [표 5]

[0320] **선택된 생산 세포주 및 그들의 C 코드의 요약**

[0321] 원래의 클론 명칭의 최초 숫자는 어느 형질주입으로부터 세포주가 유래되었는지를 나타낸다. 본 명세서에 보고된 C-코드로 나타낸 모든 세포주는 제한 효소로 선형화된 중쇄 및 경쇄 전체 플라스미드를 이용하는 형질주입으

로부터 유래되었다.

원본		소모된 24-웰		
<u>mAb</u>	<u>클론 명칭</u>	<u>C 코드</u>	<u>숙주 세포</u>	<u>생산</u>
rTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103 :g/ml
2.320-20-111	C466B	653	102 :g/ml	
2.320-17-4	C466C	653	98 :g/ml	
2.320-20-99	C466D	653	124 :g/ml	
1.73-12-122	C467A	Sp2/0	25 :g/ml	
rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19 :g/ml

서브클로닝된 세포주의 특성화

세포주 성장 특징을 더 신중하게 특성화하고 더 큰 규모로 mAb-생산 수준을 결정하기 위하여, T75 배양물을 사용하여 성장 곡선 분석을 수행하였다. 결과는 4 개의 C466 시리즈의 세포주 각각이 1.0×10^6 내지 1.25×10^6 세포/ml의 피크 세포 밀도 및 110 내지 140 :g/ml의 최대 mAb 축적 수준에 도달하였음을 나타냈다(도 7). 반면에, 최선-생산 Sp2/0 서브클론, C467A는 2.0×10^6 세포/ml의 피크 세포 밀도 및 25 :g/ml의 최대 mAb 축적 수준에 도달하였다(도 7). rTNV14-생산 세포주, C476A에 대해서는 성장 곡선 분석을 실행하지 않았다.

추가적 성장 곡선 분석을 실행하여 상이한 농도의 MHX 선택에서의 성장 속도를 비교하였다. 이러한 비교는, MHX의 부재 하에 배양된 C466 세포가 정상 양의 MHX(1X) 중에 배양된 동일한 세포보다 더 빠르게 성장하는 것으로 보였다는 최근의 관찰에 의해 촉구되었다. 마이코페놀산과 같은 화합물의 세포독성 농도는 여러 자릿수에 걸쳐 측정되는 경향이 있으므로, 낮은 농도의 MHX의 사용은 mAb 생산의 안정성을 희생시키지 않으면서 유의하게 더 빠른 세포 배가 시간을 유발할 수 있는 것으로 생각되었다. 세포주 C466A 및 C466B를 MHX 없음, 0.2X MHX, 또는 1X MHX 중 어느 하나 중에 배양하였다. 생존 세포 계수를 7 일 동안 24 시간 간격으로 취하였다. 결과에 의해 MHX 농도-의존적 세포 성장 속도가 밝혀졌다(도 8). 세포주 C466A는 1X MHX에서 25.0 시간의 배가 시간을 나타냈지만 MHX 없음에서는 단지 20.7 시간이었다. 유사하게, 세포주 C466B는 1X MHX에서 32.4 시간의 배가 시간을 나타냈지만 MHX 없음에서는 단지 22.9 시간이었다. 중요하게는, 0.2X MHX에서 둘 모두의 세포주에 대한 배가 시간은 1X MHX에서보다 MHX 없음에서 관찰된 것과 더 유사하였다(도 8). 이러한 관찰은, 배가 시간이 중요한 파라미터인 생물반응기에서의 향상된 세포 성능이 더 적은 MHX를 사용함으로써 실현될 수 있을 것이라는 가능성을 제기한다. 그러나, 안정성 시험 결과(하기 참조)는 세포주 C466D가 MHX가 존재하지 않는 경우에도 60 일 이상 동안 rTNV148B를 안정하게 생산할 수 있음을 시사하지만, 안정성 시험은 또한 MHX의 부재에 비교하여 MHX의 존재 하에 세포가 배양되었을 때 더 높은 mAb 생산 수준을 나타냈다.

대략 60 일의 기간에 걸쳐 다양한 세포주로부터 mAb 생산을 평가하기 위하여, MHX 선택을 함유하거나 함유하지 않은 배양물에 대해 안정성 시험을 수행하였다. 모든 세포주가 높은 mAb 생산을 유지하지는 않았다. 단지 2 주의 배양 후에, 클론 C466A는 연구 시작점에서도보다 대략 45% 더 적게 생산하고 있었다. 클론 C466B로부터의 생산 또한 유의하게 하락하는 것으로 보였다. 그러나, 클론 C466C 및 C466D는 상당히 안정한 생산을 유지하였으며, C466D는 최고 절대 생산 수준을 나타낸다(도 9).

결론

인간 TNF α 에 대한 8 개의 인간 mAb의 초기 패널로부터, 단백질 서열 및 TNF 중화 효능을 포함한 몇몇 기준에 기초하여, TNV148B와 더불어 TNV14가 바람직한 것으로 선택되었다. 100 :g/ml 초과인 rTNV148B 및 19 :g/ml의 rTNV14를 생산하는 세포주를 제조하였다.

실시예 5: 단일 볼루스 주사를 사용하는 항-TNF 항체 및 대조군을 사용하는 관절염 마우스 연구

대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 9 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 둘베코

PBS(D-PBS) 또는 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 본 발명의 항-TNF 항체(TNV14, TNV148, 또는 TNV196)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다.

[0331] 결과: 체중이 투여 전으로부터의 변화로서 분석되었을 때, 10 mg/kg cA2로 치료한 동물은 연구 전체에 걸쳐 D-PBS-치료 동물보다 일관되게 더 높은 체중 증가를 나타냈다. 이러한 체중 증가는 제3주 내지 제7주에 유의하였다. 10 mg/kg TNV148로 치료한 동물은 또한 연구의 제7주에 유의한 체중 증가를 달성하였다. (도 10을 참조한다).

[0332] 도 11a 내지 도 11c는 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 10 mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 더 낮았으며, 이는 제3주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제7주). 1 mg/kg TNV14로 치료한 동물 및 1 mg/kg cA2로 치료한 동물은, D-PBS-치료군에 비교할 때, 제3주 후에 AI의 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 10 mg/kg 치료군들 사이에는, 각각을 유사한 용량의 다른 것들에 비교했을 때 (10 mg/kg cA2를 10 mg/kg TNV14, 148, 및 196에 비교함) 유의한 차이가 없었다. 1 mg/kg 치료군을 비교했을 때, 1 mg/kg TNV148은 3 주, 4 주, 및 7 주에 1 mg/kg cA2보다 유의하게 더 낮은 AI를 나타냈다. 1 mg/kg TNV148은 또한 3 주 및 4 주에 1 mg/kg TNV14-치료군보다 유의하게 더 낮았다. TNV196은 연구의 제6주까지 AI의 유의한 감소를 나타냈지만(D-PBS-치료군에 비교할 때), 연구 종료 시에 유의하게 유지된 유일한 1 mg/kg 치료는 TNV148이었다.

[0333] 실시예 6: 다중 볼루스 용량으로서 항-TNF 항체 및 대조군을 사용하는 관절염 마우스 연구

[0334] 대략 4 주령에, 체중에 기초하여, 8 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 대조 물품(D-PBS) 또는 3 mg/kg의 항체(TNV14, TNV148)의 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다(제0주). 제1주, 제2주, 제3주, 및 제4주에 모든 동물에서 주사를 반복하였다. 시험 물품 효능에 대해 군 1 내지 군 6을 평가하였다. 군 7 및 군 8의 동물로부터 얻은 혈청 샘플을 제2주, 제3주, 및 제4주에 TNV14 또는 TNV148의 면역 반응 유도 및 약동학적 제거에 대해 평가하였다.

[0335] 결과: 체중이 투여 전으로부터의 변화로서 분석되었을 때, 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 10 mg/kg cA2로 치료한 동물은 연구 전체에 걸쳐 D-PBS-치료 동물보다 일관되게 더 높은 체중 증가를 나타냈다. (도 12를 참조한다).

[0336] 도 13a 내지 도 13c는 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 10 mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 유의하게 더 낮았으며, 이는 제2주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제5주). 1 mg/kg 또는 3 mg/kg의 cA2로 치료한 동물 및 3 mg/kg TNV14로 치료한 동물은, d-PBS 대조군에 비교할 때, 연구 전체에 걸쳐 임의의 시점에 AI의 임의의 유의한 감소를 달성하지 못하였다. 3 mg/kg TNV148로 치료한 동물은 d-PBS-치료군에 비교할 때 유의한 감소를 나타냈으며, 이는 제3주에 시작하여 제5주까지 계속되었다. 10 mg/kg cA2-치료 동물은 연구의 제4주 및 제5주에 cA2의 더 낮은 용량(1 mg/kg 및 3 mg/kg) 둘 모두에 비교할 때 AI의 유의한 감소를 나타냈으며, 또한 제3주 내지 제5주에 TNV14-치료 동물보다 유의하게 더 낮았다. 3 mg/kg 치료군 중 임의의 것 사이에는 유의한 차이가 없는 것으로 보였지만, 3 mg/kg TNV14로 치료한 동물에 대한 AI는 일부 시점에 10 mg/kg 보다 유의하게 더 높았던 반면에, TNV148로 치료한 동물은 10 mg/kg의 cA2로 치료한 동물과 유의하게 상이하지 않았다.

[0337] 실시예 7: 단일 복강내 볼루스 용량으로서 항-TNF 항체 및 대조군을 사용하는 관절염 마우스 연구

[0338] 대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 6 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 3 mg/kg 또는 5 mg/kg으로 항체(cA2, 또는 TNV148)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다. 이 연구는 D-PBS 및 10 mg/kg cA2 대조군을 이용하였다.

[0339] 체중이 투여 전으로부터의 변화로서 분석되었을 때, 모든 치료는 유사한 체중 증가를 달성하였다. 3 또는 5 mg/kg의 TNV148 또는 5 mg/kg의 cA2로 치료한 동물은 연구 초기(제2주 및 제3주)에 유의한 양의 체중이 증가했다. TNV148로 치료한 동물만이 이후의 시점에 유의한 체중 증가를 유지했다. 3 및 5 mg/kg TNV148-치료 동물 둘 모두는 7 주에 유의성을 나타냈고, 3 mg/kg TNV148 동물은 주사 후 8 주에 여전히 유의하게 상승하였다. (도 14를 참조한다).

[0340] 도 15는 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 모든 치료군은 초기 시점에 일부 보호를 나타냈으며, 5 mg/kg cA2 및 5 mg/kg TNV148은 제1주 내지 제3주에 AI의 유의한 감소를 나타냈고 모든 치료군이 제2주에 유의한 감소를 나타냈다. 연구 후반에, 5 mg/kg cA2로 치료한 동물은 제4주, 제6주, 및 제7주에 유의한 감소를 갖는 일부 보호를 나타냈다. cA2 및 TNV148 둘 모두의 낮은 용량(3 mg/kg)은 제6주에 유의한 감소를 나

타냈으며, 모든 치료군이 제7주에 유의한 감소를 나타냈다. 치료군 중 어느 것도 연구 종료 시에 유의한 감소를 유지할 수 없었다(제8주). 임의의 치료군(식염수 대조군을 배제함) 사이에는 임의의 시점에 유의한 차이가 없었다.

[0341] 실시예 8: 항-TNF 항체 및 변형된 항-TNF 항체 사이의 단일 복강내 볼루스 용량으로서 항-TNF 항체 및 대조군을 사용하는 관절염 마우스 연구

[0342] TNV148(하이브리도마 세포로부터 유래됨) 및 rTNV148B(형질주입된 세포로부터 유래됨)의 단일 복강내 용량의 효능을 비교하기 위한 것이다. 대략 4 주령에, 성별 및 체중에 기초하여, 9 개의 치료군 중 하나에 Tg197 연구 마우스를 배정하고, 둘베코=S PBS(D-PBS) 또는 1 mg/kg의 항체(TNV148, rTNV148B)의 단일 복강내 볼루스 용량으로 치료하였다.

[0343] 체중이 투여 전으로부터의 변화로서 분석되었을 때, 10 mg/kg cA2로 치료한 동물은 연구 전체에 걸쳐 D-PBS-치료 동물보다 일관되게 더 높은 체중 증가를 나타냈다. 이러한 체중 증가는 제1주 및 제3주 내지 제8주에 유의하였다. 1 mg/kg TNV148로 치료한 동물은 또한 연구의 제5주, 제6주, 및 제8주에 유의한 체중 증가를 달성하였다. (도 16을 참조한다).

[0344] 도 17은 관절염 지수에 기초한 질환 중증도의 진행을 나타낸다. 10 mg/kg cA2-치료군의 관절염 지수는 D-PBS 대조군보다 더 낮았으며, 이는 제4주에 시작하여 연구의 나머지 전체에 걸쳐 계속되었다(제8주). TNV148-치료군 및 1 mg/kg cA2-치료군 둘 모두는 제4주에 AI의 유의한 감소를 나타냈다. 이전의 연구(P-099-017)는 TNV148이 단일 1 mg/kg 복강내 볼루스 후에 관절염 지수를 감소시키는 데 약간 더 효과적이었음을 나타냈지만, 본 연구는 TNV 항체-치료군의 둘 모두의 버전으로부터의 AI가 약간 더 높았음을 나타냈다. 1 mg/kg cA2-치료군은 10 mg/kg cA2 군에 비교할 때 유의하게 증가되지 않았고 TNV148-치료군은 제7주 및 제8주에 유의하게 더 높았지만(제6주는 제외함), 연구 중 임의의 시점에 1 mg/kg cA2, 1 mg/kg TNV148, 및 1 mg/kg TNV148B 사이에는 AI의 유의한 차이가 없었다.

[0345] 실시예 9: 강직성 척추염의 치료 또는 예방을 위한 항-TNF 항체

[0346] 개요

[0347] 활성 강직성 척추염을 갖는 대상에서 정맥내 투여된 항-TNF α 단클론 항체, 골리무맙의 다기관 무작위 이중-맹검 위약-대조 시험

[0348] SIMPONI®(골리무맙)는 면역글로불린 G 1(IgG1) 중쇄 동종형(G1m[z] 동종이형) 및 카파 경쇄 동종형을 갖는 전체 인간 단클론 항체이다. 골리무맙은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는다. 골리무맙의 분자량은 149,802 내지 151,064 달톤의 범위이다. 골리무맙은 높은 친화도 및 특이성으로 인간 종양 괴사 인자 알파(TNF α)에 결합하고, TNF α 생물활성을 중화시킨다.

[0349] 목적 및 가설

[0350] 1차 목적

[0351] 본 연구의 1차 목적은 AS의 징후 및 증상의 감소를 평가함으로써 활성 강직성 척추염(AS)을 갖는 대상에서 골리무맙 2 mg/kg의 IV 투여의 효능을 평가하는 것이다.

[0352] 2차 목적

[0353] 2 차 목적은 골리무맙에 대해 하기를 평가하는 것이다:

[0354] ● 신체 기능, 운동의 범위, 건강 관련 삶의 질, 및 다른 건강 결과의 개선에 관련된 효능

[0355] ● 안전성

[0356] ● 약동학(PK), 약력학(PD), 및 면역원성

[0357] 가설

[0358] 연구의 1차 목적을 다루기 위해, 통계적 가설(대안적인 가설)은 1차 효능 종점에 기초하여 활성 AS를 갖는 대상의 징후 및 증상을 감소시키에 있어서 IV 골리무맙 2 mg/kg이 위약보다 통계적으로 우월하다는 것이다.

[0359] 본 연구의 1차 종점은 제16주에 강직성 척추염 평가(ASAS) 국제 작업 그룹 기준(ASAS20으로 칭함)의 기준선으로

부터의 20% 개선을 달성하는 대상의 비율이다. 이 중점은 그것이 규제 기관 및 임상 AS 커뮤니티에 의해 잘 받아들여지기 때문에 선택되었다.

[0360] 연구 설계의 개요

[0361] 이는 NSAID에 대한 부적절한 반응 또는 불내성을 갖는 활성 AS를 갖는 대상에서 위약과 비교한 IV 콜리무맙의 효능 및 안전성의 3 상 다기관 무작위 이중-맹검 위약-대조 연구이다. 대략 200 명의 대상을 대략 40 개의 조사 현장에서 무작위 배정할 것이다. 모든 대상은 제0주, 제4주에, 그리고 그 후로는 제52주까지 매 8 주마다 (q8w) 콜리무맙 2 mg/kg 또는 위약 IV 주입을 받도록 무작위로 배정될 것이다. 제16주에, 위약 주입을 받는 모든 대상이 전환되고 콜리무맙 IV 주입을 받기 시작할 것이다.

[0362] 콜리무맙 IV 치료군 내의 대상은 콜리무맙 IV 주입을 계속 받을 것이다. 데이터베이스 잠금은 제28주 및 제60주에 대해 예정되어 있다. 마지막 연구 치료 투여 후 8 주 이상 유해 사례(AE) 및 심각한 유해 사례(SAE)에 대해 대상을 추적할 것이다. 연구 종료는 마지막 대상이 제60주 방문을 완료하는 시간으로서 정의된다.

[0363] 대상 집단

[0364] 연구에 적격성인 대상은, 수정된 뉴욕 기준에 의해 "명확함" 으로 정의된 3 개월 이상 동안의 AS의 진단, 및 각각 0 내지 10 cm의 척도 상에서 4 이상의 베스 강직성 척추염 질환 활성 지수(BASDAI) 및 4 이상의 총 요통에 대한 시각 상사 척도(VAS)에 의해 입증되는 바와 같은 활성 질환의 증상을 갖는 18 세 이상의 남성 또는 여성일 것이다. 대상은 0.3 mg/dL 이상의 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 가질 필요가 있다.

[0365] 연구 집단의 다른 주요 특징은 하기와 같다:

[0366] ● 메토틱렉세이트(MTX), 설파살라진(SSZ), 및 하이드록시클로로퀸(HCQ) 및 저용량 경구 코르티코스테로이드의 현재 사용자는 허용되며, 이들 약물의 안전한 용량 상에서 연구에 진입해야 한다.

[0367] ● 하나 이하의 생물학적 항-TNF α 제제(콜리무맙 이외의)에 이전에 노출된 대상은 연구에 포함되도록 허용되지만, 연구 집단의 최대 20%로 제한될 것이다.

[0368] ● 측면 척추 방사선사진 상에서 가시화되는 경추 및 요추의 모든 추간 수준(intervertebral level)에 존재하는 가교 인대골극(bridging syndesmophyte)에 의해 정의되는, 척추의 완전 강직을 갖는 대상은 연구에 포함되도록 허용되지만, 연구 집단의 최대 10% 로 제한될 것이다.

[0369] 적격성 대상에 대한 스크리닝은 연구 제제의 투여 전 6 주 이내에 수행될 것이다.

[0370] 대상은 또한 포함 및 배제 기준을 충족시켜야 한다.

[0371] 투여량 및 투여

[0372] 초기 스크리닝 방문시에, 연구에서의 등록을 위해, 프로토콜-특정된 포함 및 배제 기준에 따라, 연구에 잠재적으로 적격성인 것으로 간주되는 모든 대상으로부터 고지에 입각한 동의서가 얻어질 것이다. 무작위 배정 방문시에, 대상은 재평가될 것이고, 모든 특정 포함 및 배제 기준이 충족된다면, 대상은 콜리무맙 IV 주입 또는 위약 IV 주입을 받도록 무작위 배정될 것이다. 무작위 배정은 지리적 영역 및 항-TNF α 요법의 이전의 사용에 의해 계층화될 것이다.

[0373] 최초 연구 주입 전에, 대상은 하기 2 개의 치료군 중 1 개에 1:1 비로 무작위로 배정될 것이다:

[0374] 군 1(n= 100): 대상은 제0주, 제4주, 및 제12주에 IV 위약 주입을 받을 것이다. 대상은 제16주에 IV 콜리무맙 2 mg/kg으로 전환되고, 제16주, 제20주에, 그리고 그 후로는 q8w로 투여를 받을 것이다.

[0375] 군 2(n= 100): 대상은 제0주, 제4주에, 그리고 그 후로는 q8w로 2 mg/kg의 IV 콜리무맙을 받을 것이다. 맹검을 유지하기 위해 대상은 제16주에 IV 위약 주입을 받을 것이다.

[0376] 모든 주입은 30 $\pm$ 10 분에 걸쳐 완료될 것이다.

[0377] 효능 평가/중점

[0378] 본 연구를 위해 선택된 효능 평가는 AS의 치료를 위한 치료적 생물학적 제제의 이전의 시험에서 확립되었다. 본 연구를 위해 선택된 환자 보고 결과(PRO)는 AS에서의 다른 연구 및 적용가능한 US/EU 규제 지침 문서에 대해

의료 문헌에서 받아들여지는 임상적으로 관련된 측정과 일치한다.

