

## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103336129 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310240384. X

(22) 申请日 2006. 10. 31

(30) 优先权数据

60/732, 444 2005. 11. 01 US

(62) 分案原申请数据

200680040803. 3 2006. 10. 31

(71) 申请人 阿布维生物技术有限公司

地址 百慕大汉密尔顿

(72) 发明人 W·P·马克西莫怀茨 R·L·旺格

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书5页 说明书40页

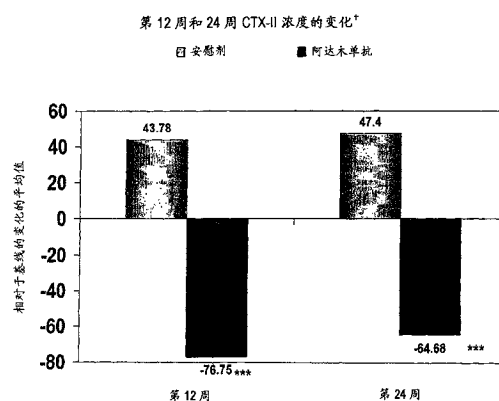
序列表8页 附图4页

### (54) 发明名称

使用生物标志物诊断强直性脊柱炎的方法和组合物

### (57) 摘要

本发明提供一种使用胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物确定 TNF  $\alpha$  抑制剂如 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分治疗强直性脊柱炎 (AS) 的有效性的方法。



1. 一种测定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗强直性脊柱炎 (AS) 方面的有效性的方法,所述方法包括将来自人 TNF  $\alpha$  抗体治疗后 AS 患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的预先测定的水平和与疾病状态相关的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较 ;和

评价该患者的治疗后胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平是否低于胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平,其中人 TNF  $\alpha$  抗体治疗后患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示人 TNF  $\alpha$  抗体在 AS 治疗方面有效。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C- 端肽 (CTX-II)。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C- 端肽 (CTX-II)。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述滑膜炎生物标志物是血清金属蛋白酶 3 (MMP3)。

6. 权利要求 1 的方法,其中确定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分改善与 AS 有关的结构损伤的有效性。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,进一步包括将患者的 C- 反应蛋白 (CRP) 水平和与疾病状态相关的已知标准 CRP 水平进行比较 ;和

评价该患者的 CRP 水平是否高于已知标准 CRP 水平,其中 C- 反应蛋白水平低于已知标准指示治疗的有效性。

8. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离,并且在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $IC_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。

9. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分具有下列特征 :

a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离 ;

b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO :3 修饰得到的氨基酸序列 ;

c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO :4 修饰得到的氨基酸序列。

10. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含的轻链可变区 (LCVR) 具有含有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列或通过位点 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO :3 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域,包含的重链可变区 (HCVR) 具有含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列或通过位点 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO :4 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。

11. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

12. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中所述人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分是阿达木

单抗。

13. 一种测定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分对于强直性脊柱炎 (AS) 的有效性的方法, 包括将从治疗前 AS 患者获得的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的治疗前水平与从所述患者获得的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的治疗后水平进行比较, 其中较低的治疗后生物标志物水平指示人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分的有效性。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C- 端肽。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C- 端肽。

16. 权利要求 13 的方法, 其中所述滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述滑膜炎生物标志物是血清基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

18. 一种监测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在延缓患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤的进展方面的有效性的方法, 该方法包括测定患者中胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的水平, 并且将胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的水平与 AS 有关的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较, 其中生物标志物水平的降低指示人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在降低患者中与 AS 有关的结构损伤的进展速度方面是有效的。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C- 端肽。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C- 端肽。

21. 权利要求 18 的方法, 其中所述滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

22. 权利要求 21 的方法, 其中所述滑膜炎生物标志物是血清基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

23. 权利要求 18-22 中任一项的方法, 其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离, 并且在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $IC_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。

24. 权利要求 18-22 中任一项的方法, 其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分具有下列特征:

a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离;

b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列;

c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列。

25. 权利要求 18-22 中任一项的方法, 其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含的轻链可变区 (LCVR) 具有含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位点 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域, 包含的重链可变区 (HCVR) 具有含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位点 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。

26. 权利要求 18-22 中任一项的方法, 其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重

链可变区 (HCVR)。

27. 权利要求 18-22 中任一项的方法,其中所述 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗。

28. 一种预测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括:

将来自人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分治疗后患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的预先测定的水平和与 AS 有关的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较;和

评价该患者的治疗后胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平是否低于胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平,其中该患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示预测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 方面有效。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C-端肽。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C-端肽。