[0379] **강직성 척추염 반응 평가는 하기를 포함한다:**

[0380]  배스 강직성 척추염 기능 지수(BASFI)

[0381]  환자의 전반적 평가

[0382]  총 요통

[0383]  배스 강직성 척추염 질환 활성 지수(BASDAI)

[0384]  36-항목 단축 양식 건강 조사(SF-36)

[0385]  배스 강직성 척추염 계측 지수(BASMI)

[0386]  강직성 척추염 삶의 질(ASQoL) 설문

[0387]  흉부 팽창

[0388]  야간 요통(Night Back Pain)

[0389]  골부착부염 지수

[0390]  의료 결과 연구 수면 척도(Medical Outcomes Study Sleep scale)

[0391]  작업 제약 설문(WLQ)

[0392]  생산성 시각 상사 척도

[0393]  EuroQol-5D(EQ-5D) 설문

[0394] **1차 종점**

[0395] 본 연구의 1차 종점은 제16주에서의 ASAS 20 반응자의 비율이다. 제16주에 ASAS 20을 갖는 대상의 비율이 위약군과 비교하여 골리무맙군에서 통계적으로 유의하게 더 큰 것으로 입증된다면, 연구는 양성으로 간주될 것이다.

[0396] **주요 2차 종점**

[0397] 하기 주요 이차 분석을 수행할 것이다. 종점은 하기 특정된 바와 같은 중요도 순서로 열거되어 있다:

[0398] 1. 제16주에 ASAS 40을 달성하는 대상의 비율.

[0399] 2. 제16주에 BASDAI의 기준선으로부터 50% 이상의 개선을 달성하는 대상의 비율.

[0400] 3. 제16주에 BASFI의 기준선으로부터의 변화.

[0401] **약동학적 평가**

[0402] AS를 갖는 성인 대상에서 IV 골리무맙의 PK를 평가하기 위해, 선택된 방문시에 혈액 샘플을 수집할 것이다. 연구 제제가 그 방문시에 투여되는 경우, 약동학적 샘플은 IV 주입 라인과는 상이한 팔로부터 채취해야 한다. 구체적으로, 제0주, 제4주, 제12주, 제20주, 제36주, 및 제52주 방문시에, 혈청 골리무맙 농도에 대한 2 개의 샘플을 수집할 것이다: 1 개의 샘플은 주입 직전에 수집할 것이고, 다른 샘플은 주입의 종료 후 1 시간에 수집할 것이다. 나머지 방문들 각각에 대해, 혈청 골리무맙 농도에 대해서는 1 개의 샘플만을 수집할 것이다. 연구 제제의 주입이 그 방문시에 투여되는 경우, 이러한 샘플은 주입 전에 수집되어야 한다. 집단 PK 분석을 위해, 제12주, 제16주, 또는 제20주 방문 시점 이외에 제12주 내지 제20주 방문시에 무작위 PK 샘플을 또한 채취할 것이며; 이러한 샘플은 연구 제제 주입으로부터 24 시간 이상 전 또는 후에 수집되어야 한다. 적용가능한 시점에, 골리무맙 농도 및 골리무맙에 대한 항체 둘 모두의 측정을 위한 혈청이 동일한 채혈로부터 유래될 것이다.

- [0403] **면역원성 평가**
- [0404] AS를 갖는 성인 대상에서 콜리무맙의 면역원성을 평가하기 위하여, 콜리무맙에 대한 항체의 검출을 위한 혈청 샘플을 일정표(Time and Events Schedule)에 따라 수집할 것이다.
- [0405] **바이오마커 평가**
- [0406] 임상 결과에서 개인간 가변성의 분자적 이해를 얻기 위해 바이오마커 샘플을 수집할 것이며, 이는 약물에 대해 상이하게 반응하는 집단 하위군을 확인하는 데 도움을 줄 수 있다. 바이오마커 샘플은 또한, 부각되는 문제점을 다루는 데 도움을 주고, 향후에 더 안전하고, 더 효과적이고, 궁극적으로 개별화된 요법의 개발을 가능하게 하기 위해 사용할 수 있다.
- [0407] **약물유전체학(DNA) 평가**
- [0408] 질환 또는 약물에 대한 반응에 대한 특이적 유전자의 연결을 검색하기 위해 게놈 시험을 실행할 것이다. 콜리무맙에 관련된 DNA 연구 또는 이 약물이 개발된 질환에 관련된 DNA 연구만 수행될 것이다. 본 연구에서는 동의한 대상에서 전게놈 약물유전체학 및/또는 후생유전학 시험을 수행할 것이다. 이러한 연구의 부분에 참여하는 대상은 별도의 고지에 입각한 동의서에 서명해야 한다. 추가로, 대상은 그들이 연구의 다른 양상에 참여하는 것, 또는 그들이 향후 연구에 참여하는 것에 영향을 받지 않으면서 언제든지 그러한 동의를 철회할 수 있다.
- [0409] 필요한 경우(현지 규정이 허용하는 경우), 약물유전체학 연구를 가능하게 하기 위해 약물유전체학 혈액 샘플을 수집할 것이다. 약물유전체학적 연구에서의 대상 참여는 임의적이다.
- [0410] **안전성 평가**
- [0411] 다른 항-TNF α 제제의 안전성 프로파일과 더불어 현재까지의 콜리무맙 안전성 데이터에 기초하여, 몇몇 관심 AE가 확인되었고 본 연구에서 모니터링되고 평가될 것이다. 이들은 주입 반응, 간담도 실험실 이상, TB를 포함하는 감염, 및 악성종양을 포함한다.
- [0412] **통계적 방법**
- [0413] 대부분의 데이터를 요약하기 위해 단순 서술형 요약 통계(Simple descriptive summary statistics), 예컨대 연속 변수에 대한 n, 평균, SD, 중앙값, IQ 범위, 최소, 및 최대, 및 이산 변수에 대한 계수 및 백분율을 사용할 것이다.
- [0414] 항-TNF α 요법의 이전의 사용에 의해 계층화된 코크란-멘텔-헨젤(CMH) 검정을 사용하여 치료에 반응하는 대상의 비율과 같은 카테고리 변수를 비교할 것이다. 달리 언급되지 않는 한, 일반적으로, 연속 변수를 분석하기 위해 인자로서 항-TNF α 요법의 이전의 사용을 갖는 ANOVA가 사용될 것이다. 모든 통계적 시험은 $\alpha = 0.05$ (양측)에서 수행될 것이다. 통계적 분석에 더하여, 데이터를 요약/제시하기 위해 도해적 데이터 디스플레이(예를 들어, 라인 플롯) 및 대상 목록이 또한 사용될 수 있다.
- [0415] **집단 세트**
- [0416] 집단 세트는 처리 의향(intent-to-treat)집단(즉, 모든 무작위 배정된 대상)일 것이다. 효능 분석에 포함된 대상은 그들이 배정된 치료를 받는지 여부에 무관하게 그들의 배정된 치료군에 따라 요약될 것이다.
- [0417] 안전성 및 PK 분석은 연구 치료 중 하나 이상의 투여를 받은 모든 대상을 포함할 것이다.
- [0418] **중점 분석**
- [0419] **1차 중점 분석**
- [0420] 1 차 목적을 다루기 위하여, 0.05의 유의성 수준(양측)에서 항-TNF α 요법의 이전의 사용(예/아니오)에 의해 계층화된 CMH 시험을 사용하여, 제16주에 ASAS 20 반응을 갖는 대상의 비율(1차 중점)을 위약군과 콜리무맙군 사이에서 비교할 것이다. 이러한 1 차 효능 분석에서, 모든 무작위 배정된 대상으로부터의 데이터는 그들이 받은 실제 치료에 무관하게 그들의 배정된 치료군에 따라 분석될 것이다. 대상이 제16주에 1 개 이상의 ASAS 성분에 대한 데이터를 갖는 경우, 정방향으로 실행된 최종 관찰(LOCF) 절차를 사용하여 누락된 ASAS 성분을 귀속시킬 것이다. 대상이 제16주에 모든 ASAS 성분에 대한 데이터를 갖지 않는 경우, 대상은 무반응자로 간주될 것이다.
- [0421] **주요 2차 중점 분석**

- [0422] 하기 주요 2차 분석을 하기 특정된 바와 같은 중요도 순서로 수행할 것이다:
- [0423] 1. 제16주에 ASAS 40을 달성하는 대상의 비율을 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0424] 2. 제16주에 BASDAI의 기준선으로부터 50% 이상의 개선을 달성하는 대상의 비율을 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0425] 3. 제16주에 BASFI의 기준선으로부터의 변화를 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0426] 다중성에 대한 유형 I 오차율을 제어하기 위해, 1차 종점이 0.05 수준의 유의성(양측)에서 통계적 유의성을 달성한 경우에만 최초 주요 2차 종점을 시험할 것이다. 1차 종점 및 이전의 주요 2차 종점(들)이 0.05 수준의 유의성(양측)에서 통계적으로 유의한 경우에만 후속 주요 2차 종점을 시험할 것이다.
- [0427] **안전성 분석 개요**
- [0428] 일상적인 안전성 평가를 수행할 것이다. 주입 반응 및 TB를 포함하는 감염을 포함하는 AE, SAE, 및 합리적으로 관련된 AE의 발생 및 유형이 치료군에 의해 요약될 것이다. NCI CTCAE 독성 등급에 기초한 비정상적인 실험실 파라미터(혈액학 및 화학)를 갖는 대상의 수가 요약될 것이다. 또한, ANA 및 항-dsDNA 항체를 갖는 대상의 수 및 골리무맙에 대한 항체와 주입 반응의 관계가 요약될 것이다.
- [0429] 1 회 이상의 연구 제제의 투여를 받은 모든 대상의 집단을 사용하여 모든 안전성 분석을 수행할 것이다. 대상이 실제로 받은 치료를 사용하여 분석을 수행할 것이다.
- [0430] 또한, 데이터를 요약/제시하기 위해 도해적 데이터 디스플레이(예를 들어, 라인 플롯) 및 대상 목록이 또한 사용될 수 있다.
- [0431] **약어**
- [0432] AE 유해 사례
- [0433] AS 강직성 척추염
- [0434] ASAS 20 강직성 척추염에서의 평가 20
- [0435] ASQoL 강직성 척추염 삶의 질
- [0436] ASSERT 재조합 인플릭시맙 요법의 평가를 위한 강직성 척추염 연구
- [0437] BASDAI 배스 강직성 척추염 질환 활성 지수
- [0438] BASFI 배스 강직성 척추염 기능 지수
- [0439] BASMI 배스 강직성 척추염 계측 지수
- [0440] BCG 바실러스 칼메트-구에린(Bacille Calmette-Guérin)
- [0441] CHF 울혈성 심부전
- [0442] CMH 코크란-멘텔-헨젤
- [0443] CRP c-반응성 단백질
- [0444] DAS 질환 활성 점수
- [0445] DBL 데이터 베이스 잠금
- [0446] DMARD 질환 변형 항류마티스 약물
- [0447] DMC 데이터 모니터링 위원회
- [0448] DNA 데옥시리보핵산
- [0449] ECG 심전도
- [0450] eCRF 전자 증례 기록지
- [0451] eDC 전자 데이터 캡처

[0452]	EQ-5D EuroQol-5D
[0453]	EQ-VAS EQ 시각 상사 척도
[0454]	EU 유럽 연합
[0455]	GCP 임상 시험 관리 기준
[0456]	HBV B 형 간염 바이러스
[0457]	HCQ 하이드록시클로로퀸
[0458]	HCV C 형 간염 바이러스
[0459]	HIV 인간 면역결핍 바이러스
[0460]	HRQOL 건강 관련 삶의 질
[0461]	IB 연구자 자료집
[0462]	ICF 고지에 입각한 동의서 양식
[0463]	ICH 국제 조화 회의
[0464]	IEC 독립적인 윤리 위원회
[0465]	IgG 1 면역글로불린 G 1
[0466]	IJA 독립적인 근거력 평가자
[0467]	IRB 기관 심의 위원회
[0468]	IV 정맥내
[0469]	IWRS 양방향 웹 응답 시스템
[0470]	MCS 정신요소 개요
[0471]	MOS-SS 의료 결과 연구 수면 척도
[0472]	MMP-1 매트릭스 메탈로프로테이나제-1
[0473]	MMP-3 매트릭스 메탈로프로테이나제-3
[0474]	MTX 메토타렉세이트
[0475]	NSAID 비스테로이드 항염증제
[0476]	PCS 신체요소 개요
[0477]	PD 약력학
[0478]	PK 약동학
[0479]	PQC 제품 품질 불만
[0480]	PRO 환자 보고 결과
[0481]	PsA 건선성 관절염
[0482]	q8w 매 8 주마다
[0483]	RA 류마티스 관절염
[0484]	RBC 적혈구
[0485]	SAE 심각한 유해 사례
[0486]	SAP 통계 분석 계획
[0487]	SC 피하

[0488] SF-36 36-항목 단축 양식 건강 조사

[0489] SSZ 설파살라진

[0490] TB 결핵

[0491] TNF α 중양 피사 인자 알파

[0492] TST 투베르쿨린 피부 시험

[0493] US 미국

[0494] VAS 시각 상사 척도

[0495] WBC 백혈구

[0496] WLQ 작업 제약 설문

[0497] 서론

[0498] 골리무맙은 면역글로불린 G 1(IgG1) 중쇄 동종형(G1m[z] 동종이형) 및 카파 경쇄 동종형을 갖는 전체 인간 단클론 항체이다. 골리무맙은 서열 번호 36을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 37을 포함하는 경쇄(LC)를 갖는다. 골리무맙의 분자량은 149,802 내지 151,064 달톤의 범위이다. 골리무맙은 인간 종양 피사 인자 알파(TNF α)의 가용성 및 막관통 생물활성 형태 둘 모두와 높은 친화도의 안정한 복합체를 형성하는 인간 단클론 항체이며, 이는 TNF α 의 그의 수용체에 대한 결합을 방지한다. 다른 TNF α 수퍼패밀리 리간드에 대한 결합은 관찰되지 않았으며; 특히, 골리무맙은 인간 림프독소에 결합하거나 중화시키지 않는다. 종양 피사 인자 α 는 활성화된 단핵구, 대식세포, 및 T 세포에 의해 막관통 단백질로서 주로 합성되며, 이는 자가-회합하여 생물활성 동종삼량체를 형성하고 단백질 분해에 의해 세포 표면으로부터 신속하게 방출된다. p55 또는 p75 TNF 수용체에 대한 TNF α 의 결합은 수용체 세포질 도메인의 클러스터링(clustering)으로 이어지고 신호전달을 개시한다. 종양 피사 인자 α 는, 다양한 자극에 반응하여 생산된 후에 카스파제-의존성 세포자멸 경로의 활성화 및 전사 인자 핵 인자(NF)- κ B 및 활성화인자 단백질-1(AP-1)을 통해 염증 반응을 촉진하는 주요 감시 사이토카인(sentinel cytokine)으로서 확인되었다. 종양 피사 인자 α 는 또한 배 중심 내의 면역 세포의 조직화에서 그의 역할을 통해 면역 반응을 조절한다. TNF α 의 상승된 발현은 만성 염증성 질환, 예컨대 류마티스 관절염(RA)과 더불어 건선성 관절염(PsA) 및 강직성 척추염(AS)과 같은 척추관절병증에 연결되었으며, 이들 질환의 특징인 관절 염증 및 구조적 손상의 중요한 매개체이다.

[0499] 강직성 척추염

[0500] 강직성 척추염(AS)은 천장 관절, 및 종종 축성 골격, 골부착부, 및 말초 관절에 관여하는 미지의 병인의 만성 염증성 질환이다. AS는 여성보다 남성에게 더 빈번하게 영향을 주며, 미국에서 그의 유병률은 인구의 0.2 내지 0.5%로 추정된다.²² 골부착부의 만성 염증은 주로 축성 골격에서 새로운 골 형성, 인대골극, 및 관절의 강직으로 이어진다. 운동 범위의 극적인 상실 및 불능으로 이어질 수 있는 것은 이러한 축성 강직(axial ankylosis)이다. 질환은 또한 포도막염, 심염, 폐 섬유증, 장 염증, 및 심장 전도 이상을 포함하는, 골격외 징후(extraskletal manifestation)를 가질 수 있다. 척추관절병증의 서브세트로 간주되는 강직성 척추염은 인간 백혈구 항원-B27(HLA-B27) 항원의 존재와 강력하게 관련된다.³⁴

[0501] 환자는 다양한 근골격계 증상(근위 관절통(proximal arthralgias), 흉통, 및 골부착부염으로부터의 말초 관절 주위의 압통)을 경험할 수 있지만, 가장 일반적인 제시 증상은 만성 요통이다. 요통은 일반적으로 40 세 전에 시작되며, 발병이 잠행성이고, 조조 강직과 관련되며, 궁극적으로 대칭이다. 이러한 근골격계 증상은 피로, 발열, 및 체중 감소와 같은 전신 증상과 관련될 수 있다. TNF α 억제제가 승인되었을 때까지, AS에 대한 치료는 제한된 효능을 가졌고, 주로 운동 및 NSAID로 이루어졌으며, 말초 관절염을 갖는 환자의 서브세트에서 경구 설파살라진(SSZ)의 역할을 이용하였다.¹⁰ 무작위 대조 시험에서 생물학적 TNF α 억제제는 AS를 갖는 환자에서 징후 및 증상, 이동성 및 신체 기능을 유의하게 개선하는 것으로 나타났다.

[0502] 강직성 척추염에서의 TNF α 의 역할

[0503] AS를 포함하는 다양한 적응증에 대한 항-TNF α 요법의 효능 및 안전성 프로파일은 잘 특성화되어 있다. 종양 피사 인자 α 는 매우 다양한 기능적 활성을 나타내는 주요 염증 매개체로 간주된다. 비정상적으로 높은 수준의

TNF α 는 RA, PsA, 및 AS를 포함하는 몇몇 면역 매개 질환의 병리생리학에 연루되었다. 항-TNF α 항체에 의한 TNF α 의 결합은 표적이 세포 표면 TNF α 수용체에 결합하는 것을 방지하고, 결과적으로 하류 신호전달 캐스케이드 및 부적절하거나 과도한 TNF α 발현의 유해 효과를 방지한다. TNF α 의 상승된 수준은 활성 AS를 갖는 환자로부터의 말초 혈액^{16,20,26} 및 활액 조직⁹ 둘 모두에서 관찰되었다. TNF α 는 그것이 RA의 활막염에서 역할을 하듯이 AS의 천장관절염에서 역할을 할 가능성이 있는 것으로 제안되었다. 컴퓨터 단층촬영-유도 천장골 관절 생검으로 평가한 활성 AS를 갖는 5 명의 환자의 연구에서, 면역조직학적 분석에 의해 주로 T 세포 및 대식세포로 이루어진 세포 침윤체가 밝혀졌고, 3 명의 대상의 생검물의 원위치 혼성화 연구에 의해 풍부한 TNF α 가 밝혀졌다.⁵

[0504] 다수의 개방-표지 및 이중-맹검 위약-대조 시험은 AS의 징후 및 증상을 경감시킴에 있어서, 재조합 IgG1- κ 인간-쥐과 키메라 단클론 항-TNF α 항체인 인플릭시맵의 실질적인 효능을 나타냈다. 인플릭시맵은 AS에 대한 치료로서 연구된 최초의 항-TNF α 제제였으며, AS를 갖는 대상 또는 AS를 포함하는 척추관절병증으로 진단 받은 대상에서 0 주, 2 주, 및 6 주에 5 mg/kg 인플릭시맵 주입의 유도 요법은 질환 활성 측정치의 신속한 개선을 유발했다.^{3,7,24,25,27}

[0505] AS만을 갖는 환자⁶ 및 AS를 포함하는 척추관절병증을 갖는 환자²⁸에서 인플릭시맵의 2 개의 무작위 이중-맹검 위약-대조 시험은 인플릭시맵 요법이 임상 결과 측정치의 신속하고 유의한 개선을 유발했음을 나타냈다. ASSERT 연구(AS를 갖는 279 명의 대상이 참여하는 인플릭시맵의 대규모 다기관 이중-맹검 위약-대조 시험)에서, 24 주에 강직성 척추염 20(ASAS 20) 반응률의 평가는 위약-치료군에서 18%였음에 비해 인플릭시맵-치료 대상에서 60%였다.²⁹ 또한, 신체 기능, 운동 범위 삶의 질, 및 MRI 상의 질환 활성 점수의 측정치에서 유의한 개선이 있었다. AS 환자에서의 인플릭시맵 요법은 일반적으로 잘 용인되었다.

[0506] 에타네르셉트, 아달리무맵, 골리무맵, 및 세르톨리주맵을 포함하는 피하(SC) 약물을 사용하는 AS에서의 종양 괴사 인자 α 억제 또한 무작위 위약-대조 시험에서 효과적인 것으로 나타났다.^{4,11,18,19,30} AS의 병리생리학에서 TNF α 의 정확한 역할은 아직 분명하지 않지만, TNF α 억제가 이러한 질환에서 주요 치료적 이익을 갖는다는 크고 증가하는 양의 증가가 이미 존재한다.

[0507] 연구를 위한 전체적인 근거

[0508] 항-TNF α 제제를 이용하는 요법이 염증성 관절염의 치료에서 성공적으로 사용되었지만, 항-TNF α 제제는 안전성, 투여 계획, 비용, 및 면역원성에 대한 제한을 갖는다. 이들 제한 중 일부를 다루기 위하여, 전체 인간 항-TNF α mAb는 골리무맵(CNT0 148 및 rTNV148B로도 알려짐)을 지정하였다. 전체 인간 항-TNF α mAb인 골리무맵은 높은 친화도로 인간 TNF α 에 결합하고 TNF α 생물활성을 억제한다. 또한, 골리무맵은 TNF α -매개 세포 독성 및 TNF α -매개 내피 세포 활성화를 억제한다. 골리무맵은 또한 보체-매개 세포 용해의 활성화를 유도하고, 인간 TNF α 를 과발현하는 마우스에서 관절염의 발생을 감소시킨다.