31. 权利要求 28 的方法,其中所述滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述滑膜炎生物标志物是血清基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。

33. 权利要求 28-32 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离,并且在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。

34. 权利要求 28-32 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分具有下列特征:

a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离;

b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列;

c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列。

35. 权利要求 28-32 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含的轻链可变区 (LCVR) 具有含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位点 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域,包含的重链可变区 (HCVR) 具有含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位点 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。

36. 权利要求 28-32 中任一项的方法,其中人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

37. 权利要求 28-32 中任一项的方法,其中所述 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗。

38. 权利要求 1-37 中任一项的方法,其中生物标志物的水平利用 ELISA 测定。

39. 一种用于实施权利要求 1-37 中任一项的方法的试剂盒,其包含:

- a) 特异性识别胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的检测剂;
- b) 使用说明;和
- c) 任选的用于从患者中分离样品的试剂。

40. 权利要求 39 的试剂盒,其中所述检测剂识别尿 CTX-II 或血清 MMP3。

41. 一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括:

将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的 CTX-II 的预先测定的水平和与疾病状态有关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较;和

评价患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平,其中患者的 CTX-II 水平低于已知标准水平指示所述 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

42. 一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤方面的有效性的方法,所述方法包括将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后 AS 患者的 CTX-II 的预先测定的水平和与疾病状态有关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较;和

评价该患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平,其中来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的 CTX-II 水平低于已知标准水平指示所述 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与 AS 有关的结构损伤方面有效。

43. 一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括:

将从患者获得的 CTX-II 的预先测定的治疗后水平与从该患者获得的 CTX-II 的预先测定的治疗前水平进行比较;和

评价治疗后 CTX-II 水平是否低于治疗前 CTX-II 水平,其中患者的治疗后 CTX-II 水平低于治疗前 CTX-II 水平指示所述 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

44. 权利要求 41-43 中任一项的方法,其中治疗后 CTX-II 水平比治疗前 CTX-II 水平至少降低大约 9%。

45. 权利要求 41-43 中任一项的方法,其中所述 CTX-II 是尿 CTX-II。

46. 权利要求 41-43 中任一项的方法,其中 CTX-II 水平利用 ELISA 测定。

47. 权利要求 41-43 中任一项的方法,其中所述 TNF  $\alpha$  抑制剂选自 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分、TNF 融合蛋白或重组 TNF 结合蛋白质。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述 TNF 融合蛋白是依那西普。

49. 权利要求 47 的方法,其中所述 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分选自嵌合抗体、人源化抗体、人抗体和多价抗体。

50. 权利要求 47 的方法,其中所述抗 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分选自英利昔单抗、戈利木单抗和阿达木单抗。

51. 权利要求 49 的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离,并且在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $IC_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。

52. 权利要求 49 的方法,其中人抗体或其抗原结合部分具有下列特征:

- a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离;
- b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID

NO :3 修饰得到的氨基酸序列；

c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO :4 修饰得到的氨基酸序列。

53. 权利要求 49 的方法, 其中人抗体或其抗原结合部分含有具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

54. 权利要求 41-43 中任一项的方法, 进一步包括将从患者获得的滑膜炎生物标志物的预先测定的治疗后水平和与 AS 有关的滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较; 和

评价治疗后滑膜炎生物标志物水平是否低于已知标准滑膜炎生物标志物水平, 其中治疗后滑膜炎生物标志物水平低于已知标准滑膜炎生物标志物水平指示所述 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

55. 权利要求 54 的方法, 其中所述滑膜炎生物标志物是 MMP-3。

56. 权利要求 41-54 中任一项的方法, 其中生物标志物的水平利用 ELISA 进行测定。

57. 一种用于实施权利要求 41-54 中任一项的方法的试剂盒, 其包含:

a) 特异性识别 CTX-II 的检测剂;

b) 使用说明; 和

c) 任选的用于从患者中分离样品的试剂。

58. 权利要求 57 的试剂盒, 其进一步包含特别性识别 MMP-3 的检测剂。

## 使用生物标志物诊断强直性脊柱炎的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 10 月 31 日和发明名称为“使用生物标志物诊断强直性脊柱炎的方法和组合物”的 200680040803.3 号发明专利申请的分案申请。