[0509] SC 골리무맵을 포함하는 항-TNF α 제제를 이용하는 치료는 AS에 의해 영향을 받은 대상에서 징후 및 증상, 신체 기능, 및 건강-관련 삶의 질(HRQOL)을 유의하게 개선하는 것으로 입증되었다. AS를 갖는 대상에서 골리무맵의 SC 투여에 대해 전세계 무작위 이중맹검 위약-대조 3 상 연구(연구 C0524T09)를 완료하여, 5 년의 추적 조사를 통해 SC 골리무맵의 장기 안전성 및 효능을 평가하였다. 피하 골리무맵은 AS의 징후 및 증상을 개선함에 있어서 효과적인 것으로 입증되었다. 안전성 분석은 SC 골리무맵이 일반적으로 잘 용인되었음을 나타냈으며, 다른 항-TNF α 제제에서 관찰된 것과 유사한 안전성 프로파일을 입증하였다.

[0510] SC 골리무맵의 알려진 안전성 및 효능을 고려하여, RA, PsA, 및 AS와 같은 류마티스 질환에서 IV 골리무맵은 다른 항-TNF α 제제와 일치하는 허용가능한 안전성 프로파일과 함께 효능을 입증할 것이 예상되었다. 정맥내 골리무맵은 RA의 치료를 위한 승인의 기반을 형성한 3 상 연구(CNT0148ART3001)에서 명확하게 연구되었다. CNT0148ART3001 연구는, 동시 메토크세이트(MTX) 요법에도 불구하고 활성 RA를 갖는 대상에서, 제0주, 제4주에, 그리고 그 후로는 매 8 주마다(q8w) 30 $\pm$ 10 분의 기간에 걸쳐 투여된 골리무맵 2 mg/kg 주입의 IV 투여의 효능 및 안전성의 무작위 이중-맹검 위약-대조 다기관 2-아암 연구였다. MTX에도 불구하고 활성 RA를 갖는 대상을 위약 주입 또는 제0주, 제4주에, 그리고 제24주까지 매 8 주마다 투여되는 IV 골리무맵 2 mg/kg을 받도록 무작위 배정하였다. 제24주에 시작하여, 모든 대상을 제100주까지 IV 골리무맵으로 치료하였다. IV 골리무맵이 RA 징후 및 증상, 신체 기능, 및 건강 관련 삶의 질의 개선과 더불어 구조적 손상의 진행을 억제함에 있어서

실질적인 이익을 제공하였음이 입증되었다.

[0511] RA(CNT0148ART3001)의 치료에서 정맥내 투여된 골리무맙은 강력한 효능 및 낮은 주입 반응 발생률을 갖는 허용 가능한 안전성 프로파일을 입증하였다. 이러한 제안된 3 상 연구는 활성 AS를 갖는 대상의 치료에서 정맥내 (IV) 골리무맙의 효능 및 안전성을 평가하기 위해 설계된다. 현재 이용가능한 IV 항-TNF α 제제는 면역원성 및 주입 반응에 대한 제한을 가지며, IV 골리무맙을 이용하는 제안된 30 ± 10 분 주입과 비교하여 더 긴 주입 시간(60 내지 120 분)을 가지므로, AS를 갖는 대상에서 IV 투여 경로가 평가되고 있다.

[0512] 환자는 또한 SC 제제와 비교하여 더 빈번한 투여보다는 q8w IV 골리무맙의 유지 투여량 일정을 선호할 수 있다. 따라서, IV 골리무맙은 현재 이용가능한 치료 옵션에 대한 중요한 부가물일 수 있다.

[0513] 본 연구를 위한 투여 계획은 제0주 및 제4주에, 이어서 q8w로 30 분에 걸쳐 IV 주입을 통해 투여되는 2 mg/kg의 골리무맙이다.

[0514] 연구 설계 및 근거

[0515] 연구 설계의 개요

[0516] 이는 NSAID에 대한 부적절한 반응 또는 불내성을 갖는 활성 AS를 갖는 대상에서 위약과 비교한 IV 골리무맙의 효능 및 안전성의 3 상 다기관 무작위 이중-맹검 위약-대조 연구이다. 대략 200 명의 대상을 대략 70 개의 조사 현장에서 무작위 배정할 것이다. 대상은 제0주, 제4주, 및 제12주에 골리무맙 2 mg/kg 또는 위약 IV 주입을 받도록 무작위로 배정될 것이다. 제16주에, 위약 주입을 받는 모든 대상이 전환되고 제16주, 제20주에, 그리고 그 후로는 제52주까지 q8w로 골리무맙 IV 주입을 받기 시작할 것이다. 골리무맙 IV 치료군 내의 대상은 맹검을 유지하기 위해 제16주에 위약 주입을 받고, 제20주에, 그리고 그 후로는 제52주까지 q8w로 골리무맙 IV 주입을 계속 받을 것이다. 데이터베이스 잠금(DBL)은 제28주 및 제60주에 대해 예정되어 있다.

[0517] 마지막 연구 치료 투여 후 8 주 이상 유해 사례(AE) 및 심각한 유해 사례(SAE)에 대해 대상을 추적할 것이다. 연구 종료는 마지막 대상이 제60주 방문을 완료하는 시간으로서 정의된다.

[0518] 연구 설계의 다이어그램은 도 18에 제공된다.

[0519] 연구 설계 근거

[0520] 연구 집단

[0521] 표적 연구 집단은 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이상 동안, 수정된 뉴욕 기준에 의해 정의된 바와 같은 활성 AS를 갖는 대상이다.

[0522] 치료군, 투여량, 및 용량 투여 간격

[0523] 제0주에 하기와 같이 2 개의 치료군 중 1 개에 대상을 무작위 배정할 것이다:

[0524] • 군 1(n= 100): IV 위약 주입

[0525] • 군 2(n= 100): IV 골리무맙 2 mg/kg 주입

[0526] 골리무맙에 무작위로 배정된 대상은 제0주, 제4주에, 그리고 그 후로는 제52주까지 q8w로 골리무맙 2 mg/kg IV 주입을 받을 것이다. 제16주에, 골리무맙에 무작위 배정된 대상은 맹검을 유지하기 위해 위약 주입을 받을 것이다. 제0주, 제4주, 및 제12주에 위약 IV 주입을 받도록 무작위로 배정된 모든 대상은 제16주에 활성 치료로 전환되고, 제16주, 제20주에, 그리고 그 후로는 제52주까지 q8w로 골리무맙 2 mg/kg IV 주입을 받을 것이다. 골리무맙 IV 치료군 내의 대상은 골리무맙 IV 주입을 계속 받을 것이다.

[0527] 연구 상 및 치료의 지속 시간

[0528] 본 연구에는 4 개의 상이 있을 것이다: 스크리닝, 이중-맹검 위약-대조, 활성 치료, 및 안전성 추적조사. 최대 6 주의 스크리닝 상은 스크리닝 연구 평가를 수행하고 연구 적격성을 결정하기에 충분한 시간을 가능하게 할 것이다. 연구의 제2 상은 제0주 내지 제16주의 이중 맹검 위약-대조 상일 것이다. 연구의 제3 상은 제16주 내지 제52주의 활성 치료 상일 것이다. 연구의 제4 상은 안전성 추적조사 상일 것이며, 연구 제제의 마지막 투여로부터 8 주일 것이다. 안전성 추적조사는 골리무맙의 반감기의 대략 5 배와 등가인 기간 동안 대상의 모니터링을 가능하게 한다. 각각의 대상에 대한 초기 치료 배정은 60 주의 연구 전체에 걸쳐 현장 및 대상에 대해 여전히 맹검화된다. 이러한 지속기간은 AS에 대한 유지 요법으로서 IV 골리무맙의 효능 및 안전성을 입증하기에 적

절한 시간을 제공할 것이다.

[0529] 연구는 마지막 대상이 마지막 예정된 방문(제60주 방문)을 완료할 때 종료될 것이다.

[0530] **연구 대조군, 무작위 배정, 및 맹검**

[0531] 치료군으로의 대상의 배정에 있어서 편향을 최소화하고, 알려지거나 알려지지 않은 대상 속성(예를 들어, 인구 통계학적 및 기준선 특징)이 치료군에 걸쳐 고르게 균형을 이룰 가능성을 증가시키고, 치료군에 걸쳐 통계 비교의 유효성을 향상시키기 위해 무작위 배정이 사용될 것이다. 또한, 무작위 배정은 지리적 영역 및 항-TNF α 요법의 이전의 사용(예 또는 아니오)에 기초하여 계층화될 것이다.

[0532] 개별 대상 및 연구자는 연구의 지속시간 동안 맹검을 유지할 것이다. 맹검 처리는 데이터 수집 및 임상적 종점의 평가 동안 잠재적 편향을 감소시키는 데 사용될 것이다. 제28주 및 제60주에 연구를 위해 2 개의 DBL이 계획된다. 제1 DBL은 모든 대상이 제28주 방문을 완료하거나 연구 참여를 종료한 후에 일어날 것이다. 제2 DBL은 모든 대상이 제60주 방문을 완료했거나 연구 참여를 종료한 후에 일어날 것이다. 데이터베이스는 제28주에 잠길 것이고, 선택된 개인에게 데이터 분석 및 데이터 검토를 위해 요약-수준 데이터가 DBL에 대상-수준 데이터까지 비맹검화될 것이다. 제60주 DBL이 일어날 때까지, 비맹검 약사를 제외한 모든 현장 인사 및 대상은 치료 배정에 대해 맹검을 유지할 것이다.

[0533] **효능 평가**

[0534] 본 연구를 위해 선택된 효능 평가는 AS의 치료를 위한 치료적 생물학적 제제의 이전의 시험에서 확립되었다. 본 연구를 위해 선택된 환자 보고 결과(PRO)는 또한 AS에서의 다른 연구 및 적용가능한 US/EU 규제 지침 문서에 대해 의료 문헌에서 받아들여지는 임상적으로 관련된 측정과 일치한다.

[0535] 강직성 척추염 반응 평가는 하기를 포함한다:

[0536] • 배스 강직성 척추염 기능 지수(BASFI)

[0537] • 환자의 전반적 평가

[0538] • 총 요통

[0539] • 배스 강직성 척추염 질환 활성 지수(BASDAI)

[0540] • 36-항목 단축 양식 건강 조사(SF-36)

[0541] • 배스 강직성 척추염 계측 지수(BASMI)

[0542] • 강직성 척추염 삶의 질(ASQoL) 설문

[0543] • 흉부 팽창

[0544] • 야간 요통

[0545] • 골부착부염 지수

[0546] • 의료 결과 연구 수면 척도

[0547] • 작업 제약 설문(WLQ)

[0548] • 생산성 시각 상사 척도

[0549] • EuroQol-5D(EQ-5D) 설문

[0550] **대상 집단**

[0551] 연구에 적격성인 대상은, 수정된 뉴욕 기준에 의해 "명확함" 으로 정의된 3 개월 이상 동안의 AS의 진단, 및 각 0 내지 10 cm의 척도 상에서 4 이상의 BASDAI 및 4 이상의 총 요통에 대한 시각 상사 척도(VAS)에 의해 입증

되는 바와 같은 활성 질환의 증상을 갖는 18 세 이상의 남성 또는 여성일 것이다. 대상은 0.3 mg/dL 이상의 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 가질 필요가 있다.

[0552] 연구 집단의 다른 주요 특징은 하기와 같다:

[0553]  MTX, SSZ, 및 하이드록시클로로퀸(HCQ) 및 저용량 경구 코르티코스테로이드의 현재 사용자는 허용되며, 이들 약물의 안정한 용량 상에서 연구에 진입해야 한다.

[0554]  하나 이하의 생물학적 항-TNF α 제제(골리무맙 이외의)에 이전에 노출된 대상은 연구에 포함되는 것이 허용되지만, 연구 집단의 최대 20%로 제한될 것이다.

[0555]  측면 척추 방사선사진 상에서 가시화되는 경추 및 요추의 관찰의 모든 추간 수준(intervertebral level)에 존재하는 가교 인대골극(bridging syndesmophyte)에 의해 정의되는, 척추의 완전 강직을 갖는 대상은 연구에 포함되는 것이 허용되지만, 연구 집단의 최대 10%로 제한될 것이다.

[0556] 적격성 대상에 대한 스크리닝은 연구 제제의 투여 전 6 주 이내에 수행될 것이다.

[0557] 본 연구에서 대상을 등록하기 위한 포함 및 배제 기준은 하기 2개의 하위 섹션에 기재되어 있다. 하기 포함 또는 배제 기준에 관한 문제가 있는 경우, 연구자는 연구에 대상을 등록하기 전에 적절한 대표와 협의해야 한다.

[0558] 포함 기준

[0559] 각각의 잠재적 대상은 연구에 등록하기 위해 하기 기준 모두를 만족시켜야 한다.

[0560] 1. 대상은 18 세 이상의 남성 또는 여성이어야 한다.

[0561] 2. 대상은 스크리닝에서 수행되는 신체 검사, 의료 이력, 활력 징후, 및 12-유도 심전도(ECG)에 기초하여 의학적으로 안정해야 한다. 이러한 결정을 대상의 근거 문서에 기록하고 연구자가 서명해야 한다.

[0562] 3. 대상은 스크리닝에서 수행된 임상 실험실 시험에 기초하여 의학적으로 안정해야 한다. 간 효소 또는 혈액학을 포함하는 혈청 화학 패널의 결과가 정상 기준 범위 밖에 있는 경우, 정상으로부터의 편차 또는 이상이 임상적으로 유의하지 않거나 연구 중인 집단에 적절하고 합리적인 것으로 연구자가 판단하는 경우에만 대상이 포함될 수 있다. 이러한 결정을 대상의 근거 문서에 기록하고 연구자가 서명해야 한다. 포함 기준 #6 및 #16에 기재된 시험의 경우, 결과는 포함 기준 #6 및 #16에서 허용되는 적격성 범위 내에 있어야 한다.

[0563] 4. 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이상 동안, 수정된 뉴욕 기준에 의해 정의된 바와 같은 명확한 AS의 진단을 갖는다.

[0564] 방사선사진 기준 및 1 개 이상의 임상 기준 둘 모두가 충족되어야 한다:

[0565] a. 방사선사진 기준: 양측성으로 2 이상의 천장관절염 등급 또는 편측성으로 3 내지 4의 천장관절염 등급.

[0566] b. 임상 기준(1 개 이상):

[0567] i. 운동에 의해 개선되지만 휴식에 의해 완화되지 않는, 3 개월 초과 동안의 요통 및 강직.

[0568] ii. 시상면 및 전두면 둘 모두에서 요추의 운동의 제한.

[0569] iii. 연령 및 성별에 대해 보정된 정상 값에 대한 흉부 팽창의 제한.

[0570] 5. 각각 0 내지 10 cm의 척도 상에서, 4 이상의 BASDAI 점수 및 4 이상의 총 요통에 대한 VAS 점수 둘 모두에 의해 입증되는 바와 같이, 스크리닝 및 기준선에서 활성 질환의 증상을 갖는다.

[0571] 6. 스크리닝에서 0.3 mg/dL 이상의 CRP 수준을 갖는다.

[0572] 7. NSAID(들)의 최대 권장 용량으로 총 4 주 기간에 걸쳐 2 개 이상의 NSAID에 대한 부적절한 반응을 갖거나, NSAID에 대한 불내성, 독성, 또는 금기로 인해 전체 4 주의 최대 NSAID 요법을 받을 수 없다.

[0573] 8. NSAID 또는 AS에 대한 다른 진통제를 사용하는 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 안정한 용량에 있어야 한다. 현재 NSAID 또는 AS에 대한 다른 진통제를 사용하지 않는 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 NSAID 또는 AS에 대한 다른 진통제를 받지 않았어야 한다.

[0574] 9. 경구 코르티코스테로이드를 사용하는 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 10 mg/일 이하의 프레

드니손과 등가인 안정한 용량에 있어야 한다. 현재 코르티코스테로이드를 사용하지 않는 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 경구 코르티코스테로이드를 받지 않았어야 한다.

[0575] 10. MTX, SSZ, 또는 HCQ를 사용하는 경우, 연구 제제의 최초 투여로부터 3 개월 이상 전에 치료를 시작했어야 하며, 질환 변형 항류마티스 약물(DMARD)에 기인하는 심각한 독성 부작용을 갖지 않았어야 한다. 메토트렉세이트의 투여 경로 및 용량(25 mg/주를 초과하지 않음)은 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 안정해야 한다. SSZ 또는 HCQ를 사용하는 경우, 또한 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 안정한 용량에 있어야 한다. 현재 MTX, SSZ, 또는 HCQ를 사용하지 않는 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 이들 DMARD를 받지 않았어야 한다.

[0576] 11. 무작위 배정 전에, 여성은

[0577]  가임 여성이 아니거나; 초경 전이거나; 폐경후(12 개월 이상 동안 무월경인 45 세 초과와 연령)이거나; 영구 불임(예를 들어, 난관 폐쇄, 자궁절제술, 양측 난관절제술)이거나; 그 외에 임신이 불가능하거나,

[0578]  임상 연구에 참여하는 대상에 대한 산아 제한 방법의 사용에 관한 현지 규정에 부합하는 고도로 효과적인 산아 제한 방법을 실시하는 가임 여성이어야 한다: 예를 들어, 경구, 주사, 또는 임플란트된 호르몬 피임 방법의 확립된 사용; 자궁내 장치 또는 자궁내 시스템의 거치; 장벽 방법: 살정자 포말/겔/필름/크립/좌제를 갖는 콘돔 또는 살정자 포말/겔/필름/크립/좌제를 갖는 폐쇄 캡(격막 또는 경부/원개 캡); 남성 파트너 불임화(정관절제술을 받은 파트너는 그러한 대상체를 위한 유일한 파트너이어야 함); 진정한 금욕(이것이 대상의 바람직하고 통상의 생활 방식과 일치할 경우).

[0579] 12. 가임 여성은 스크리닝에서 음성 혈청 임신 시험(β -인간 용모 고나도트로핀 [β -HCG]) 및 무작위 배정 전 제 0주에 음성 소변 임신 시험을 가져야 한다.

[0580] 13. 여성은 연구 중에, 그리고 연구 제제의 마지막 용량을 받은 후 4 개월 동안, 임신하거나 보조 생식의 목적으로 난자(난, 난모세포)를 기증하지 않을 것에 동의해야 한다.

[0581] 14. 가임 여성과 성적 활동을 갖고 정관절제술을 받지 않은 남성은, 연구 중에, 그리고 연구 제제의 마지막 용량 후 4 개월 동안, 산아 제한의 장벽 방법, 예를 들어 살정자 포말/겔/필름/크립/좌제를 갖는 콘돔을 사용하거나 파트너가 살정자 포말/겔/필름/크립/좌제를 갖는 폐쇄 캡(격막 또는 경부/원개 캡)을 사용하는 것에 동의해야 한다. 연구 중에, 그리고 연구 제제의 마지막 용량을 받은 후 4 개월 동안, 모든 남성은 또한 정자를 기증해서는 안 된다.

[0582] 15. 하기의 결핵(TB) 스크리닝 기준에 따라 적격인 것으로 간주된다:

[0583] a. 스크리닝 전에 잠복성 또는 활성 TB의 이력을 갖지 않는다. 잠복성 TB의 이력을 갖고 현재 잠복성 TB에 대한 치료를 받고 있거나, 연구 제제의 최초 투여 전에 잠복성 TB에 대한 치료를 개시할 예정이거나, 연구 제제의 최초 투여 전 5 년 이내에 잠복성 TB에 대한 적절한 치료를 완료한 문서를 갖는 대상에 대해서는 예외로 한다.

[0584] b. 의료 이력 및/또는 신체 검사시에 활성 TB를 시사하는 징후 또는 증상이 없다.

[0585] c. 활성 TB를 갖는 사람과 최근의 밀접한 접촉이 없었거나, 그러한 접촉이 있었다면, TB 전문의에게 회부하여 추가의 평가를 받게 하고, 타당한 경우, 연구 제제의 최초 투여 전에 잠복성 TB에 대해 적절한 치료를 받을 것이다.

[0586] d. 연구 제제의 최초 투여 전 6 주 이내에, 음성의 QuantiFERON®-TB Gold 시험 결과를 갖거나, 활성 TB가 배제되었고 잠복성 TB에 대한 적절한 치료가 연구 제제의 최초 투여 전에 개시된 새로 확인된 양성 QuantiFERON®-TB Gold 검사 결과를 갖는다. QuantiFERON®-TB Gold 시험이 그 국가에서 승인/등록되어 있지 않거나 TST가 현지 보건 당국에 의해 법으로 규정된 경우, 연구 제제의 최초 투여 전 6 주 이내에, 음성 투베르쿨린 피부 시험(TST), 또는 활성 TB가 배제되었고 잠복성 TB에 대한 적절한 치료가 연구 제제의 최초 투여 전에 개시된 새로 확인된 양성 TST가 추가로 요구된다.

[0587] i. 지속적으로 모호한 QuantiFERON®-TB Gold 시험 결과를 갖는 대상은, 활성 TB가 배제되고, 그들의 흉부 방사선사진이 TB(활성이거나 오래된 비활성 TB)를 시사하는 이상을 나타내지 않고, 연구자에 의해 결정된 바와 같이 대상이 TB에 대한 추가의 위험 인자를 갖지 않는 경우, 잠복성 TB에 대한 치료 없이 등록될 수 있다.

[0588] ii. 잠복성 TB의 이력 및 잠복성 TB에 대한 진행 중인 치료 또는 상기 기재된 바와 같은 적절한 치료를 완료한

문서를 갖는 대상에 대해서는 스크리닝에서 QuantiFERON®-TB Gold 시험 및 TST가 요구되지 않으며; 상기 기재된 바와 같은 적절한 치료를 완료한 문서를 갖는 대상은 잠복성 TB에 대한 추가의 치료를 개시할 것이 요구되지 않는다.

- [0589] e. 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내에 촬영하고 자격을 갖춘 방사선 의사가 판독한, 현재의 활성 TB 또는 오래된 비활성 TB의 증거가 없는 흉부 방사선사진(후-전 촬영)을 갖는다.
- [0590] 16. 하기의 파라미터들 내의 스크리닝 실험실 시험 결과를 가져야 한다:
- [0591] a. 8.5 g/dL 이상의 헤모글로빈
- [0592] b. $3.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 이상의 백혈구
- [0593] c. $1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 이상의 호중구
- [0594] d. $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 이상의 혈소판
- [0595] e. 1.5 mg/dL 이상의 혈청 크레아티닌
- [0596] f. AST, ALT, 및 알칼라인 포스파타제 수준은 시험을 수행하는 실험실에 대한 ULN 범위의 1.5 배 이내여야 한다.
- [0597] 17. 대상은 이 프로토콜에 특정된 금지사항 및 제한사항을 기꺼이 준수할 수 있어야 한다.
- [0598] 18. 각각의 대상체는 그 또는 그녀가 연구의 목적 및 그에 필요한 절차를 이해하고 이 연구에 기꺼이 참여할 것임을 나타내는 사전동의서 용지(ICF)에 서명해야 한다.
- [0599] 19. 그 또는 그녀가 임의의 연구용 DNA 샘플을 제공하는 것(현지 규정이 허용하는 경우)에 동의하는 경우, 각각의 대상은 별도의 고지에 입각한 동의 양식에 서명해야 한다. 임의의 DNA 연구 샘플에 대한 동의서를 제공하는 것에 대한 거부하는 연구에 참여하는 것으로부터 대상을 배제하지 않는다.
- [0600] 20. 최초 연구 제제 투여 전 2 주 이내 및 연구의 지속기간 전체에 걸쳐, 아유르베다 의약품(ayurvedic medicine), 중국 전통 약물(들), 및 침술을 포함하는 보완 요법의 사용을 기꺼이 자제한다.
- [0601] **배제 기준**
- [0602] 하기 기준 중 임의의 것을 충족시키는 임의의 잠재적 대상은 연구에 참여하는 것으로부터 배제될 것이다.
- [0603] 1. RA, PsA, 전신 홍반성 루푸스, 또는 라임병을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 골리무맙 요법으로부터의 이익의 평가를 교란할 수 있는 다른 염증성 질환을 갖는다.
- [0604] 2. 연구에 등록된 동안, 또는 연구 제제의 마지막 투여를 받은 후 4 개월 이내에 임신하거나, 수유하거나, 임신을 계획하거나, 아동의 아버지가 된다.
- [0605] 3. 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이내에 MTX, SSZ, 또는 HCQ 이외의 임의의 전신 면역억제제 또는 DMARD를 받았다. 이들 카테고리 내의 약물은 클로로퀸, 아자티오프린, 사이클로스포린, 마이코페놀레이트 모페틸, 금, 및 페니실라민을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 코르티코스테로이드는 이 기준에 포함되지 않으며; 코르티코스테로이드에 관한 다른 적격성 기준을 참조한다.
- [0606] 4. 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이내에 레플루노미드를 받았거나(약물 제거 절차를 받는 것과 관계 없이), 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내에 레플루노미드를 받았고 약물 제거 절차를 받지 않았다.
- [0607] 5. 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 동안 부신피질자극 호르몬을 포함하는 경막외, 관절내, IM, 또는 IV 코르티코스테로이드를 받았다.
- [0608] 6. 골리무맙을 받은 적이 있다.
- [0609] 7. 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내에 인플릭시맙(생체유사 항-TNF α 제제를 포함함), 아달리무맙, 또는 세르톨리주맙 폐골을 받았다.
- [0610] 8. 연구 제제의 최초 투여 전 6 주 이내에 에타네르셉트 또는 이사이푸를 받았다.
- [0611] 9. 하나 초과이 이전의 항-TNF α 제제를 받았다.
- [0612] 10. 임의의 이전의 항-TNF α 제제에 대해 1차 실패(치료의 최초 16 주 이내에 효능의 결여로 인한 중단 또는

연구자에 의해 평가된 바와 같은 반응의 결여로서 정의됨)를 경험하였다.

- [0613] 11. 토실리주맙, 알레파셉트, 에팔리주맙, 나탈리주맙, 아바타셉트, 아나킨라, 우스테키누맙, 브로달루맙, 세쿠키누맙, 익세키주맙, 및 B-세포 고갈 요법을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 항-TNF α 제제 이외의 이전의 생물학적 요법을 받았다.
- [0614] 12. 토파시티닙 또는 임의의 다른 Janus 키나제 억제제(JAK)를 받은 적이 있다.
- [0615] 13. 인간 면역글로불린 단백질에 대한 알려진 과민성을 갖는다.
- [0616] 14. 클로람부실, 사이클로포스파미드, 질소 머스타드, 또는 다른 알킬화제를 포함하는 세포독성 약물을 사용하였다.
- [0617] 15. 스크리닝 전에, 히스토플라스마증(histoplasmosis) 또는 콕시디오이데스진균증(coccidioidomycosis)을 포함하는 활성 육아종성 감염의 이력을 갖는다. 잠복성 TB의 이력에 의한 적격성에 관한 정보에 대해서는 포함 기준을 참조한다.
- [0618] 16. 스크리닝의 12 개월 이내에 바실러스 칼메트-구에린(BCG) 백신접종을 가진 적이 있다.
- [0619] 17. TB를 포함하는, 악성종양 또는 현재의 활성 감염을 시사하는 이상을 나타내는, 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내의 흉부 방사선사진을 갖는다.
- [0620] 18. 스크리닝 전 6 개월 이내에 비결핵 마이코박테리아 감염 또는 기회 감염(예를 들어, 사이토메갈로바이러스, 폐포자충증, 국균증)을 가진 적이 있다.
- [0621] 19. 연구 제제의 최초 투여의 2 개월 이내에 대상 포진 감염을 가진 적이 있다.
- [0622] 20. 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내에, 연구 중에, 또는 연구 제제의 마지막 투여 후 3 개월 이내에 임의의 생존 바이러스 또는 박테리아 백신접종을 받았거나, 받을 것으로 예상된다.
- [0623] 21. 감염된 관절 보형물의 이력을 갖거나, 관절 보형물의 의심되는 감염에 대해 항생제를 받았다(그 보형물이 제거되거나 대체되지 않은 경우).
- [0624] 22. 심각한 감염(간염, 폐렴, 패혈증, 또는 신우신염을 포함하지만 이에 한정되지 않음)을 가진 적이 있거나, 감염으로 입원하였거나, 연구 제제의 최초 투여 전 2 개월 이내에 감염에 대한 IV 항생제로 치료하였다.
- [0625] 23. 만성 신장 감염, 만성 흉부 감염(예를 들어, 기관지 확장증), 부비동염, 재발성 요로 감염(예를 들어, 재발성 신우신염), 개방성이거나, 배농성이거나, 감염된 피부 상처, 또는 궤양을 포함하지만 이로 제한되지 않는, 진행 중이거나, 만성이거나, 재발성인 감염성 질환 또는 그의 이력을 갖는다.
- [0626] 24. 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항체 양성의 이력을 갖거나, 스크리닝에서 HIV에 대한 시험이 양성이다.
- [0627] 25. B 형 간염 감염을 갖는다. 대상은 B 형 간염 바이러스(HBV)에 대한 스크리닝을 받아야 한다. 최소한 이는 HBsAg(HBV 표면 항원), 항-HBs(HBV 표면 항체), 및 항-HBc 전체(HBV 코어 항체 전체)에 대한 시험을 포함한다.
- [0628] 26. 스크리닝 전에 6 개월 간격으로 2 개의 음성 HCV RNA 시험 결과를 갖고 스크리닝에서 제3의 음성 HCV RNA 시험 결과를 갖지 않는 한, C 형 간염 바이러스(HCV)에 대한 항체에 대해 혈청양성(seropositive)인 대상.
- [0629] 27. 다발성 경화증 또는 시신경염과 같은 알려진 탈수초 질환의 이력을 갖는다.
- [0630] 28. 중증, 진행성, 또는 제어되지 않는 신장, 간, 혈액학적, 위장, 내분비, 폐, 심장, 신경학적, 뇌, 또는 정신과 질환의 현재 징후 또는 증상을 갖는다.
- [0631] 29. 의학적으로 제어되는 무증상 CHF를 포함하는, 동시 울혈성 심부전(CHF) 또는 그의 이력을 갖는다.
- [0632] 30. 림프종을 포함하는 림프증식성 질환, 또는 가능한 림프증식성 질환을 시사하는 징후 및 증상, 예컨대 특이한 크기 또는 위치의 림프선종, 임상적으로 유의한 비장비대증, 또는 결정되지 않은 유의성의 단클론 감마글로불린병증의 알려진 이력을 갖는다.
- [0633] 31. 스크리닝 전 5 년 이내에 대상이 악성종양의 이력을 갖는다(최초 연구 제제 투여 전 3 개월 이상 동안 재발의 증거 없이 치료된 피부의 편평 세포 및 기저 세포 암종 및 수술적으로 치유된 자궁경부의 상피내 암종은 예외로 한다).

- [0634] 32. 대상이 골리무맙 또는 그의 부형제(골리무맙 IB를 지칭함)에 대한 알려진 알러지, 과민성, 또는 불내성을 갖는다.
- [0635] 33. 연구 약물의 계획된 최초 용량 전에 대상이 임의의 허용되지 않는 요법을 받았다.
- [0636] 34. 5 반감기 또는 3 개월 중 더 긴 기간 이내에 대상이 조사 약물(조사 백신을 포함함)을 받았거나, 연구 약물의 계획된 최초 용량 전 3 개월 이내에 침습성 조사 의료 장치를 사용했거나, 현재 조사 연구에 등록되어 있다.
- [0637] 35. 연구자의 의견으로, 참여가 대상에게 최선이 아닐 것이거나(예를 들어, 행복감을 훼손함) 프로토콜-특정된 평가를 방지하거나 제한하거나 교란할 수 있는 임의의 병태를 대상이 갖는다.
- [0638] 36. 대상이 스크리닝 전 1 개월 이내에 대수술(예를 들어, 전신 마취를 필요로 함)을 받은 적이 있거나, 수술로부터 완전히 회복되지 않을 것이거나, 대상이 연구에 참여할 것으로 예상되는 시간 동안 또는 연구 약물 투여의 마지막 용량 후 1 개월 이내에 계획된 수술을 갖는다.
- [0639] 37. 이식된 기관(연구 제제의 최초 투여로부터 3 개월 초과 전에 수행된 각막 이식을 제외함)을 갖는다.
- [0640] 38. 이전의 3 년 이내에 물질 남용(약물 또는 알코올) 문제를 갖거나 가진 적이 있다.
- [0641] 39. 불량한 내약성 또는 용이한 접근의 결여로 인해 다수의 정맥천자를 받을 수 없거나 이를 꺼린다.
- [0642] 40. 대상이 연구자 또는 연구 현장의 고용인으로서, 제안된 연구 또는 그 연구자 또는 연구 현장의 지휘를 받는 다른 연구에 직접 관여하거나, 고용인 또는 연구자의 가족 구성원이다.
- [0643] **비고:** 연구자는 모든 연구 등록 기준이 스크리닝에서 그리고 다시 무작위 배정 전에 충족되었음을 보장해야 한다. 스크리닝 후에, 그러나 연구 약물의 최초 용량 전에 대상의 상태 변화(실험실 결과 또는 추가의 의료 기록의 수신을 포함함)가 주어짐으로써 그 또는 그녀가 더 이상 모든 적격성 기준을 충족시키지 않는다면, 대상은 연구에 참여하는 것로부터 배제되어야 한다.
- [0644] **금지사항 및 제한사항**
- [0645] 참여에 대해 적격성이기 위해, 잠재적 대상은 연구 과정 중에 하기 금지사항 및 제한사항을 기꺼이 준수할 수 있어야 한다:
- [0646] 1. 이성애자로서 활동적인 가임 여성 및 아동의 아버지가 될 수 있는 남성 둘 모두는 고도로 효과적인 피임 방법을 사용하고 연구의 지속기간 동안 및 연구 제제의 마지막 투여 후 4 개월 동안 피임을 계속 사용하는 것에 동의해야 한다.
- [0647] 2. 하기 약물의 사용은 IV 연구 제제 투여와 동시에 허용되지 않는다:
- [0648] • 클로로퀸, 아자티오프린, 경구 사이클로스포린 A, 타크롤리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, 경구 또는 비경구 금을 포함하는 전신 면역억제제 또는 DMARD(MTX, SSZ, 및 HCQ 이외의). 전신 면역억제제는 코르티코스테로이드를 지칭하지 않으며; 코르티코스테로이드 제한에 관해서는 다른 곳을 참조한다.
- [0649] • TNF α 를 감소시킴을 표적화하는 생물학적 제제(인플릭시맙, SC 골리무맙, 세르톨리주맙 페골, 에타네르셉트, 이사이푸, CT-P13[Remsima®], 및 아달리무맙을 포함하지만 이에 한정되지 않음)
- [0650] • IL-1ra(아나킨라)
- [0651] • 토실리주맙 또는 IL-6 또는 IL-6 수용체를 표적화하는 임의의 다른 생물제제
- [0652] • 토파시티닙 또는 임의의 다른 JAK 억제제
- [0653] • B-세포 고갈제(예를 들어, 리툽시맙)
- [0654] • 세포독성 약물, 예컨대 사이클로포스파미드, 클로람부실, 질소 머스타드, 또는 다른 알킬화제
- [0655] • 아바타셉트
- [0656] • 우스테키누맙

- [0657] 항-IL-17 제제(예를 들어, 브로달루맙, 세쿠키누맙, 및 익세키주맙)
- [0658] 조사 약물
- [0659] 3. 연구 중에 생존 바이러스 또는 생존 박테리아 백신접종을 받지 않는 것에 동의해야 한다. 대상은 또한 연구 제제의 마지막 투여를 받은 후 3 개월 동안 생백신 백신을 받지 않는 것에 동의해야 한다. 스크리닝의 12 개월 이내에 BCG 백신접종을 받은 적이 없어야 한다.
- [0660] 4. 본 연구의 지속기간 동안 연구 제제 이외의 조사 의료 장치 또는 조사 약물을 받지 않는 것에 동의해야 한다.
- [0661] 5. 아스피린 및 선택적 COX-2 억제제, 및 다른 진통제를 포함하는 NSAID로 치료하는 대상은 연구가 수행되고 있는 국가에서 승인된 통상의 시판되는 용량을 받아야 한다. NSAID 및 다른 진통제의 처방은 연구 약물의 최초 투여 전 2 주 이상 동안, 그리고 제16주까지 조정되어서는 안 되며, 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 변경될 수 있다. 제16주 내지 제60주 후에, 1 회 용량 감소가 허용되며; 그 외에는, NSAID 및 다른 진통제의 처방은 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 변경될 수 있다.
- [0662] 캡사이신 및 디클로페낙을 포함하는 국소 진통제의 사용은 허용된다.
- [0663] 6. 경구 코르티코스테로이드로 치료하는 대상은 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 10 mg/일 이하의 프레드니손과 등가인 안정한 용량을 받고 이 용량을 제16주까지 계속 받아야 한다. 제16주 후에, 그리고 제60주까지, 경구 코르티코스테로이드의 1 회 용량 감소가 허용되며; 그 외에는, 경구 코르티코스테로이드의 용량 및 유형은 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 연구자의 재량으로 변경될 수 있다.
- [0664] 코르티코스테로이드의 경막외, IM, 또는 IV 투여는 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이내에 허용되지 않으며, 연구 전체에 걸쳐 AS의 치료를 위해 허용되지 않는다. AS 이외의 적응증에 대한 연구 중의 경막외, IM, 및 IV 코르티코스테로이드의 사용을 피하기 위해 모든 시도가 실행되어야 한다. 제60주까지 AS 이외의 적응증에 대한 장기(2 주 초과) 경구 또는 IV 코르티코스테로이드 사용은 허용되지 않는다. AS 이외의 적응증에 사용되는 단기(2 주 이하) 경구, IV, IM, 또는 경막외 코르티코스테로이드는, 치료 의사의 의견으로 적절한 대안이 없는 상황으로 제한되어야 한다.
- [0665] 관절내 스테로이드는 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이내에 투여되어서는 안 된다. 특히 연구의 최초 16 주 동안 관절내 코르티코스테로이드 주사를 피하기 위한 시도가 실행되어야 한다. 그러나, 필요한 경우, 대상은 연구의 60 주 동안 2 개 이하의 영향을 받은 부위에서 최대 2 개의 관절내, 건초, 또는 활액낭 코르티코스테로이드 주사를 받을 수 있다.
- [0666] 7. 전통 의약품(예를 들어, 중국, 침술, 아유르베다 의약품)을 포함하지만 이에 한정되지 않는, AS 질환 활성 또는 평가에 영향을 줄 수 있는 보완 요법의 사용은 제60주까지 금지된다.
- [0667] **사전연구 및 동시 요법**
- [0668] 제16주까지, 또는 하기 섹션에 AS 요법에 대해 특정된 바와 같이, 대상의 동시 약물을 안정하게 유지하기 위해 모든 노력이 실행되어야 한다. 비정상 실험실 값, 부작용, 동시 질병, 또는 수술적 절차의 수행으로 인해 동시 약물 용량이 감소되거나 약물이 일시적으로 중단될 수 있지만, 변화 및 변화의 이유는 대상의 의료 기록에 명확하게 문서화되어야 한다.
- [0669] 대상은 60-주 연구 기간 중에 AS에 대한 임의의 새로운 치료를 개시하지 않아야 한다.
- [0670] 동시 약물 검토는 일정표에서 확인되는 연구 방문시에 일어날 것이다.
- [0671] **메토티렉세이트, 설파살라진, 또는 하이드록시클로로퀸**
- [0672] 대상은 MTX, SSZ, 또는 HCQ의 안정한 용량에 대한 연구에 진입하도록 허용된다.
- [0673] 대상이 MTX, SSZ, 또는 HCQ를 사용하고 있는 경우, 치료는 연구 제제의 최초 투여로부터 3 개월 이상 전에 시작되었어야 한다. MTX의 투여 경로 및 25 mg/주 이하의 용량은 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 안정해야 한다. 본 연구에서 MTX를 받는 모든 대상은 5 mg 이상의 경구 폴레이트 또는 5 mg의 폴린산을 매주 받는 것이 권장된다. SSZ 또는 HCQ를 사용하는 경우, 대상은 또한 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 안정한 용량에 있어야 한다.