### [0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2005 年 11 月 1 日提交的美国临时专利申请 60/732,444 的优先权,该临时申请的内容在此引入作为参考。

[0004] 本申请涉及美国专利 No. 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015,这些专利均在此引入作为参考。本申请还涉及 2001 年 3 月 7 日提交的美国专利申请序号 09/801,185;2002 年 11 月 22 日提交的美国专利申请序号 10/302,356;2002 年 6 月 5 日提交的美国专利申请序号 10/163657;和 2002 年 4 月 26 日提交的美国专利申请序号 10/133715;2002 年 8 月 16 日提交的美国专利申请序号 10/222140;2003 年 10 月 24 日提交的美国专利申请序号 10/693233;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/622932;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623039;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623076;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623065;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/622928;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623075;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623035;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/622683;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/622205;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/622210;和 2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请序号 10/623318。本申请还涉及美国申请号 11/104117。这些专利和专利申请的全部内容引入本文作为参考。

### [0005] 发明背景

[0006] 升高的 TNF 水平在病理性炎症中起重要作用。TNF(也被称为 TNF $\alpha$ )与包括脓毒症、感染、自身免疫病、移植排斥和移植物抗宿主病在内的多种人类疾病和紊乱的病理生理学有关(参见,例如,Moeller 等人.(1990)Cytokine 2:162;授予 Moeller 等人的美国专利 No. 5,231,024;Moeller, A. 等人的欧洲专利公开 No. 260610B1;Vasilli(1992)Annu. Rev. Immunol. 10:411;Tracey 和 Cerami(1994)Annu. Rev. Med. 45:491)。

[0007] 强直性脊柱炎(AS)与升高的 TNF 水平有关(Lange 等人.(2000)Eur J Med Res. 5(12):507),并且是常见的炎性风湿性疾病,产生进行性的脊柱僵硬和活动受限。AS 是脊骨和骶髂关节的慢性炎症形式,可引起脊骨之中和周围的疼痛和僵硬。随着时间推移,慢性脊柱炎症(脊椎炎)可以导致椎骨完全粘接在一起(融合),该过程被称为关节强直,随后又导致脊骨活动性的丧失。

[0008] AS 通常利用组合方法来诊断,包括检查症状、身体检查、X-射线分析。AS 患者的症状可包括脊骨和骶骨区域的疼痛和晨僵,伴随有或不伴随有其他关节、腱和器官的炎症。然而,AS 的早期症状可能非常有欺骗性,因为在许多其它疾病中可以见到背下部的僵硬和疼痛,结果甚至在考虑诊断 AS 以前时间就可能过去了。另外,患者的身体检查可能显示炎症和关节活动范围降低的指征,通常在脊骨中特别明显。背下部和/或颈部的灵活性可能降低。脊骨的 X-射线检查异常或血液检测基因标记物 HLA-B27 基因的存在可能提示进一步的诊断线索。

[0009] 结构损伤与 AS 有关,并且是由于关节软骨和骨中的降解和再吸收引起的,导致关节破坏。在治疗上,重要的是解决 AS 患者的这两个症状,以及与该疾病有关的关节破坏所引起的结构损伤。

[0010] AS 的传统治疗包括给患者施用非甾体抗炎药 (NSAID) 来减轻脊骨和其他关节的疼痛和僵硬。常用的 NSAID 包括吲哚美辛 (Indocin)、托美丁 (Tolectin)、舒林酸 (Clinoril)、萘普生 (Naprosyn) 和双氯芬酸 (Voltaren)。最近,抗-TNF 生物剂,如依那西普、英利昔单抗 (infliximab) 和阿达木单抗 (adalimumab),已经显示在减轻与 AS 有关的症状方面有效。

## 发明内容

[0011] 尽管使用抗-TNF 生物剂可改善 AS 的治疗,但是需要诊断和预后试验来帮助医生诊断患者的症状,及推荐合适的治疗方案。另外,需要诊断和预后试验来更好地评价患者疾病状态的改善,这可给患者提供更好的医疗护理以及减少治疗费用。

[0012] 本发明提供可以用来确定患者总体 AS 疾病状态改善(特别是在与 AS 疾病有关的结构损伤方面)的生物标志物。本发明描述了一种测定 TNF 抑制剂在减轻与 AS 有关的软骨降解和/或滑膜炎方面的有效性的方法。本发明还包括一种基于软骨降解和/或滑膜炎生物标志物水平确定 AS 患者是 TNF 抑制剂例如阿达木单抗治疗的候选者的方法。

[0013] 本发明描述了一种测定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗强直性脊柱炎 (AS) 方面的有效性的方法,所述方法包括将预先测定的来自人 TNF  $\alpha$  抗体治疗后 AS 患者的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的水平和与疾病状态相关的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较;以及评价患者的治疗后胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物水平是否低于胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平,其中来自人 TNF  $\alpha$  抗体治疗后患者的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示人 TNF  $\alpha$  抗体对 AS 治疗的有效性。