- [0674] MTX, SSZ, 또는 HCQ로 치료 중이 아닌 대상은 연구 제제의 최초 투여 전 4 주 이상 동안 치료를 중단했어야 하고, 제60주까지 MTX, SSZ, 또는 HCQ를 받아서는 안 된다.
- [0675] 이 약물을 받는 대상에서, MTX, SSZ, 및 HCQ의 안정한 용량 및 투여 경로를 연구의 제60주까지 유지하기 위해 모든 노력이 실행되어야 한다. MTX 독성의 경우에 용량 조정을 위한 지침은 시험 센터 파일에 포함되어 있다.
- [0676] **코르티코스테로이드 요법**
- [0677] AS에 대해 경구 코르티코스테로이드로 치료하는 대상은 연구 제제의 최초 투여 전 2 주 이상 동안 10 mg/일 이하의 프레드니손과 등가인 안정한 용량을 받고 이 용량을 제16주까지 계속 받아야 한다. 제16주 후에, 그리고 제60주까지, 경구 코르티코스테로이드의 1 회 용량 감소가 허용되며; 그 외에는, 경구 코르티코스테로이드의 용량 및 유형은 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 연구자의 재량으로 변경될 수 있다. 기준선에서 경구 코르티코스테로이드로 치료하지 않는 대상은 연구 제제의 최초 투여로부터 2 주 이상 전에 경구 코르티코스테로이드를 중단했어야 하며, 그들은 제60주까지 AS에 대한 경구 코르티코스테로이드를 받지 않아야 한다.
- [0678] AS의 치료를 위한 코르티코스테로이드의 정맥내, 근육내, 또는 경막외 투여는 제60주까지 허용되지 않는다.
- [0679] 제60주까지 AS 이외의 적응증에 대한 장기(2 주 초과) 경구 또는 IV 코르티코스테로이드 사용은 허용되지 않는다. AS 이외의 적응증에 사용되는 단기(2 주 이하) 경구, IV, IM, 또는 경막외 코르티코스테로이드는, 치료의 사의 의견으로 적절한 대안이 없는 상황으로 한정되어야 한다. 코르티코스테로이드의 흡입, 귀, 눈, 비강내, 및 다른 점막 전달 경로가 연구 과정 전체에 걸쳐 허용된다.
- [0680] 특히 연구의 최초 16 주 동안 관절내 코르티코스테로이드 주사를 피하기 위한 시도가 실행되어야 한다. 그러나, 필요한 경우, 대상은 연구의 60 주 동안 2 개 이하의 영향을 받은 부위에서 최대 2 개의 관절내, 건초, 또는 활액낭 코르티코스테로이드 주사를 받을 수 있다. 단일 관절에서의 중증 압통 또는 종창의 경우에, 관절내 코르티코스테로이드 주사를 받기 전에 감염에 대해 대상을 평가하는 것이 제안된다.
- [0681] **비스테로이드 항염증제 및 다른 진통제**
- [0682] NSAID 및 다른 진통제의 안정한 용량의 사용이 허용된다.
- [0683] 아스피린 및 선택적 사이클로옥시게나제-2 억제제를 포함하는 NSAID, 및 다른 진통제로 치료한 대상은 연구가 수행되고 있는 국가에서 승인된 통상의 시판되는 용량을 받아야 하며, 연구 제제의 최초 투여로부터 2 주 이상 전에 안정한 용량에 있어야 한다. 제16주까지, NSAID 및 다른 진통제의 용량 및 유형은 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 변경될 수 있다. 제16주 후에, 그리고 제60주까지, 1 회 용량 감소가 허용되며; 그 외에는, NSAID 및 다른 진통제의 처방은 대상이 허용불가능한 부작용을 발생시킨 경우에만 변경될 수 있다.
- [0684] 캡사이신 및 디클로페낙을 포함하는 국소 진통제의 사용은 허용된다.
- [0685] 이러한 시험에서, 아스피린은 심혈관 또는 뇌혈관 질환에 대해 처방된 저용량 아스피린을 제외하고는 NSAID로 간주된다.
- [0686] **질환 변형 항류마티스 약물/전신 면역억제**
- [0687] MTX, SSZ, 및 HCQ를 제외한 질환-변형 항류마티스 약물/전신 면역억제제는 연구 제제의 최초 투여로부터 4 주 이상 전에 중단되어야 하며, 제60주까지 금지된다. 이들 DMARD는 클로로퀸, 금 제제, 페니실라민, 및 레플루노미드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 연구 제제의 최초 투여 전 3 개월 이내에 대상이 레플루노미드를 받은 경우, 대상은 약물 제거 절차를 받았어야 한다. 제60주까지 금지되는 전신 면역억제 약물은 사이클로스포린, 타크롤리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 및 아자티오프린을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 전신 면역억제제는 코르티코스테로이드를 지칭하지 않는다.
- [0688] **생물학적 제제, 세포독성 약물, 또는 조사 제제**
- [0689] 생물학적 제제(예를 들어, SC 골리무맙, 아나킨라, 에타네르셉트, 아달리무맙, 인플릭시맙, 알레파셉트, 에팔리주맙, 리툽시맙, 나탈리주맙), 세포독성제(예를 들어, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 질소 머스타드, 다른 알킬화제), 또는 조사 약물의 사용은 60 주의 연구 중에 허용되지 않는다. 이들 약물 중 임의의 것이 사용되는 경우, 대상은 추가의 연구 제제 주입으로부터 중단될 것이다.
- [0690] **보완 요법**

- [0691] 아유르베다 의약품, 중국 전통 약물, 또는 비의약 요법, 예컨대 침술을 포함하는 보완 요법의 사용은 60 주의 연구 중에 허용되지 않는다.
- [0692] **연구 평가**
- [0693] **효능**
- [0694] **평가**
- [0695] **배스 강직성 척추염 질환 활성 지수**
- [0696] BASDAI¹⁴는 하기 정의된다:
- [0697] 하기 기준에 대한 VAS(0 내지 10 cm)를 사용하는 대상 자가-평가:
- [0698] A. 피로
- [0699] B. 척추 통증
- [0700] C. 관절 통증
- [0701] D. 골부착부염
- [0702] E. 정성적 조조 강직
- [0703] F. 정량적 조조 강직
- [0704] $BASDAI = 0.2 (A + B + C + D + 0.5[E + F])$.
- [0705] **배스 강직성 척추염 기능 지수**
- [0706] BASFI는 10 개 문항의 평균으로서 표현되는 대상의 자가-평가(VAS; 0 내지 10 cm)이며, 이들 중 8 개는 대상의 기능적 해부학에 관한 것이고, 이들 중 2 개는 일상 생활에 대처하는 대상의 능력에 관한 것이다.⁸ 척도에 따른 증가는 악화되는 병태를 나타낸다.
- [0707] **환자의 전반적 평가**
- [0708] 환자의 질환 활성의 전반적인 평가를 VAS(0 내지 10 cm; 0 = 매우 양호, 10 = 매우 불량)로 기록할 것이다.
- [0709] **총 요통**
- [0710] 대상은 지난 주에 걸친 그들의 평균 총 요통을 VAS(0 내지 10 cm; 0 = 통증 없음, 10 = 가장 중증인 통증)로 평가할 것을 요청받을 것이다.
- [0711] **야간 요통**
- [0712] 대상은 지난 주 동안의 그들의 야간 요통을 VAS(0 내지 10 cm; 0 = 통증 없음, 10 = 가장 중증인 통증)로 평가할 것을 요청받을 것이다.
- [0713] **근골격계 평가**
- [0714] 근골격계 평가는 BASMI, 골부착부염 지수, 및 흉부 팽창의 각각의 성분을 포함할 것이다.
- [0715] 모든 근골격계 평가를 수행하기 위해, 근골격계 평가를 수행함에 있어서 적절한 훈련 및 경험을 갖는 독립적인 근골격계 평가자(IMA)가 각각의 연구 현장에서 지정될 것이다. 대상에 대한 기준선 근골격계 평가를 수행하는 동일한 IMA가 제52주까지의 모든 후속 방문시에 그 대상에 대한 근골격계 평가를 또한 수행해야 한다는 것이 강력하게 권장된다.
- [0716] 각각의 현장에서 최초 대상을 스크리닝하기 전에 스폰서는 각각의 현장의 지정된 IMA에 대한 훈련을 제공할 것이다. 백업 IMA는 대상의 연구 방문에 대한 근골격계 평가를 수행하기 전에 훈련을 완료해야 한다. 각각의 IMA의 훈련 문서는 연구 현장에서 유지되어야 한다. 가능한 경우, 연구 현장의 독립적인 평가자는 연구 중에 변경하지 않아야 한다.
- [0717] 과거 3 년 이내에 이전의 임상 연구에서 스폰서에 의해 IMA가 훈련을 받았고 이러한 훈련의 적절한 문서(인증서)가 있는 경우, 그 훈련은 본 연구에 적절한 것으로 간주될 것이나; 시험의 시작 전에 훈련을 반복

하는 것이 권고된다.

[0718] 현장에서 근골격계 평가를 수행하는 모든 IMA는 연구 현장에서 위임록 상에 열거되어야 하며, 각각의 방문시에 근거 문서에 문서화되어야 한다.

[0719] 제28주 후에는, 근골격계 평가자가 더 이상 독립적일 필요가 없다. 그러나, 연구 중에 근골격계 평가자를 변경하지 않아야 한다는 것이 권장된다.

[0720] **배스 강직성 척추염 척측 지수**

[0721] BASMI는 5 개의 성분(0 내지 10의 범위)의 총점으로서 표현되며, 표 6 에 나타낸 바와 같이 반 데르 헤이즈(van der Heijde) 계산³¹을 사용하여 계산될 것이다.

[0722] [표 6]

[0723] **BASMI_{lin}의 5 개 성분에 대해 평가(A)를 점수(S)로 전환하기 위해 제안된 방정식**

	하기의 경우에 S= 0:	0 내지 10:	하기의 경우에 S= 10:
외측 요추 굴곡*(cm)	$A \geq 21.1$	$S = (21.1 - A)/2.1$	$A \leq 0.1$
이주-대-벽 거리*(cm)	$A \leq 8$	$S = (A - 8)/3$	$A \geq 38$
요추 굴곡(변형된 쇼버(Schober))(cm)	$A \geq 7.4$	$S = (7.4 - A)/0.7$	$A \leq 0.4$
치간 거리(cm)	$A \geq 124.5$	$S = (124.5 - A)/10$	$A \leq 24.5$
경부 회전각*(°)	$A \geq 89.3$	$S = (89.3 - A)/8.5$	$A \leq 4.3$

[0724] * 외측 요추 굴곡, 이주-대-벽 거리, 및 경부 회전의 경우, 우측 및 좌측의 평균을 취해야 한다. 점수가 0 내지 10의 범위를 넘으면, 값 0 또는 10이 각각 사용되어야 한다.

[0725] BASMI_{lin}은 5 개의 S 점수의 평균이다.

[0726] 5 개 성분의 평가(A)가 현장에서 수집될 것이고, 점수(S)는 분석이 수행될 때의 평가에 기초하여 프로그램에 따라 계산될 것이다.

[0727] **강직성 척추염 반응 기준에서의 평가**

[0728] ASAS 국제 작업 그룹의 기준(ASAS 20)^{1,23,33}에 따른 반응의 20% 개선은 하기와 같이 정의된다:

[0729] 1. 하기 4 개의 도메인 중 3 개 이상에서 기준선으로부터 20% 이상의 개선 및 0 내지 10 cm 척도 상에서 기준선으로부터 1 이상의 절대 개선:

[0730] i. 환자 전반

[0731] ii. 총 요통

[0732] iii. 기능(BASFI)

[0733] iv. 염증(조조 강직에 관한 BASDAI의 마지막 2 개 문항의 평균)

[0734] 2. 잠재적인 나머지 도메인에서 기준선으로부터의 저하(20% 이상 및 0 내지 10 cm 척도 상에서 1 이상의 악화)의 부재.

[0735] ASAS 40은, 0 내지 10 cm 척도 상에서 2 이상의 절대 개선이 있고 나머지 도메인에서 저하가 없는, 4 개 도메인 중 3 개에서의 40% 이상의 개선으로서 정의된다.

[0736] ASAS 5/6은, 통증(VAS 0 내지 10 cm), 환자 전반(VAS 0 내지 10 cm), 기능(BASFI 점수), 조조 강직(BASDAI로부터), CRP, 및 척추 이동성(요추 측방 굴곡(lumbar side flexion))의 6 개 도메인 중 임의의 5 개에서의 20% 이상의 개선으로서 정의된다.

[0737] **낮은 질환 활성**

[0738] 낮은 수준의 질환 활성은 상기 기재된 4 개의 ASAS 도메인 각각에서 0 내지 10 cm의 척도 상에서 2 미만의 값으로서 정의된 "ASAS 부분 관해"에 대한 기준에 의해 측정될 것이다.

[0739] **강직성 척추염에 대한 질환 활성 점수**

[0740] 국제 척추관절염 평가 학회(ASAS)는 AS에 사용하기 위한 질환 활성 점수(DAS)인 ASDAS를 개발하였다.^{21,32} 본 연구의 경우, 하기 수학적식을 사용하여 ASDAS 점수를 계산할 것이다:

[0741] $ASDAS = 0.121 \times \text{총 요통} + 0.058 \times \text{조조 강직의 지속기간} + 0.110 \times \text{환자 전반적 평가} + 0.073 \times \text{말초 통증/종창} + 0.579 \times \ln(\text{CRP(mg/L)} + 1)$.

[0742] ASDAS의 주요 개선은 2.0 이상의 감소로서 정의된다. 비활성 질환은 1.3 미만의 ASDAS 점수로서 정의된다.

[0743] ASDAS의 임상적으로 중요한 개선은 1.1 이상의 감소로서 정의된다.²

[0744] **골부착부염 지수**

[0745] 골부착부염은 AS 및 다른 척추관절병증의 중요한 특징이다. 본 연구에서는 현재 임상 연구에 사용되는 캘리포니아 샌프란시스코 대학교(UCSF) 골부착부염 지수가 수행될 것이다.^{6,15} 열거된 골부착부의 IMA에 의한 평가는 총 골부착부염 점수의 결정을 가능하게 할 것이다(표 7).

[0746] [표 7]

[0747] **골부착부염 지수**

<u>골부착부</u>	<u>UCSF</u>
C1-2	X
C7-T1	X
T12-L1	X
좌골 결절	L/R
치골 결합	X
요추 5번 극돌기	X
장골능	L/R
대전자	L/R
대퇴골 내과	L/R
아킬레스건 삽입 (Achilles tendon insertion)	L/R
족저 삽입(Plantar insertion)	L/R
총 골부착부	17

[0748]

[0749] 골부착부는 0(압통 없음) 또는 1(압통) 중 어느 하나로서 채점된다.

[0750] **흉부 팽창**

[0751] 흉부 팽창은 최대 흡기 및 최대 호기에서 흉부의 원주 사이의 cm 단위의 차이이다. 이는 남성의 4번 늑간 공간의 수준에서, 그리고 여성의 유방 바로 아래에서 측정된다.

[0752] **36-항목 단축-양식 건강 조사**

[0753] 의료 결과 연구 건강 측정 SF-36 설문은 랜드 건강 보험 실험(Rand Health Insurance Experiment)의 일부로서 개발되었으며, 하기 8 개의 다중-항목 척도로 이루어진다:

[0754] ● 건강 문제로 인한 신체 기능의 제한;

[0755] ● 신체 건강 문제로 인한 통상의 역할 활동의 제한;

[0756] ● 육체적 통증;

- [0757]  일반적인 정신 건강(심리적 고통 및 행복감);
- [0758]  개인적 또는 정서적 문제로 인한 통상의 역할 활동의 제한;
- [0759]  신체 또는 정신 건강 문제로 인한 사회적 기능의 제한;
- [0760]  활력(에너지 및 피로);
- [0761]  일반적인 건강 지각.

[0762] 이들 척도는 0 내지 100으로 채점되며, 더 높은 점수는 더 양호한 건강을 나타낸다. 다른 알고리즘은 2 가지 개요 점수, 신체요소 개요(PCS) 및 정신요소 개요(MCS)를 산출한다. 이러한 개요 점수는 또한, 더 높은 점수가 더 양호한 건강을 나타내는 척도를 사용하지만, 일반적인 미국 인구 기준(general US population norm)에 기초하여, 50의 평균 및 10의 표준 편차로 점수를 변환하기 위해 선형 변환을 수행하는 기준-기반(norm-based) 시스템을 사용하여 채점한다.³⁵ SF-36에 의해 측정된 개념은 임의의 연령, 질환, 또는 치료군에 특이적이지 않으므로, 상이한 질환의 상대적 부담과 상이한 치료의 상대적 이익의 비교를 가능하게 한다.³⁶

[0763] **의료 결과 연구 수면 척도**

[0764] 수면 문제의 정도는 MOS-SS를 사용하여 평가할 것이다.¹⁷ MOS-SS는 개시, 유지(예를 들어, 계속적인 수면(staying asleep)), 양, 충실도, 경면(예를 들어, 졸음), 및 호흡 장애(예를 들어, 호흡 곤란, 코골이)를 포함하는 수면의 6 개 차원(dimension)을 측정한다. MOS 수면 척도는, 건강-관련 삶의 질(HRQOL) 개념- 모든 사람의 건강 상태 및 행복감에 관련되고 질환 및 치료에 의해 직접 영향을 받는 것으로 알려진 수면을 평가하는 일반적인 건강 측정치이다. 그러므로, MOS-SS는 임의의 연령, 질환, 또는 치료군에 특이적이지 않다. MOS-SS의 신뢰성 및 유효성은 신경병증성 통증 및 RA를 포함하는 다수의 질환 영역에서 평가되었다.

[0765] **강직성 척추염 삶의 질(ASQoL) 설문**

[0766] 강직성 척추염 삶의 질은 자가-투여 환자-보고 결과 매체이다.¹² 그것은 수면, 기분, 동기, 대처 능력, 일상 생활의 활동, 독립성, 관계, 및 사회 생활에 대한 통증의 영향에 관련된 문항에 대한 예 또는 아니오 응답을 요청하는 18 개의 항목으로 이루어진다. 각각의 항목에 대한 "예"의 응답에 1의 점수가 주어지며, 모든 항목 점수를 0 내지 18의 범위를 갖는 총 점수로 합산한다. 더 높은 점수는 더 나쁜 건강 관련 삶의 질을 나타낸다. 대상은 4 분 미만 내에 매체를 완료할 수 있다.

[0767] **EQ-5D 설문**

[0768] EuroQoL-5D(EQ-5D)는 임상적 및 경제적 평가에 대한 건강의 단순하고 일반적인 척도를 제공하기 위해 EuroQoL 그룹에 의해 개발된 건강 상태의 표준화된 척도이다(문헌[EuroQoL Group, 1990]).¹³ EQ-5D는 광범위한 건강 상태 및 치료에 적용가능하다. EQ-5D는 본질적으로 2 개의 요소로 이루어진다: EQ-5D 서술형 시스템 및 EQ 시각상사 척도(EQ VAS). EQ-5D 서술형 시스템은 하기 5 개의 차원을 포함한다: 이동성, 자가-관리, 통상의 활동, 통증/불편, 및 불안/우울. 각각의 차원은 5 개의 수준을 갖는다: 문제없음, 경미한 문제, 중등도의 문제, 중증의 문제, 및 극도의 문제. 응답자는 5 개의 차원 각각에서 가장 적절한 서술에 대해 박스 내에 체크 표시함으로써(또는 십자 표시함) 그의/그녀의 건강 상태를 표시하도록 요청받는다. 이러한 결정은 그 차원에 대해 선택된 수준을 표현하는 1-숫자 번호를 생성한다. 5 개의 차원에 대한 숫자들은 응답자의 건강 상태를 기재하는 5-숫자 번호로 조합될 수 있으며, 이는 각각의 차원에서 수준들 각각에 값(가중치로도 칭함)을 부여하는 수학적식을 적용함으로써 단일 요약 지수(EQ-5D 지수)로 전환될 수 있다. EQ VAS는 수직선, VAS 상에 응답자의 자가-등급화 건강을 기록하며, 여기서 종점들은 '최상의 가상 건강 상태' 및 '최악의 가상 건강 상태'로 표시된다. EQ VAS는 개별 응답자에 의해 판단되는 바와 같은 건강 결과의 정량적 측정치로서 사용될 수 있다.

[0769] **종점**

[0770] **1차 종점**

[0771] 본 연구의 1차 종점은 제16주에 ASAS 20 반응을 달성하는 대상의 비율이다.

[0772] 제16주에 ASAS 20을 갖는 대상의 비율이 위약군과 비교하여 콜리무맙군에서 통계적으로 유의하게 더 큰 것으로

입증된다면, 연구는 양성으로 간주될 것이다.

[0773] 주요 2차 종점

[0774] 하기 주요 2 차 종점은 하기 특정된 바와 같은 중요도 순서로 열거되어 있다:

- [0775] 1. 제16주에 ASAS 40 반응을 달성하는 대상의 비율.
- [0776] 2. 제16주에 BASDAI의 기준선으로부터 50% 이상의 개선을 달성하는 대상의 비율.
- [0777] 3. 제16주에 BASFI의 기준선으로부터의 변화.

[0778] 다른 2 차 종점

[0779] 제어된 2 차 종점(다중성에 대한 유형 I 오차율의 제어를 가짐)

[0780] 1차 및 주요 2 차 종점에 더하여 하기 제어된 2 차 종점을 분석할 것이며, 이는 하기 특정된 바와 같은 중요도 순서로 열거되어 있다:

- [0781] 1. 제16주에 SF-36 PCS의 기준선으로부터의 변화.
- [0782] 2. 제16주에 SF-36 MCS의 기준선으로부터의 변화.
- [0783] 3. 제16주에 낮은 수준의 질환 활성(ASAS 부분 관해)을 달성하는 대상의 비율.
- [0784] 4. 제16주에 ASQoL의 기준선으로부터의 변화.
- [0785] 5. 제16주에 BASMI의 기준선으로부터의 변화.

[0786] 다중성을 제어하기 위해, 1차 및 모든 주요 2 차 종점이 통계적 유의성을 달성하는 경우에만 상기 종점을 상기 순서에 따라 순차적으로 시험할 것이다.

[0787] 다른 2 차 종점은 하기를 포함한다

[0788] 1차, 주요 2 차, 및 제어된 2차 종점에 더하여, 하기 종점을 평가할 것이다:

- [0789] 1. 제2주에 ASAS 20 반응을 달성하는 대상의 비율.
- [0790] 2. 시간 경과에 따라 ASAS 20 반응 및 ASAS 40 반응을 달성하는 대상의 비율.
- [0791] 3. 시간 경과에 따라 낮은 질환 활성(ASAS 부분 관해)을 달성하는 대상의 비율.
- [0792] 4. 시간 경과에 따른 BASFI의 기준선으로부터의 변화.
- [0793] 5. 시간 경과에 따른 BASMI의 기준선으로부터의 변화.
- [0794] 6. 시간 경과에 따른 SF-36의 PCS 및 MCS 점수의 기준선으로부터의 변화.
- [0795] 7. 시간 경과에 따라 3 미만의 BASDAI 점수를 달성하는 대상의 비율.
- [0796] 8. 시간 경과에 따른 ASDAS의 기준선으로부터의 변화.
- [0797] 9. 시간 경과에 따라 ASDAS 주요 개선(2.0 이상의 감소)을 달성하는 대상의 비율.
- [0798] 10. 시간 경과에 따라 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성하는 대상의 비율.
- [0799] 11. 기준선에서 골부착부염을 갖는 대상에서 시간 경과에 따른 골부착부염 점수의 기준선으로부터의 변화.
- [0800] 12. 시간 경과에 따른 ASQoL 점수의 기준선으로부터의 변화.

[0801] 대상 완료/탈퇴

[0802] 완료

[0803] 대상은 그 또는 그녀가 연구의 제60주에 평가를 완료했다면 연구를 완료한 것으로 간주될 것이다. 임의의 이유로 연구 치료를 조기에 중단한 대상은 연구를 완료한 것으로 간주되지 않을 것이다.

[0804] 연구로부터의 탈퇴

[0805] 대상은 하기 이유 중 임의의 이유로 연구로부터 탈퇴할 것이다:

- [0806] ● 추적조사 불응
- [0807] ● 동의 철회
- [0808] ● 사망
- [0809] 대상이 추적조사에 불응할 경우, 연구 현장 인사는 대상과 접촉하고 중단/탈퇴의 이유를 결정하기 위해 모든 합리적인 노력을 실행해야 한다. 추적조사하기 위해 취해진 조치는 문서화되어야 한다.
- [0810] 대상이 연구를 완료하기 전에 탈퇴하는 경우, 탈퇴의 이유는 eCRF 및 근거 문서에 문서화되어야 한다. 탈퇴한 대상에게 배정된 연구 약물은 다른 대상에게 배정되지 않을 수 있다. 탈퇴한 대상은 대체되지 않을 것이다. 대상이 치료의 종료 전에 연구 제제 투여로부터 중단되는 경우, 치료후 평가가 얻어져야 한다.
- [0811] **주 연구에 잔류하는 동안 임의의 연구 샘플 수집 참여의 철회**
- [0812] 대상은 연구에 잔류하는 동안 임의의 연구 샘플에 대한 동의를 철회할 수 있다. 그러한 경우에, 임의의 연구 샘플은 파괴될 것이다. 샘플 파괴 과정은 상기 기재된 바와 같이 진행될 것이다.
- [0813] **향후 연구에서의 샘플 사용의 철회**
- [0814] 대상은 연구용 샘플의 사용에 대한 동의를 철회할 수 있다. 그러한 경우에, 샘플은 그들이 임상 연구에 더 이상 필요하지 않게 된 후에 파괴될 것이다. 연구용 샘플 보유의 상세 사항은 주요 ICF 및 임의의 연구 샘플에 대한 별도의 ICF에 제시된다.
- [0815] **통계적 방법**
- [0816] 대부분의 데이터를 요약하기 위해 단순 서술형 요약 통계(Simple descriptive summary statistics), 예컨대 연속 변수에 대한 n, 평균, SD, 중앙값, IQ 범위, 최소, 및 최대, 및 이산 변수에 대한 계수 및 백분율을 사용할 것이다.
- [0817] 달리 언급되지 않는 한, 항-TNF α 요법의 이전의 사용에 의해 계층화된 코크란-멘텔-헨젤(CMH) 검정을 사용하여 치료에 반응하는 대상의 비율과 같은 카테고리 변수를 비교할 것이다. 달리 언급되지 않는 한, 일반적으로, 연속 변수를 분석하기 위해 인자로서 항-TNF α 요법의 이전의 사용을 갖는 ANOVA가 사용될 것이다. 모든 통계적 시험은 $\alpha = 0.05$ (양측)에서 수행될 것이다. 통계적 분석에 더하여, 데이터를 요약/제시하기 위해 도해적 데이터 디스플레이(예를 들어, 라인 플롯) 및 대상 목록이 또한 사용될 수 있다.
- [0818] 효능 분석 및 대상 정보의 요약은 처리 의향 집단(즉, 모든 무작위 배정된 대상)에 기초할 것이다. 효능 분석에 포함된 대상은 그들이 배정된 치료를 받는지 여부에 무관하게 그들의 배정된 치료군에 따라 요약될 것이다.
- [0819] 안전성 및 PK 분석은 연구 치료 중 하나 이상의 투여를 받은 모든 대상을 포함할 것이다.
- [0820] **효능 분석**
- [0821] **1차 종점 분석**
- [0822] 본 연구의 1차 종점은 제16주에 ASAS 20 반응을 달성하는 대상의 비율이다.
- [0823] 1 차 목적을 다루기 위하여, 0.05의 유의성 수준(양측)에서 항-TNF α 요법의 이전의 사용(예 또는 아니오)에 의해 계층화된 CMH 시험을 사용하여, 제16주에 ASAS 20 반응을 달성하는 대상의 비율을 위약군과 골리무맙군 사이에서 비교할 것이다.
- [0824] 이러한 1 차 효능 분석에서, 모든 무작위 배정된 대상으로부터의 데이터는 그들이 받은 실제 치료에 무관하게 그들의 배정된 치료군에 따라 분석될 것이다. 대상이 제16주에 1 개 이상의 ASAS 성분에 대한 데이터를 갖는 경우, 정방향으로 실행된 최종 관찰(LOCF) 절차를 사용하여 누락된 ASAS 성분을 귀속시킬 것이다. 대상이 제16주에 모든 ASAS 성분에 대한 데이터를 갖지 않는 경우, 대상은 무반응자로 간주될 것이다. 또한, 치료 실패 규칙이 적용될 것이다.
- [0825] 또한, 인구통계학적 특징, 기준선 질환 특징, 및 기준선 약물에 의한 1차 효능 종점에서의 일관성을 평가하기 위해 하위군 분석이 수행될 것이다. 적절한 경우, 하위군과 치료군 사이의 상호작용 시험이 또한 제공될 것이다.

- [0826] **주요 2차 분석**
- [0827] 하기 주요 2차 분석을 하기 특정된 바와 같은 중요도 순서로 수행할 것이다:
- [0828] 1. 제16주에 ASAS 40을 달성하는 대상의 비율을 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0829] 2. 제16주에 BASDAI의 기준선으로부터 50% 이상의 개선을 달성하는 대상의 비율을 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0830] 3. 제16주에 BASFI의 기준선으로부터의 변화를 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0831] 단지 2 개의 치료군(1 개의 통계적 비교)이 있으므로, 각각의 효능 종점 내에서 다중성에 대해 조정할 필요가 없다.
- [0832] 다중성에 대한 유형 I 오차율을 제어하기 위해, 1차 종점이 0.05 수준의 유의성(양측)에서 통계적 유의성을 달성한 경우에만 최초 주요 2차 종점을 시험할 것이다. 1차 종점 및 이전의 주요 2차 종점(들)이 0.05 수준의 유의성(양측)에서 통계적으로 유의한 경우에만 후속 주요 2 차 종점을 시험할 것이다.
- [0833] **다른 계획된 효능 분석**
- [0834] **제어된 2차 종점(다중성에 대한 유형 I 오차율의 제어를 가짐).**
- [0835] 1차 및 주요 2차 분석에 더하여 하기 효능 분석을 수행할 것이다:
- [0836] 1. 제16주에 SF-36 PCS의 기준선으로부터의 변화를 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0837] 2. 제16주에 SF-36 MCS의 기준선으로부터의 변화를 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0838] 3. 제16주에 낮은 수준의 질환 활성(ASAS 부분 관해)을 달성하는 대상의 비율을 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0839] 4. 제16주에 ASQoL의 기준선으로부터의 변화를 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0840] 5. 제16주에 BASMI의 기준선으로부터의 변화를 요약하고 치료군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0841] 다중성을 제어하기 위해, 모든 1차 및 주요 2 차 종점이 통계적 유의성을 달성한 경우에만 상기 분석을 상기 순서에 따라 순차적으로 수행할 것이다. 그 외에는, 공칭 p-값이 제공될 것이다.
- [0842] **다른 2 차 종점은 하기를 포함한다**
- [0843] 하기 종점은 치료군에 의해 요약될 것이다. 종점의 방문이 특정되지 않는 경우, 요약은 제52주까지 시간 경과에 따를 것이다. 제16주 및 그 전의 방문시에 치료군들 사이의 비교가 실행될 것이다.
- [0844] 1. 제2주에 ASAS 20 반응을 달성하는 대상의 비율을 치료군에 의해 요약하고 군들 사이에서 비교할 것이다.
- [0845] 2. ASAS 20 반응 및 ASAS 40 반응을 달성하는 대상의 비율.
- [0846] 3. 낮은 질환 활성(ASAS 부분 관해)을 달성하는 대상의 비율.
- [0847] 4. BASFI의 기준선에서의 변화.
- [0848] 5. BASMI의 기준선으로부터의 변화.
- [0849] 6. SF-36의 PCS 및 MCS 점수의 기준선으로부터의 변화.
- [0850] 7. 3 미만의 BASDAI 점수를 달성하는 대상의 비율.
- [0851] 8. ASDAS의 기준선으로부터의 변화.
- [0852] 9. ASDAS 주요 개선(2.0 이상의 감소)을 달성하는 대상의 비율.
- [0853] 10. ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성하는 대상의 비율.
- [0854] 11. 기준선에서 골부착부염을 갖는 대상에서 골부착부염 점수의 기준선으로부터의 변화.
- [0855] 12. ASQoL 점수의 기준선으로부터의 변화.
- [0856] **종점에 대한 기준**

- [0857] 제16주에 ASAS 20을 갖는 대상의 비율이 위약군과 비교하여 골리무맙군에서 통계적으로 유의하게 더 큰 것으로 입증된다면, 연구는 양성으로 간주될 것이다.
- [0858] **연구 약물 정보**
- [0859] **연구 약물의 물리적 설명**
- [0860] **골리무맙**
- [0861] IV 투여용 50 mg 골리무맙 최종 바이알 제품(FVP)은 4 mL 유형 I 유리 바이알 내에 CNT0 148 IgG를 함유하는 일회용 멸균 용액으로서 공급된다. 각각의 바이알은 pH 5.5에서 히스티딘, 소르비톨, 및 폴리소르베이트 80의 수성 매질 중에 12.5 mg/mL 골리무맙 용액 4 mL를 함유한다. 방부제는 존재하지 않는다.
- [0862] **위약**
- [0863] 생리 식염수는 일회용 주입 백 내의 IV 주입용 멸균 액체로서 공급될 것이다. 방부제는 존재하지 않는다.
- [0864] **제조, 취급, 및 저장**
- [0865] 연구 현장에서, 골리무맙 용액의 바이알은 냉동시키지 않고 차광하여 2°C 내지 8°C (35.6 °F 내지 46.4 °F)에서 안전한 냉장고에 저장해야 한다. 제품의 격렬한 진탕을 피해야 한다. 투여 전에 제품을 미립자 물질 및 변색에 대해 시각적으로 검사해야 한다. 변색, 가시적 입자, 또는 다른 외래 입자가 용액 중에서 관찰되는 경우, 제품을 사용해서는 안 된다.
- [0866] 유리 바이알 내의 연구 제제를 사용할 준비를 할 것이다. 연구 제제 IV 주입은 비맹검 약사 또는 다른 적절하게 허가되고 인가된 인사에 의해 대상의 체중에 따라 제조될 것이다. 약사 또는 다른 적절하게 허가되고 인가된 인사는 적절한 수의 바이알을 사용하여 필요한 부피의 연구 제제를 제조할 것이다.
- [0867] 연구 재료의 제조 및 투여 중에 무균적 절차가 사용되어야 한다. 제조 및 투여 중에 직사 일광에 대한 노출을 피해야 한다.
- [0868] **결과 및 결론**
- [0869] **활성 강직성 척추염을 갖는 성인 환자에서 정맥내 골리무맙의 안전성 및 효능에 대한 제28주까지의 결과:**
- [0870] **서론:**
- [0871] GO-ALIVE는 활성 AS를 갖는 성인 환자에서 IV 골리무맙의 안전성 및 효능을 평가하도록 설계된 3 상 다기관 무작위 이중-맹검 위약-대조 시험이다. 환자(연령 18 세 이상)는 명확한 AS의 진단(수정된 뉴욕 기준에 따라) 및 4 이상의 BASDAI, 4 이상의 총 요통 시각 상사 척도, 및 0.3 mg/dL 이상의 CRP를 가졌다. 환자를 제0주(wk), 제4주, 및 매 8 주마다의 IV 골리무맙 2 mg/kg, 또는 제16주에 골리무맙으로 전환되는 제0주, 제4주, 및 제12주에서의 위약에 무작위 배정하였다(1:1). 환자의 최대 20%가 이전의 항-TNF 제제(골리무맙 이외의)를 가졌을 수 있었고, 환자의 최대 10%가 척추의 완전한 강직을 가질 수 있었다. 일차 종점은 제16주에서의 ASAS20이었다. 주요 2차 종점은 ASAS40, BASDAI50, 및 제16주에서의 BASFI 점수의 변화였다. 다른 통계적으로 제어된 평가는 BASMI, ASAS 부분 관해, SF-36 PCS/MCS, 및 ASQoL이었다. 환자를 유해 사례에 대해 모니터링하였으며, 제28주까지의 데이터가 본 명세서에 보고되어 있다. 모든 연구자들 및 일부 스폰서 인사는 연구 종료(제60주)까지 치료군 배정에 대해 맹검을 유지할 것이며; 따라서, 개별 환자에 대한 치료군 배정은 본 명세서에 보고되지 않는다.
- [0872] **결과:**
- [0873] 208 명의 환자가 무작위 배정되고 연구 제제를 받았다(위약: 103 명; 골리무맙: 105 명). 기준선 인구통계학 및 질환 특징은 치료군들 사이에서 유사하였다. 환자의 78%는 남성이었고, 평균 연령은 39 세였으며; 평균 질환 지속시간은 5.5 년이었고, 89.9%는 HLA-B27 양성이었으며, 5.8%는 척추의 완전한 강직을 가졌고, 14.4%는 이전의 항-TNF를 사용하였다. 제16주에, 위약에 비해 유의하게 더 큰 비율의 골리무맙 환자가 ASAS20(73.3% 대 26.2%), ASAS40(47.6% 대 8.7%), 및 BASDAI 50(41.0% 대 14.6%) 반응을 가졌다(모두 $p < 0.001$; 표). BASFI의 감소 또한 골리무맙에 의해 유의하게 더 컸다. 제16주에 위약에 비해 골리무맙군에서 SF-36 PCS/MCS 및 ASQoL의 개선이 유의하게 더 컸다. ASAS20은 제2주에 이미 위약보다 골리무맙에 의해 유의하게 더 높았다(37.1% 대 19.4%; $p = 0.005$). 골리무맙 군에서의 반응은 제28주까지 유지되었다. 제16주에 골리무맙으로 전환된 위약 환자는 제20주에 임상 반응의 개선을 가졌으며, 이는 제28주까지 유지되었다. 제16주까지, 위약 환자의 23.3% 및

콜리무맙 환자의 32.4%가 1 개 이상의 AE를 가졌다. 감염은 가장 일반적인 AE였다(위약, 7.8%; 콜리무맙, 11.4%). 제28주까지, 모든 콜리무맙-치료 환자의 34.8%가 1 개 이상의 AE를 가졌으며; 비인두염(5.4%)이 가장 일반적이었다. 2 명의 환자(1.0%)가 SAE를 가졌다(체장염, n= 1; 폐렴, n= 1). 제28주까지 기회 감염, 악성 종양, 또는 사망이 없었으며 주입 반응률이 낮았다(1.4%). 3 명의 환자가 4 개의 반응을 가졌으며; 심각하거나 중증인 것은 없었다.

[0874] 결론:

IV 콜리무맙 2 mg/kg은 위약과 비교하여 AS의 징후 및 증상을 감소시킴에 있어서 효과적이었다. 콜리무맙은 제 28주까지 잘 용인되었고, 안전성 프로파일은 SC 콜리무맙을 포함하는 다른 항-TNF와 일치하였다.

[표 8]

[0877] 임상 반응

제 16 주에서의 효능		
	위약	콜리무맙 2 mg/kg
무작위 배정된 환자, n	103	105
임상 효능		
ASAS20, n(%)	27(26.2%)	77(73.3%)**
ASAS40, n(%)	9(8.7%)	50(47.6%)**
BASDAI 50, n(%)	15(14.6%)	43(41.0%)**
BASFI의 기준선으로부터의 변화		
n	98	105
평균(SD)	-0.5(2.0)	-2.4(2.1)**
ASAS 부분 관해, n(%)	4(3.9%)	17(16.2%)*
BASMI의 기준선으로부터의 변화(선형)		
n	96	100
평균(SD)	-0.1(0.5)	-0.4(0.6)**
건강 관련 삶의 질		
SF-36 PCS 점수의 기준선으로부터의 변화		
n	98	104
평균(SD)	2.9(6.2)	8.5(7.5)**
SF-36 MCS 점수의 기준선으로부터의 변화		
n	98	104
평균(SD)	0.8(10.0)	6.5(9.1)**
ASQoL의 기준선으로부터의 변화		
n	98	104
평균(SD)	-1.8(4.6)	-5.4(5.0)**
* p < 0.01; **p ≤ 0.001		
ASAS20/40, 강직성 척추염 평가(ASAS) 국제 작업 그룹 기준의 20%/40% 이상의 개선; ASQoL, 강직성 척추염 삶의 질; BASDAI, 베스 강직성 척추염 질환 활성 지수; BASFI, 베스 강직성 척추염 기능 지수; BASMI, 베스 강직성 척추염 계측 지수; SD, 표준 편차; SF-36 PCS/MCS, 36-항목 단축-양식 건강 조사 신체/정신 요소 개요		

[표 9]

[0880] 제28주까지 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 달성한 대상의 수; 전체 분석 세트

	위약	폴리무답 2 mg/kg
분석 세트: 전체 분석 세트	103	105
제 2 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	0	10(9.5%)
% 차이(95% CI) ^b		9.6(3.93, 15.19)
p-값 ^c		0.001
제 4 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	0	15(14.3%)
% 차이(95% CI) ^b		14.3(7.60, 21.00)
p-값 ^c		<0.001
제 8 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	3(2.9%)	22(21.0%)
% 차이(95% CI) ^b		18.1(9.66, 26.51)
p-값 ^c		<0.001
제 12 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	1(1.0%)	20(19.0%)
% 차이(95% CI) ^b		18.1(10.34, 25.83)
p-값 ^c		<0.001
제 16 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	3(2.9%)	29(27.6%)
% 차이(95% CI) ^b		24.8(15.62, 33.90)
p-값 ^c		<0.001
제 20 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	29(28.2%)	30(28.6%)
제 28 주에 ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)에 대해 평가가능한 대상 ^a	103	105
ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)을 갖는 대상	24(23.3%)	31(29.5%)
^a ASDAS 비활성 질환(1.3 미만)은 치료 실패(제 16 주까지만), 및 누락된 데이터에 대한 LOCF 를 사용하여 귀속시킨 데이터에 기초한다.		
^b 신뢰 구간은 이전의 항-TNF 요법(예, 아니오)에 대한 왈드 통계 제어에 기초한다.		
^c p-값은 이전의 항-TNF 요법(예, 아니오)에 대한 CMH 시험 제어에 기초한다.		

[0881]

[0882] 참고문헌 - 실시예 9

- [0883] 1. Anderson JJ, Baron G, van der Heijde D, Felson DT, Dougados M. Ankylosing spondylitis assessment group preliminary definition of short-term improvement in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 2001;44(8):1876-1886.
- [0884] 2. Assessment of SpondyloArthritis. Ankylosing spondylitis disease activity score. Available at: <http://www.asasgroup.org/research.php?id=01>. Accessed on 17 April 2014.
- [0885] 3. Brandt J, Haibel H, Cornely D, et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. Arthritis Rheum. 2000;43(6):1346-1352.
- [0886] 4. Brandt J, Khariousov A, Listing J, et al. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 2003;48(6):1667-1675.
- [0887] 5. Braun J, Bollow M, Neure L, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis.

Arthritis Rheum. 1995;38(4):499-505.