[0014] 本发明还提供一种监测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在减缓患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤的进展方面的有效性的方法,该方法包括测定患者中胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的水平,并且将胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的水平和与 AS 有关的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较,其中生物标志物水平的降低指示人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在降低患者中与 AS 有关的结构损伤的进展速度方面是有效的。

[0015] 本发明包括一种预测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括将来自人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分治疗后患者的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的预先测定的水平和与 AS 有关的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较;和评价患者的治疗后胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物水平是否低于胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平,其中来自患者的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示预测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 方面有效。

[0016] 本发明还描述了一种测定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分对于强直性脊柱炎 (AS) 的有效性的方法,包括将从 AS 患者获得的胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志

物的治疗前水平和从所述患者获得的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的治疗后水平进行比较,其中较低的治疗后生物标志物水平指示人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分的有效性。

[0017] 在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C-端肽 (CTX-II)。在另外一个实施方案中,胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C-端肽 (CTX-II)。

[0018] 在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。在另外一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是血清金属蛋白酶 3 (MMP3)。

[0019] 在一个实施方案中,测定人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在改善与 AS 有关的结构损伤方面的有效性。

[0020] 在一个实施方案中,本发明的方法进一步包括将患者的 C-反应蛋白 (CRP) 水平和与疾病状态相关的已知标准 CRP 水平进行比较;和

[0021] 评价患者的 CRP 水平是否高于已知标准 CRP 水平,其中 C-反应蛋白低于已知标准指示治疗有效性。

[0022] 在一个实施方案中,人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离,并且在标准体外 L929 测定中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。

[0023] 在一个实施方案中,人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分具有以下特征:

[0024] a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离;

[0025] b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列;

[0026] c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列。

[0027] 在另外一个实施方案中,人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含的轻链可变区 (LCVR) 具有含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位点 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域,包含的重链可变区 (HCVR) 具有含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位点 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。

[0028] 在本发明的另外一个实施方案中,人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

[0029] 在另外一个实施方案中,人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗。

[0030] 在本发明的另外一个实施方案中,生物标志物的水平利用 ELISA 进行测定。

[0031] 本发明还包括一种用于实施上述任一种方法的试剂盒,其包含特异性识别胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的检测剂;使用说明;和任选的用于从患者中分离样品的试剂。

[0032] 在一个实施方案中,所述检测剂识别尿 CTX-II 或血清 MMP3。

[0033] 本发明还提供一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的 CTX-II 的预先测定的水平和与疾病状态有关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较;和评价患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平,其中患者的 CTX-II 水平低于已知标准水平指示该 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

[0034] 本发明进一步提供一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤方面的有效性的方法,所述方法包括将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后 AS 患者的 CTX-II 的预先测定水平和与疾病状态有关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较;和评价患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平,其中来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的 CTX-II 水平低于已知标准水平指示该 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与 AS 有关的结构损伤方面有效。

[0035] 本发明还提供一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者 AS 方面的有效性的方法,所述方法包括将从患者获得的预先测定的治疗后 CTX-II 水平与从该患者获得的 CTX-II 的预先测定的治疗前水平进行比较;和评价治疗后 CTX-II 水平是否低于治疗前 CTX-II 水平,其中患者的治疗后 CTX-II 水平低于治疗前 CTX-II 水平指示 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

[0036] 在一个实施方案中,治疗后 CTX-II 水平相对于治疗前 CTX-II 水平至少降低大约 5-10%。在另外一个实施方案中,治疗后 CTX-II 水平相对于治疗前 CTX-II 水平至少降低大约 9%。在另外一个实施方案中,治疗后 CTX-II 水平相对于基线或已知标准水平至少为大约 5-100%、大约 5-80%、大约 5-60%、大约 5-45%、大约 5-40%、大约 5-35%、大约 5-30%、大约 5-25%、大约 5-20%、大约 5-15%、大约 5-10%、大约 6-9%、大约 7-8% 或大约 9%。

[0037] 在一个实施方案中,治疗后 MMP-3 水平相对于 AS 受试者的基线或已知标准水平至少为大约 5-50%、大约 5-45%、大约 5-40%、大约 5-35%、大约 5-30%、大约 5-25%、大约 5-20%、大约 5-15%、大约 5-13%、大约 6-12%、大约 7-11% 或大约 8%。在另外一个实施方案中,当 MMP-3 水平相对于 AS 受试者的基线或已知标准水平降低至少大约 12% 时,显示 TNF 抑制剂的有效性。