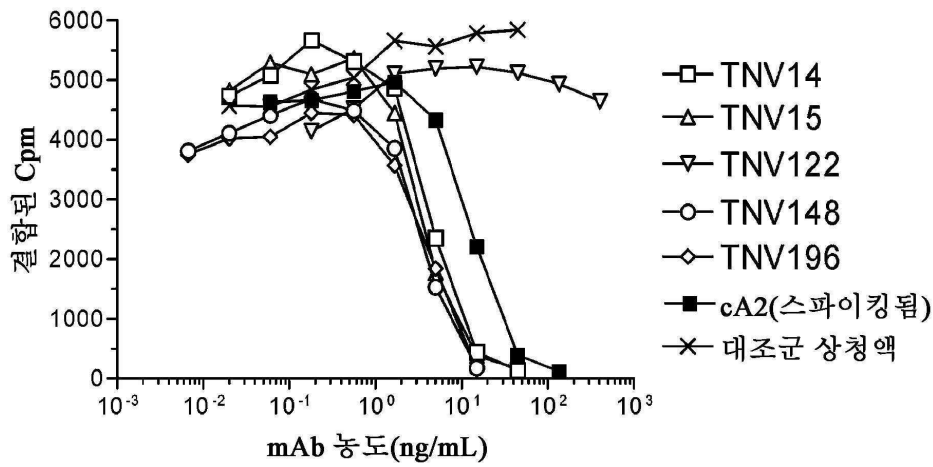
- [0888] 6. Braun J, Brandt J, Listing J, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002;359(9313):1187-1193.
- [0889] 7. Breban M, Vignon, E, Claudepierre, P, et al. Efficacy of infliximab in refractory ankylosing spondylitis: results of a six-month open-label study. *Rheumatology*. 2002;4:1280-1285.
- [0890] 8. Calin A, Garrett S, Whitelock H, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol*. 1994;21(12):2281-2285.
- [0891] 9. Canete JD, Llena J, Collado A, et al. Comparative cytokine gene expression in synovial tissue of early rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Br J Rheumatol*. 1997;36(1):38-42.
- [0892] 10. Clegg DO, Reda DJ, Weisman MH, et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of ankylosing spondylitis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum*. 1996;39(12):2004-2012.
- [0893] 11. Davis JC, van der Heijde D, Braun J, et al. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis. A randomized controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3230-3236.
- [0894] 12. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, et.al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(1):20-26.
- [0895] 13. EuroQol Group. EuroQol - a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy*. 1990;16:199-208.
- [0896] 14. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol*. 1994;21(12):2286-2291.
- [0897] 15. Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor α . *N Engl J Med*. 2002;346(18):1349-1356.
- [0898] 16. Gratacos J, Collado A, Filella X, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol*. 1994;33(10):927-931.
- [0899] 17. Hays RD, Martin SA, Sesti AM, Spritzer KL. Psychometric properties of the Medical Outcomes Study Sleep measure. *Sleep Med*. 2005;6(1):41-44.
- [0900] 18. Inman RD, Davis JC Jr, Heijde Dv, et.al. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3402.
- [0901] 19. Landewé R, Braun J, Deodhar A, et.al. Efficacy of certolizumab pegol on signs and symptoms of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis: 24-week results of a double-blind randomised placebocontrolled Phase 3 study. *Ann Rheum Dis*. 2013;0:1-9.
- [0902] 20. Lange U, Teichmann J, Stracke H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. *Eur J Med Res*. 2000;5(12):507-511.
- [0903] 21. Machado P, Landewé R, Lie E, et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cutoff values for disease activity states and improvement scores for the Assessment of SpondyloArthritis international Society. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:47-53.
- [0904] 22. Reveille JD. Epidemiology of spondyloarthritis in North America. *Am J Med Sci*. 2011;341(4):284-

286.

- [0905] 23. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):ii1-ii44.
- [0906] 24. Stone M, Salonen D, Lax M, Payne U, Lapp V, Inman R. Clinical and imaging correlates of response to treatment with infliximab in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1605-1614.
- [0907] 25. Temekonidis TI, Alamanos Y, Nikas SN, et al. Infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis: an open label 12 month study. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(12):1218-1220.
- [0908] 26. Toussiot E, Lafforgue P, Boucraut J, et al. Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. *Rheumatol Int.* 1994;13(5):175-180.
- [0909] 27. Van den Bosch F, Kruithof E, Baeten D, et al. Effects of a loading dose regimen of three infusions of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (infliximab) in spondyloarthropathy: an open pilot study. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(6):428-433.
- [0910] 28. Van den Bosch F, Kruithof E, Baeten D, et al. Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor α (infliximab) versus placebo in active spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(3):755-765.
- [0911] 29. van der Heijde D, Dijkmans B, Geusens P, et al. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum.* 2005a;52(2):582- 591.
- [0912] 30. van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, et.al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54(7):2136-2146.
- [0913] 31. van der Heijde D, Landewé R, Feldtkeller E. Proposal of a linear definition of the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) and comparison with the 2-step and 10-step definitions. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:489-493.
- [0914] 32. van der Heijde D, Lie E, Kvien T K, et al. A highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis: For the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1811-1818.
- [0915] 33. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Assessment of SpondyloArthritis international Society, et al. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):905-908
- [0916] 34. van der Linden S, van der Heijde D. Ankylosing Spondylitis. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, ed. *Kelley's Textbook of Rheumatology.* 6th ed, 2001;1039-1053.
- [0917] 35. Ware JE, Kosinski M, Keller SD. Interpretation: Norm-Based. In: *SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual.* Boston, MA: The Health Institute; 1994:8:1-8:42.
- [0918] 36. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36 item short form health survey (SF 36), I. Conceptual framework and item selection. *Med Care.* 1992;30(6):473 483.

도면

도면1



도면2a

TNVs ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGA

생식세포계열 Q V Q L V E S G G G V
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG
TNVs GGTGTCCAGTGT.....
TNV148 (B) GGTGTCCAGTGT.....A.....

생식세포계열 V Q P G R S L R L S C A A S G
GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGA
TNVs

생식세포계열 F T F S S Y A M H W V R Q A P
TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
TNV14, 15
TNV148 (B)T.....
TNV196C.....

생식세포계열 G K G L E W V A V I S Y D G S
GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
TNV14A....C.T.....T
TNV15T.....T.....T
TNV148 (B)C.....T....G.....
TNV196T.....

생식세포계열 N K Y Y A D S V K G R F T I S
AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCC
TNV14 .GC...A.G.....G.....A.....
TNV15 ..C...A.G.....C.....
TNV148 (B)A.G.....
TNV196A.G.C.....G.....

도면2b

	R D N S K N T L Y L Q M N S L
생식세포계열	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV14	
TNV15	G.....
TNV148	C.....
TNV148B	
TNV196	T.....

	R A E D T A V Y Y C A R
생식세포계열	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV14, 15	GATCGAGGT
TNV148 (B)	A
TNV196	T.....

	<u>Y Y Y Y Y G M D V W</u>
생식세포계열	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
생식세포계열	GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
TNV14	..C.....
TNV15	..C.....
TNV148 (B)	..C.....
TNV196	..C..G.....

도면3

TNVs	<u>ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC</u>
	E I V L T Q S P A T
생식세포계열	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC
TNVs	CCAGATACCACCGGA.....
	L S L S P G E R A T L S C <u>R A</u>
생식세포계열	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
TNVs	
	<u>S Q S V S S Y L A</u> W Y Q Q K P
생식세포계열	AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV14, 15	
TNV148, 196	TA.....
	G Q A P R L L I Y <u>D A S N R A</u>
생식세포계열	GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
TNVs	
	<u>T</u> G I P A R F S G S G S G T D
생식세포계열	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TNVs	
	F T L T I S S L E P E D F A V
생식세포계열	TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTCAGTT
TNVs	
	Y Y C <u>Q Q R S N W P P F T</u> F G
생식세포계열	TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC
TNVs	A.....
	P G T K V D I K R
생식세포계열	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
TNVs	

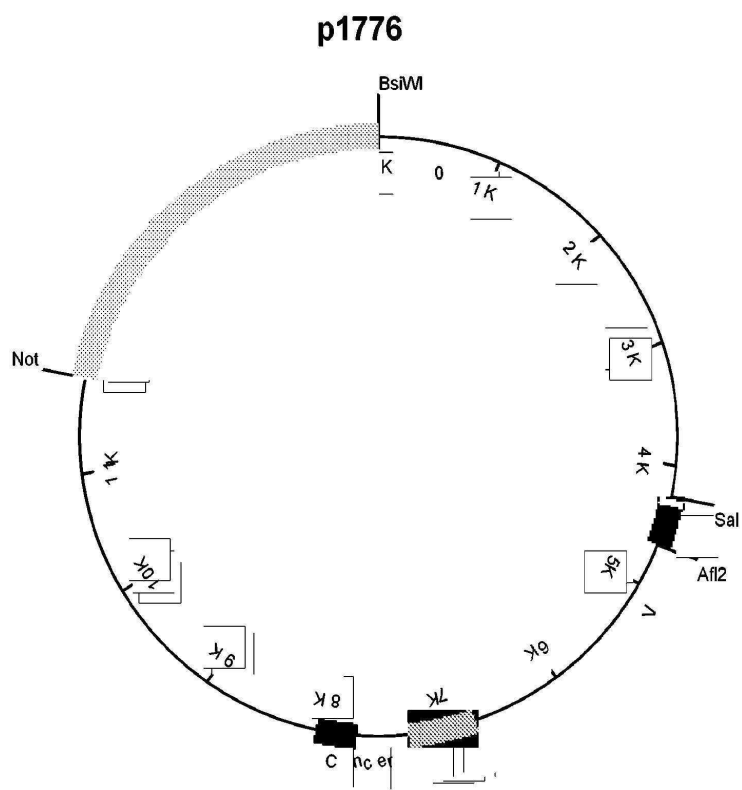
도면4

생식세포계열 TNVs	<u>MGFGLSWFLVALLRGVQC</u>	신호	서열 번호 32
생식세포계열 TNVs TNV148 (B)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSI..	FR1	서열 번호 7
생식세포계열 TNVs	SYAMH	CDR1	서열 번호 1
생식세포계열 TNVs TNV148 (B)	WVRQAPGKGLEWVAN.....	FR2	서열 번호 7
생식세포계열 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	VISYDGSNKYYADSVKG I.L....S.K.....D F.L.....K..... FM.....K..... F.....KS.....	CDR2	서열 번호 2
생식세포계열 TNV14 TNV15 TNV148 TNV148B TNV196	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA.....P.....V.....F.....F....	FR3	서열 번호 7
생식세포계열 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	-----YYYYYGMDV DRGISAGGN..... ...V....N..... ...A...N..... ...G...N.....	CDR3	서열 번호 3
생식세포계열 TNVs	WGQGT TTVTVSS	J6	서열 번호 7

도면5

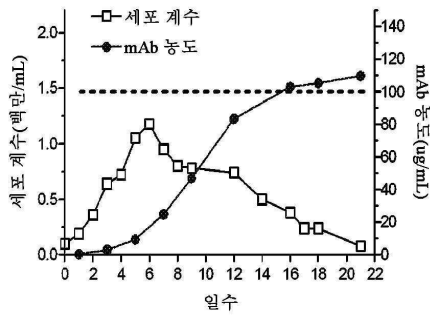
TNVs	MEAPQLLFLLLLWLPDTTG	신호	서열 번호 33
생식세포계열 TNVs	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1	서열 번호 8
생식세포계열 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	RASQSVSSYLAY.....Y.....	CDR1	서열 번호 4
생식세포계열 TNVs	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2	서열 번호 8
생식세포계열 TNVs	DASNRAT	CDR2	서열 번호 5
생식세포계열 TNVs	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC	FR3	서열 번호 8
생식세포계열 TNVs	QQRSNWPPFT	CDR3	서열 번호 6
생식세포계열 TNVs	FGPGTKVDIK	J3	서열 번호 8

도면6

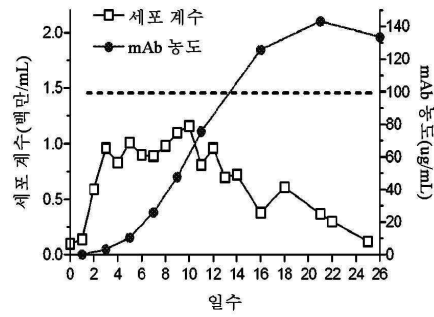


도면7

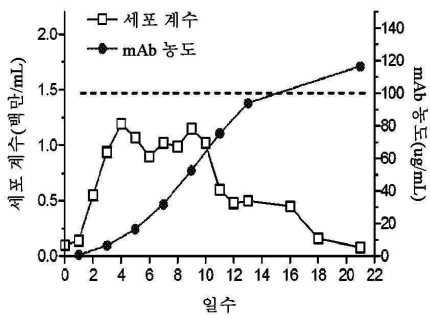
2.320-17-36 = C466A (653)



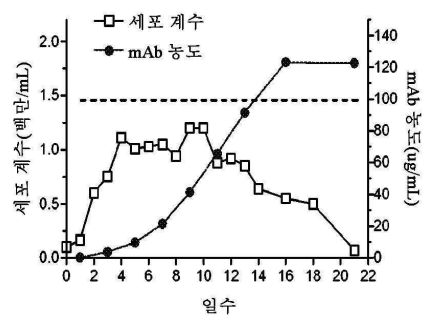
2.230-20-111 = C466B (653)



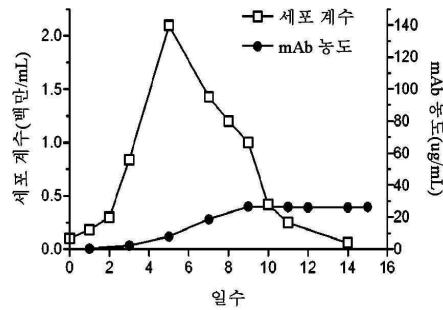
2.230-17-4 = C466C (653)



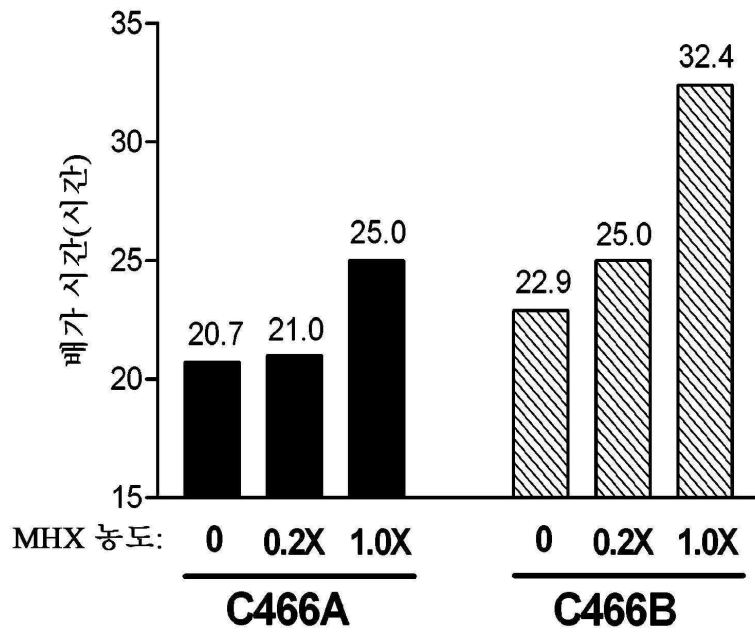
2.320-20-99 = C466D (653)



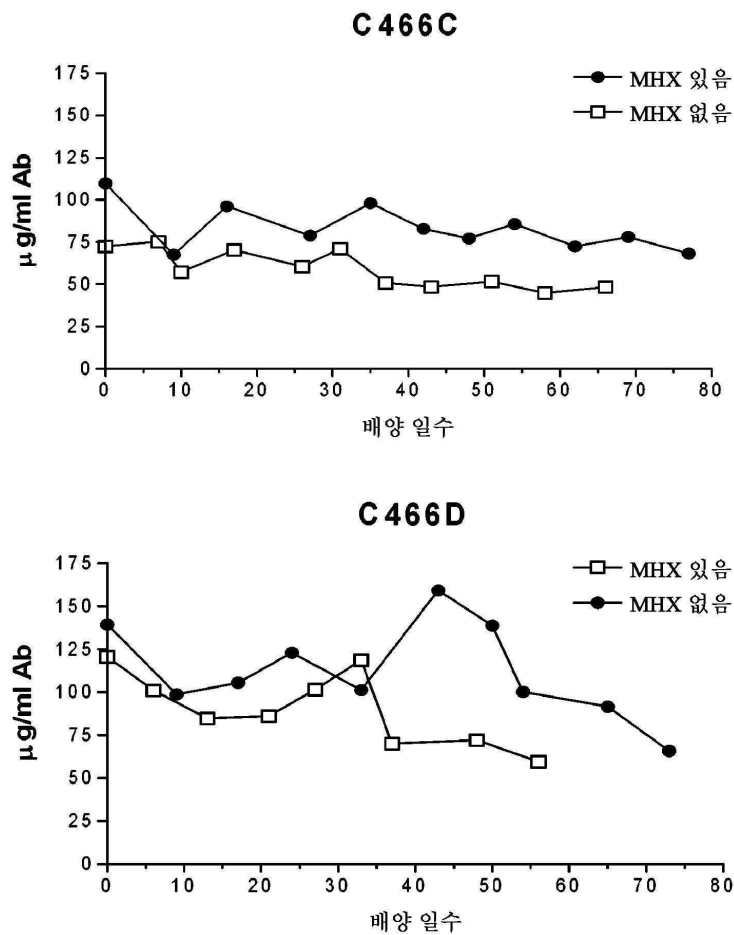
1.73-12-122 = C467A (SP2/0)