[0038] 在一个实施方案中,CTX-II 是尿 CTX-II。在一个实施方案中,MMP-3 是血清 MMP-3。

[0039] 在一个实施方案中,利用 ELISA 测定 CTX-II 水平或 MMP-3 水平。

[0040] 本发明还描述了一种确定 AS 患者是否是阿达木单抗治疗的候选者的方法,包括比较所述患者的胶原降解生物标志物水平与来自未受影响的受试者的已知标准胶原降解生物标志物水平,以及评价患者的胶原降解生物标志物水平是否高于已知标准胶原降解生物标志物水平,其中较高的生物标志物水平指示所述患者是阿达木单抗治疗的候选者。

[0041] 在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C-端肽。在一个实施方案中,通过测定患者的尿中 II 型胶原 C-端肽的浓度来确定胶原降解生物标志物的水平。

[0042] 在一个实施方案中,本发明进一步包括比较所述患者的滑膜炎生物标志物水平与来自未受影响的受试者的已知标准滑膜炎生物标志物水平;以及评价患者的滑膜炎生物标志物水平是否高于已知标准滑膜炎生物标志物水平,其中较高的患者滑膜炎生物标志物水平指示该患者是阿达木单抗治疗的候选者。

[0043] 在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3(MMP3)。

[0044] 本发明包括一种确定 AS 患者是否是阿达木单抗治疗的候选者的方法,包括比较所述患者的滑膜炎生物标志物水平与来自未受影响的受试者的已知标准滑膜炎生物标志物水平,以及评价患者的滑膜炎生物标志物水平是否高于已知标准滑膜炎生物标志物水平,其中较高的滑膜炎生物标志物水平指示该患者是阿达木单抗治疗的候选者。

[0045] 在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是基质金属蛋白酶 3(MMP3)。

[0046] 在一个实施方案中,通过测定患者 MMP3 的血清浓度来确定滑膜炎生物标志物的水平。

[0047] 在一个实施方案中,本发明进一步包括比较所述患者的胶原降解生物标志物水平与来自未受影响的受试者的已知标准胶原降解生物标志物水平,以及评价患者的胶原降解生物标志物水平是否高于已知标准胶原降解生物标志物水平,其中较高的患者胶原降解生物标志物水平指示该患者是阿达木单抗治疗的候选者。

[0048] 在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C-端肽。

[0049] 本发明包括一种监测治疗性治疗对强直性脊柱炎(AS)的有效性的方法,包括测定受试者中胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的水平,其中该生物标志物水平的降低或改变指示 AS 中结构损伤进展速度的降低或改变。

[0050] 在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是尿 II 型胶原 C-端肽。

[0051] 在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是血清基质金属蛋白酶 3(MMP3)。

[0052] 在一个实施方案中,治疗性治疗是施用阿达木单抗。

[0053] 本发明还包括一种测定 AS 患者中结构损伤的方法,包括测定患者中胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的基线水平,以获得所述患者的基线生物标志物水平;在一段时间后测定所述患者胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的水平,以获得所述患者的基线后生物标志物水平;比较所述患者的基线生物标志物水平与基线后生物标志物水平;评价患者的基线后生物标志物水平是否低于患者的基线生物标志物水平,其中较低的基线后生物标志物水平指示结构损伤减少。

[0054] 本发明进一步包括一种调节 AS 患者中胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的方法,包括给所述患者施用阿达木单抗。

[0055] 在一个实施方案中,TNF $\alpha$  抑制剂选自 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分、TNF 融合蛋白或重组 TNF 结合蛋白质。

[0056] 在一个实施方案中,TNF 融合蛋白是依那西普。

[0057] 在一个实施方案中,TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分选自嵌合抗体、人源化抗体、人抗体和多价抗体。

[0058] 在一个实施方案中,抗 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分选自英利昔单抗、戈利木单抗(golimumab)和阿达木单抗。

[0059] 在一个实施方案中,人抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF $\alpha$  解离,并且在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $IC_{50}$  中和人 TNF $\alpha$  细胞毒性。

[0060] 在一个实施方案中,人抗体或其抗原结合部分具有下列特征:

[0061] a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{off}$  速率常数与人 TNF $\alpha$

解离；

[0062] b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列；

[0063] c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列。

[0064] 在一个实施方案中，人抗体或其抗原结合部分含有具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

[0065] 在一个实施方案中，本发明进一步包括将从患者获得的滑膜炎生物标志物的预先测定的治疗后水平和与 AS 有关的滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较；评价治疗后滑膜炎生物标志物水平是否低于已知标准滑膜炎生物标志物水平，其中治疗后滑膜炎生物标志物低于已知标准滑膜炎生物标志物水平指示 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

[0066] 在一个实施方案中，滑膜炎生物标志物是 MMP-3。

[0067] 本发明还描述了一种用于实施上述方法的试剂盒，其中该试剂盒包含特异性识别 CTX-II 的检测剂；使用说明；和任选的用于从患者中分离样品的试剂。

[0068] 在一个实施方案中，该试剂盒进一步包含特异性识别 MMP-3 的检测剂。

## 附图说明

[0069] 图 1 显示实施例 1 所述的研究的研究设计。

[0070] 图 2 显示与安慰剂组相比，阿达木单抗组患者的尿 CTX-II 水平在第 12 和 24 周显著降低。

[0071] 图 3 显示与安慰剂组患者相比，阿达木单抗组患者的 MMP3 水平在第 12 和 24 周具有统计学显著性的降低。

[0072] 图 4 显示与安慰剂组患者相比，阿达木单抗组患者的 CRP 水平在第 12 和 24 周显著降低。

[0073] 发明详述

[0074] I. 定义

[0075] 为了可以更容易地理解本发明，首先定义某些术语。

[0076] 本文使用的术语“生物标志物”通常是指一种分子，即基因（或编码所述基因的核酸）、蛋白质、碳水化合物结构或糖脂，其在来源于哺乳动物组织或细胞的样品之中或之上的表达可以通过本领域中的标准方法（以及本文公开的方法）检测到，并且预测或者指示获得该标记物的受试者的状况。当生物标志物是蛋白质时，表达的调节或改变包括通过不同的翻译后修饰进行调节。生物标志物可以用来基于生物标志物的水平区别疾病的活动性，包括病症的改善和病症的恶化。因此，在一个实施方案中，在本发明中有用的生物标志物是其表达在具有疾病状态例如脊椎关节病的患者中与正常对照（即未受影响的受试者）相比被调节（上调或下调）的任何分子。在一个实施方案中，选择的 1、2、3 种和更多本发明生物标志物的组可以用作确定患者对抗 -TNF 治疗的应答的快速诊断或预后的终点。

[0077] 术语“胶原降解生物标志物”是指与胶原的破坏有关的分子,即基因(或编码所述基因的核酸)、蛋白质、碳水化合物结构或糖脂。胶原降解生物标志物用来区别获得样品或组织的受试者中的疾病活动,即胶原破坏。在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是胶原的片段,例如 II 型胶原的片段。在一个实施方案中,胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C-端肽(CTX-II)。

[0078] 术语“滑膜炎生物标志物”是指与滑膜炎或滑膜的炎症有关的分子,即基因(或编码所述基因的核酸)、蛋白质、碳水化合物结构或糖脂。滑膜炎生物标志物可以用来指示患者滑液或滑液胶原的更新、增生、降解、炎症、破坏、分解、病理性重塑或降解。在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物是与细胞外基质(ECM)降解有关的内肽酶,例如基质金属蛋白酶。在一个实施方案中,本发明中使用的滑膜炎生物标志物是 MMP-3。

[0079] 术语“已知标准水平”或“对照水平”是指公认的或预定的用来比较来自患者样品的生物标志物水平的生物标志物水平。在一个实施方案中,胶原降解生物标志物和/或滑膜炎生物标志物的已知标准水平基于具有 AS 的受试者,因此代表疾病状态。在另外一个实施方案中,生物标志物的已知标准水平表示未患 AS 的受试者的未受影响的(即非疾病)状态。

[0080] 与特定生物标志物的已知标准水平进行比较时,与已知标准水平的偏差通常指示疾病状态的改善或恶化。或者,与特定生物标志物的已知标准水平进行比较时,等于已知标准水平通常指示疾病活动性的确认、非疾病状态的确认,或者(如果患者的生物标志物水平是在疾病治疗后获得的)改善患者的疾病状态的治疗的失败。

[0081] 本文使用的术语“表达”在用于检测本发明生物标志物的表达时,可以指检测编码生物标志蛋白质的基因的转录,检测生物标志蛋白质的翻译,和/或检测较大蛋白质代谢产生的生物标志蛋白质,例如 II 型胶原产生 CTX-II 片段的降解。检测生物标志物的表达是指主动确定生物标志物是否表达的行为。定量化表达是指确定特定生物标志物水平的行为,例如以 ng/ml 为单位。检测和/或定量化表达可以包括确定生物标志物表达与已知标准水平相比上调,与已知标准水平相比下调,还是与已知标准水平相比基本上不变。因此,定量化和/或检测表达的步骤不需要生物标志物的表达实际上上调或下调,而是,也可以包括检测到生物标志物不表达,或者检测到生物标志物的表达不变,或者没有不同(即,检测到生物标志物没有显著表达,或生物标志物表达与对照相比没有显著变化)。