도면8

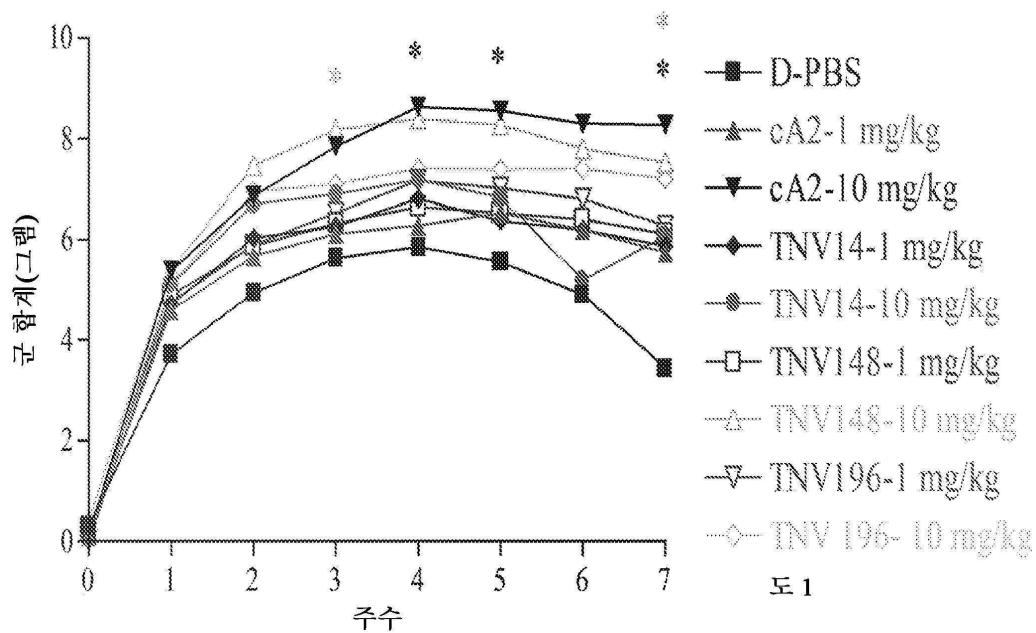


도면9



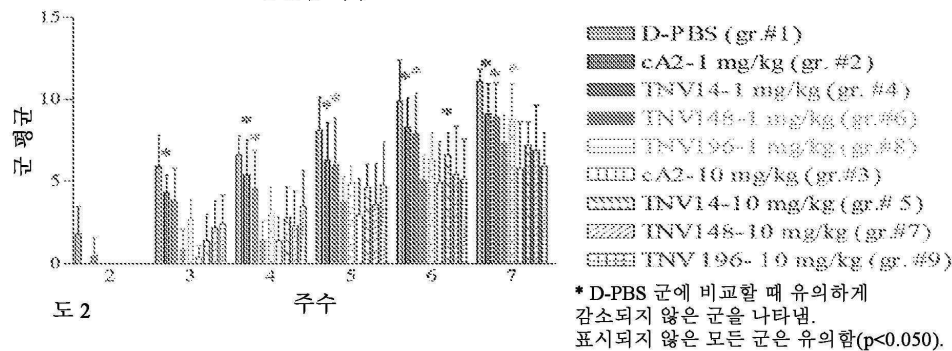
도면10

기준선으로부터의 체중 변화



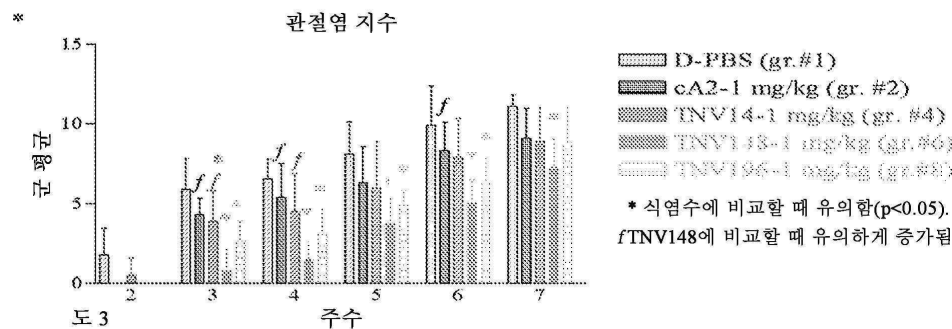
도면11a

관절염 지수

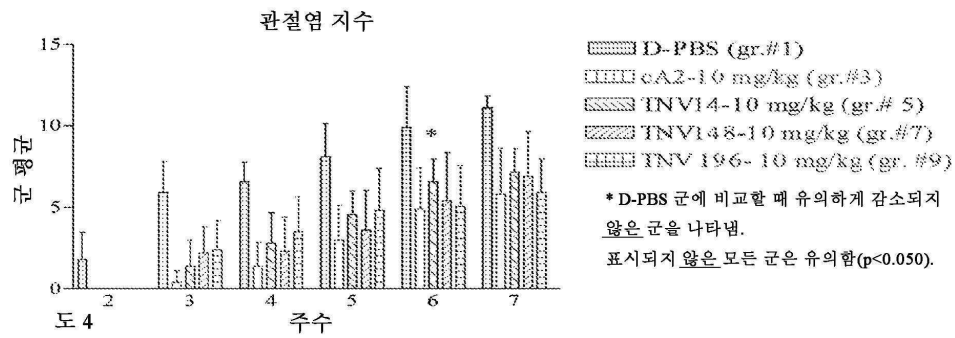


도면11b

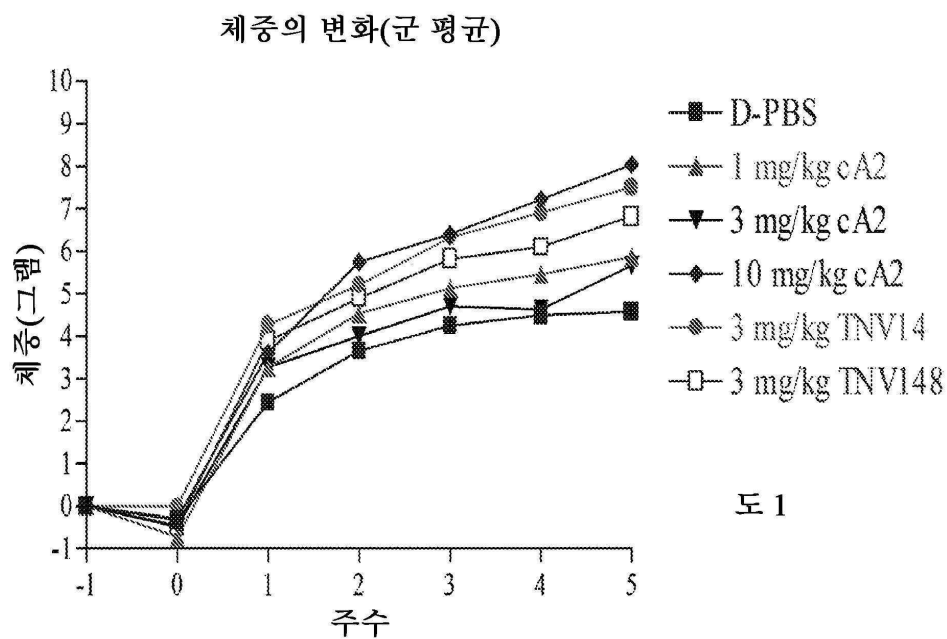
관절염 지수



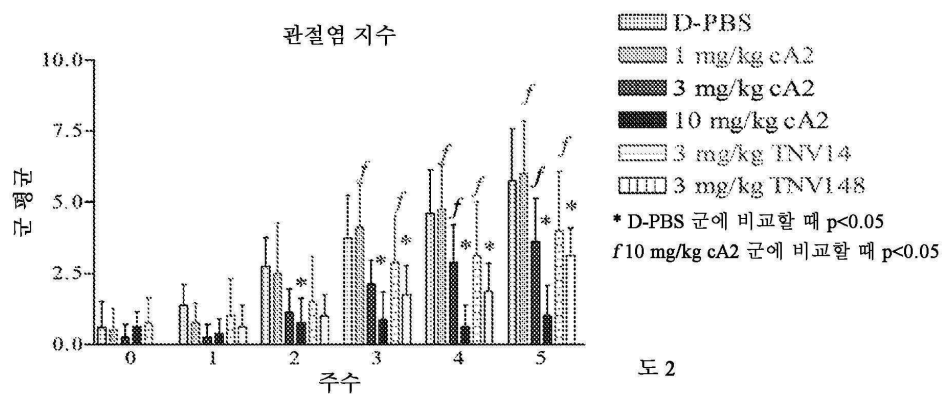
도면11c



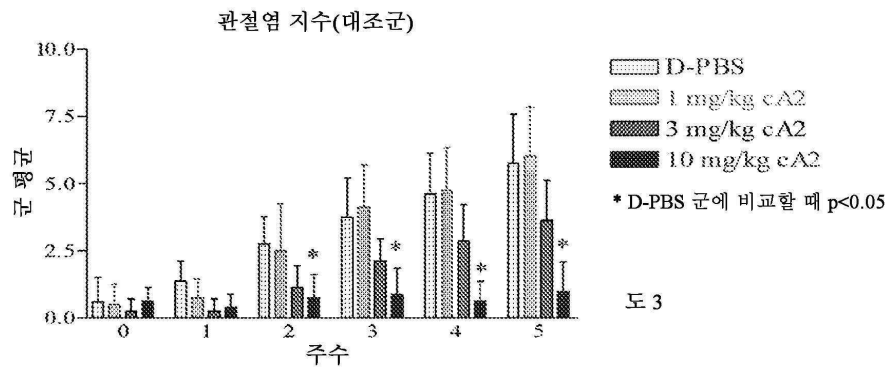
도면12



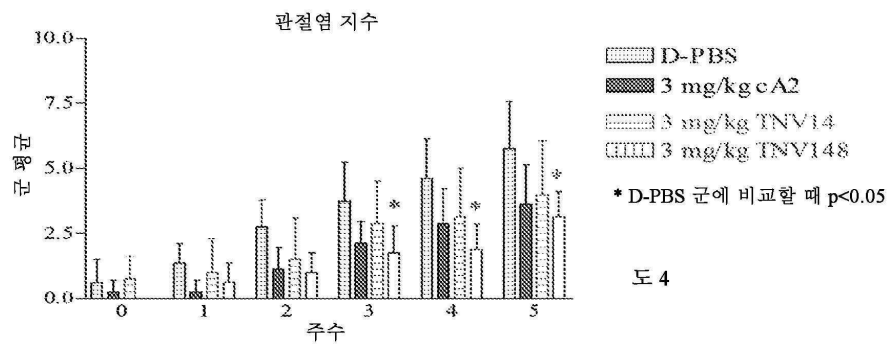
도면13a



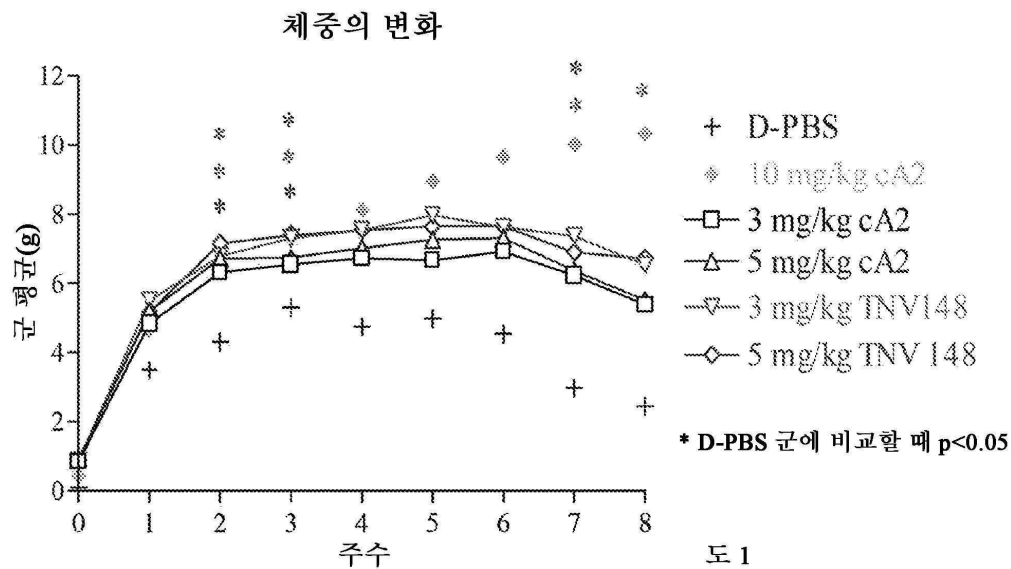
도면13b



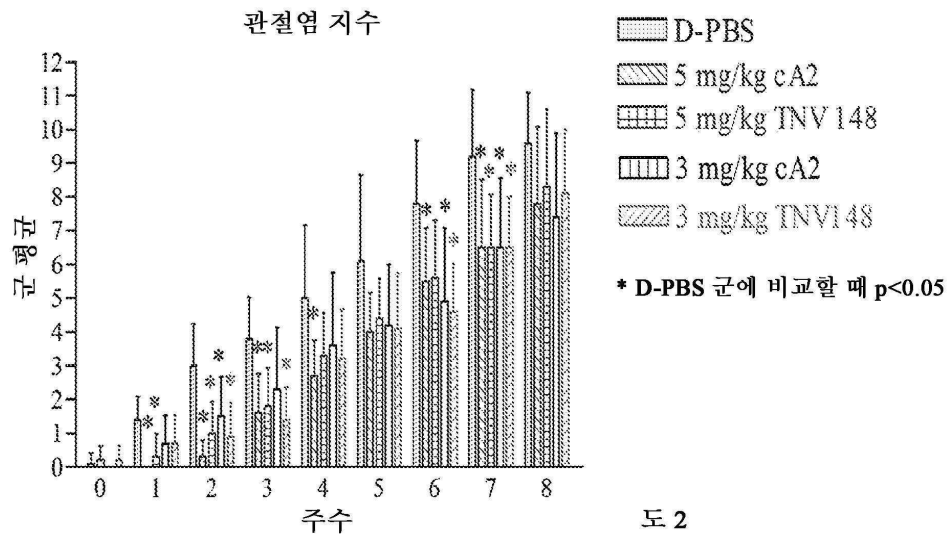
도면13c



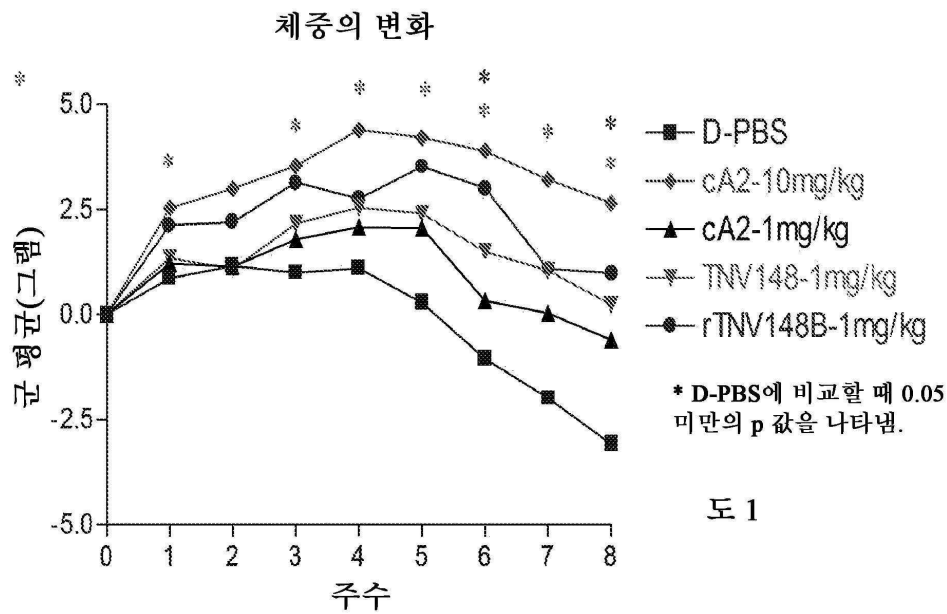
도면14



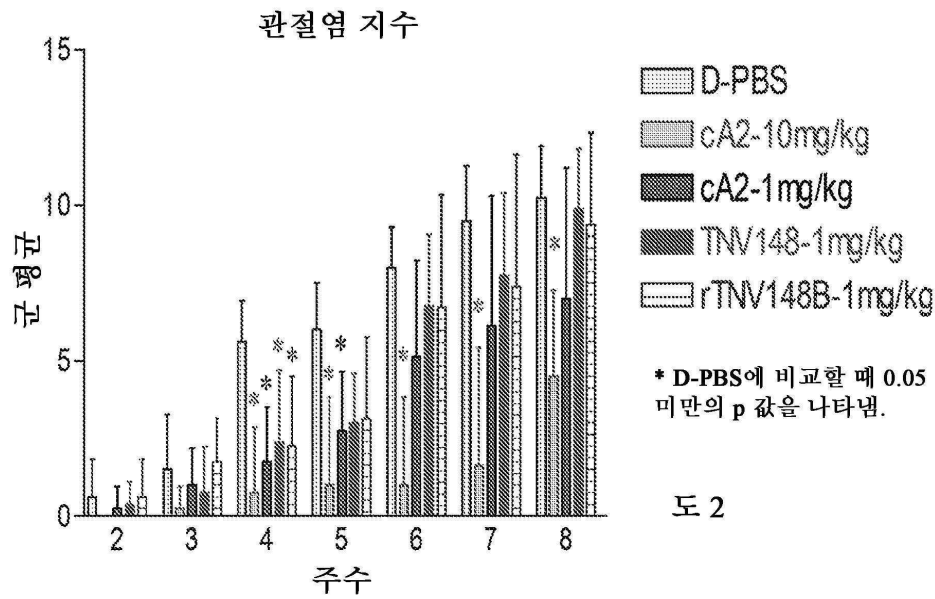
도면15



도면16

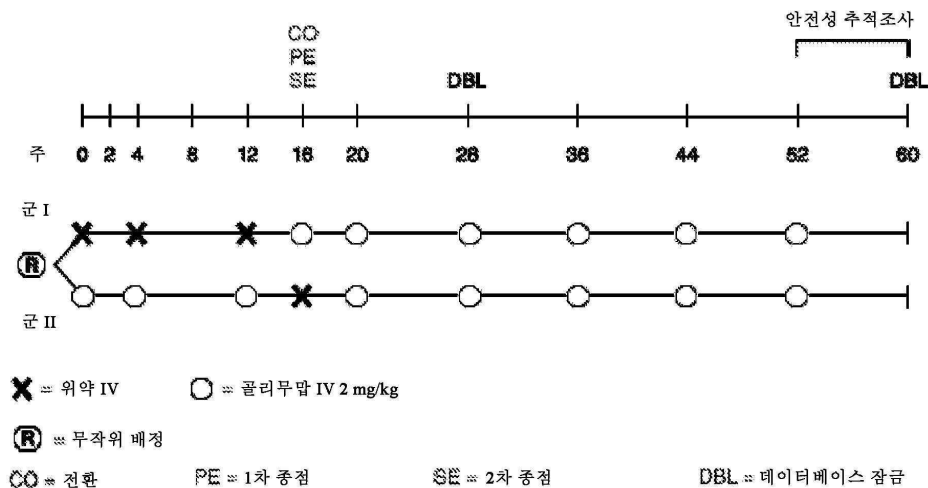


도면17



도면18

연구의 개략적인 개요



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Biotech, Inc.

Diane D. Harrison

Elizabeth C. Hsia

Lee-Lian Kim

Kim Hung Lo

<120> ANTI-TNF ANTIBODIES, COMPOSITIONS, AND METHODS

FOR THE TREATMENT OF ACTIVE ANKYLOSING SPONDYLITIS

<130> JBI5109WOPCT

<140> Unknown
 <141> Herewith
 <150> 62/455,651
 <151> 2017-02-07
 <160> 37
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223>
 Heavy Chain complementarity determining region 1 (CDR1).
 <400> 1
 Ser Tyr Ala Met His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> Heavy Chain complementarity determining region 2 (CDR2).
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa at position 1 is selected from Ile, Phe or Val.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is selected from Ile or Met.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa at position 3 is selected from Ser or Leu.
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)
 <223> Xaa at position 4 is selected from Tyr or Phe.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa at position 10 is selected from Lys or Tyr.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa at position 11 is selected from Ser or Tyr.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa at position 17 is selected from Asp or 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> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> Heavy Chain complementarity determining region 3 (CDR3).
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa at position 4 is selected from Ile or Val.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa at position 5 is selected from Ser, Ala or Gly.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa at position 9 is selected from Asn or 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> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> Light Chain complementarity determining region 1 (CDR1).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa at position 7 is selected from Ser or Tyr.

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> Light Chain complementarity determining region 2 (CDR2).

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> Light Chain complementarity determining region 3 (CDR3).

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(126)

<223> heavy chain variable region sequences as presented in original
Figure 4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> framework 1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa at position 28 is selected from Ile or Thr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> complementarity determining region 1 (CDR1).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(49)

<223> framework 2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa at position 43 is selected from Lys or Asn.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> complementarity determining region 2 (CDR2).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

<223> Xaa at position 50 is selected from Ile, Phe or Val.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(51)

<223> Xaa at position 51 is selected from Ile or Met.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(52)

<223> Xaa at position 52 is selected from Ser or Leu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Xaa at position 53 is selected from Tyr or Phe.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa at position 59 is selected from Lys or Tyr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (60)..(60)

<223> Xaa at position 60 is selected from Ser or Tyr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(66)

<223> Xaa at position 66 is selected from Asp or Gly.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(98)

<223> framework 3

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (70)..(70)

<223> Xaa at position 70 is selected from Val or Ile.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa at position 75 is selected from Ser or Pro.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(78)

<223> Xaa at position 78 is selected from Thr or Ala.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (80)..(80)

<223> Xaa at position 80 is selected from Tyr or Phe.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> Xaa at position 94 is selected from Tyr or Phe.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(115)

<223> complementarity determining region 3 (CDR3).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa at position 102 is selected from Ile or Val.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (116)..(126)

<223> J6 region

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Xaa Arg Phe Thr Xaa Ser Arg Asp Asn Xaa Lys Asn Xaa Leu Xaa

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Xaa Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(108)
 <223> light chain variable region sequences as presented in original

Figure 5

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(23)
 <223> framework 1

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(34)
 <223> complementarity determining region 1 (CDR1).

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(49)
 <223> framework 2

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(56)
 <223> complementarity determining region 2 (CDR2).

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(88)
 <223> framework 3

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(98)
 <223> complementarity determining region 3 (CDR3).

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(108)
 <223> J3 region

<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> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(157)

<223> human TNF alpha monomer sequence

<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> Homo sapiens
<400> 10
ttggtccagt cggactgg 18
<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 11
cacctgcact cggtgctt 18
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12
cactgttttg agtgtgtacg ggcttaagtt 30
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
gccgcacgtg tggaaggg 18
<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 14
agtcaaggtc ggactggctt aagtt 25

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gttgtccct ctcacaatct tcgaattt

28

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ggcggtagac tactcgtc

18

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile

1 5

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

tttcgtacgc caccatggac tggacctgga gcatc

35

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tttcgtacgc caccatgggg ttgggctga gctg

34

<210> 20

<211> 35

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 tttcgtacgc caccatggag ttgggctga gcatg 35
 <210> 21
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 tttcgtacgc caccatgaaa cacctgtggt tcttc 35
 <210> 22
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 tttcgtacgc caccatgggg tcaaccgcca tcctc 35

 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 gtgccagtgg cagaggagtc cattcaagct taagtt 36
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

Met Asp Met Arg Val

1 5

<210> 26

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tttgtcgaca ccatggacat gagggctctc c 31

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

tttgtcgaca ccatggaagc cccagctc 28

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5

<210> 29

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ctggtttcac ctatagtttg cattcagaat tcggcgctt t 41

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatc 35

<210> 31
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 gtagaggctct ctgttaaggt tcttgtgcga catag 35
 <210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> Signal sequence for heavy chain variable region sequences as
 presented in original Figure 4
 <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> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> Signal sequence for light chain variable region sequences as
 presented in original Figure 5
 <400> 33
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly
 20
 <210> 34
 <211> 428

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<223> heavy chain variable region DNA sequences as presented in

original Figure 2A-2B with coding sequence 1 to 421

<400> 34

atggggtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggttcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc caggctccgg	180
caaggggctg gagtgggtgg cagttatatc atatgatgga aaataaatac tacgcagact	240
ccgtgaaggg ccgattcacc atctagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaag	300
aacagccaga gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg agagatcgag gtatatcagc	360

aggtggaata ctactactac tacggtatgg acgtctgggg gcaagggacc acggtcaccc	420
tctcctca	428

<210> 35

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<223> light chain variable region DNA sequences as presented in

original Figure 3 with coding sequence 1 to 387

<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 ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccatt cactttcggc	360
cctgggacca aagtggatat caaacgt	387

<210> 36

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(456)

<223> Golimumab Heavy Chain (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> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(215)

<223> Golimumab Light Chain (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									