[0082] 本文使用的术语“水平”或“量”是指可测定的生物标志物的量。该量可以是(a)测定的每单位体积或细胞的分子、摩尔或重量的绝对量,或(b)相对量,例如通过密度计分析测定的相对量。在一个优选实施方案中,测定生物标志物的 RNA 和/或蛋白质的水平。

[0083] 本文使用的术语“受试者”或“患者”是指人类或非人类动物。

[0084] 本文使用的术语“样品”是指从受试者获得的类似的细胞或组织的集合。组织或细胞样品的来源可以是来自新鲜、冷冻和/或保存的器官或组织样品或活检或吸出物的固体组织;血液或任何血液成分;或体液,如血液、血清、血浆、尿、唾液、汗或滑液。在一个实施方案中,滑膜炎生物标志物从血清样品中获得。在一个实施方案中,软骨降解生物标志物从尿样中获得。

[0085] 本文使用的术语“人 TNF  $\alpha$ ”(本文中缩写为 hTNF  $\alpha$  或简称为 hTNF)指以 17kD 分泌形式及 26kD 膜相关形式存在的人类细胞因子,其生物活性形式由非共价结合的 17kD 分

子的三聚体组成。hTNF $\alpha$  的结构进一步描述于(例如)Pennica,D. 等人(1984)Nature312:724-729;Davis,J.M. 等人(1987)Biochemistry26:1322-1326;及 Jones,E.Y. 等人(1989)Nature338:225-228 中。术语人 TNF $\alpha$  包括重组人 TNF $\alpha$  (rhTNF $\alpha$ ),其可由标准重组表达方法制备或购买得到(R & D Systems,目录第 210-TA 号,Minneapolis,MN)。TNF $\alpha$  也称作 TNF。

[0086] 术语“TNF $\alpha$  抑制剂”包括干扰 TNF $\alpha$  活性的药剂。该术语也包括本文中所述的各抗 TNF $\alpha$  人抗体及抗体部分以及美国专利 No. 6,090,382 号、6,258,562、6,509,015 及美国专利申请序号 09/801185 及 10/302356 中所述的那些抗 TNF $\alpha$  人抗体及抗体部分。在一个实施方案中,用于本发明的 TNF $\alpha$  抑制剂为抗 TNF $\alpha$  抗体或其片段,其包括英利昔单抗(**Remicade**<sup>®</sup>, Johnson and Johnson;描述于美国专利 No. 5,656,272 中,该专利引入本文作为参考)、CDP571(一种人源化单克隆抗 TNF $\alpha$  IgG4 抗体)、CDP870(一种人源化单克隆抗 TNF $\alpha$  抗体片段)、抗 TNF dAb(Peptech)、CNT0148(戈利木单抗;Medarex and Centocor,参见 W002/12502)及阿达木单抗(**Humira**<sup>®</sup> Abbott Laboratories,人抗 TNF mAb,在美国 6,090,382 中描述为 D2E7)。其它的可用于本发明的抗体描述于美国专利 No. 6,593,458;6,498,237;6,451,983;和 6,448,380 中,其中每一个专利在此引入作为参考。在另一实施方案中,该 TNF $\alpha$  抑制剂为 TNF 融合蛋白,例如依那西普(**Enbrel**<sup>®</sup>, Amgen;描述于 W091/03553 及 W009/406476 中,引入本文作为参考)。在另一实施方案中,该 TNF $\alpha$  抑制剂为重组 TNF 结合蛋白质(r-TBP-I)(Serono)。

[0087] 本文使用的术语“抗体”指包含 4 条多肽链(由二硫键相互连接的 2 条重(H)链及 2 条轻(L)链)的免疫球蛋白分子。每条重链包含一个重链可变区(本文中缩写为 HCVR 或 VH)及一个重链恒定区。该重链恒定区包含 3 个域:CH1、CH2 及 CH3。每条轻链包含一个轻链可变区(本文中缩写为 LCVR 或 VL)及一个轻链恒定区。该轻链恒定区包含 1 个域 CL。VH 及 VL 区可进一步再分为高变区,称作互补决定区(CDR),其中散布有更保守的区,称作构架区(FR)。VH 及 VL 各包含 3 个 CDR 及 4 个 FR,按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本发明的抗体进一步详细描述于美国专利 No. 6,090,382、6,258,562 及 6,509,015 中,均全文均引入本文作为参考。

[0088] 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)指保持特异性结合抗原(例如 hTNF $\alpha$ )的能力的抗体的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”内包含的结合片段的实例包括(i)Fab 片段,由 VL、VH、CL 及 CH1 域组成的单价片段;(ii)F(ab')<sub>2</sub> 片段,包含在铰链区由二硫桥连接的 2 个 Fab 片段的二价片段;(iii)由 VH 及 CH1 域组成的 Fd 片段;(iv)由抗体的单臂 VL 域及 VH 域组成的 Fv 片段,(v) dAb 片段(Ward 等人(1989)Nature341:544-546),其由 VH 域组成;及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管 Fv 片段的 2 个域(VL 及 VH)由各自基因编码,但是其可使用重组方法通过能使其成为单一蛋白质链的合成接头连接,其中 VL 及 VH 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv(scFv);参见例如 Bird 等人(1988)Science242:423-426;及 Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883)。该单链抗体也包括于术语抗体的“抗原结合部分”中。也包括单链抗体的其它形式,例如双抗体。双抗体为二价、双特异性抗体,其中 VH 及 VL 域表达于一条多肽链上,但使用由于

太短而使其不能在相同链上的两个域之间配对的接头,因此使该域与另一链的互补域配对并形成两个抗原结合位点(参见例如 Holliger 等人(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448;Poljak 等人(1994)Structure2:1121-1123)。本发明的抗体部分进一步详细描述于美国专利 No. 6,090,382、6,258,562、6,509,015 中,均全文引入本文作为参考。

[0089] 结合片段通过重组 DNA 技术或通过完整免疫球蛋白的酶或化学裂解而产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、单链及单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”免疫球蛋白或抗体之外,应理解免疫球蛋白或抗体具有相同的各自的结合位点。“双特异性”或“双功能”抗体为具有 2 对不同重/轻链对及 2 个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可通过包括杂交瘤融合或 Fab' 片段连接在内的多种方法产生。参见,例如, Songsivilai 和 Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990);Kostelny 等人, J. Immunol. 148,1547-1553(1992)。

[0090] 本文使用的“保守氨基酸置换”为一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一氨基酸残基置换的置换。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在现有技术中定义,所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0091] “嵌合抗体”是指如下的抗体:其中重链和轻链的各自氨基酸序列的一部分与来源于特定种或属于特定类别的抗体的相应序列同源,而该链的其余片段与来自另一个种的相应序列同源。在一个实施方案中,本发明提供一种嵌合抗体或抗原结合片段,其中轻链和重链的可变区模拟来源于一个哺乳动物种的抗体的可变区,而恒定部分与来源于另一个种的抗体的序列同源。在本发明的一个优选实施方案中,通过将来自小鼠抗体的 CDR 移植到人抗体的构架区上形成嵌合抗体。

[0092] “人源化抗体”是指如下的抗体:其包含至少一个含有基本上来自于人抗体链(被称为接受免疫球蛋白或抗体)的可变区构架残基的链和至少一个基本上来自于非人抗体(例如小鼠)的互补决定区(CDR)。除了 CDR 的移植以外,人源化抗体一般进行进一步的改变,以提高亲和力和/或免疫原性。

[0093] 术语“多价抗体”是指含有一个以上抗原识别位点的抗体。例如,“双价”抗体具有两个抗原识别位点,“四价”抗体具有四个抗原识别位点。术语“单特异性”、“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等是指在多价抗体中存在的不同抗原识别位点特异性的数目(不同于抗原识别位点数)。例如,“单特异性”抗体的抗原识别位点都与相同的表位结合。“双特异性”抗体具有至少一个与第一表位结合的抗原识别位点和至少一个与第二表位结合的抗原识别位点,该第二表位与第一表位不同。“多价单特异性”抗体具有多个全部与同一表位结合的抗原识别位点。“多价双特异性”抗体具有多个抗原识别位点,其中一部分与第一表位结合,一部分与第二表位结合,该第二表位与第一表位不同。

[0094] 本文使用的术语“人抗体”包括具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区的抗体。例如在 CDR 中,尤其在 CDR3 中,本发明的人抗体可包含并非由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体

细胞突变引入突变)。然而,本文使用的术语“人抗体”并非意在包括其中来源于另一哺乳物种(例如小鼠)种系的CDR序列已被移植于人类构架序列上的抗体。

[0095] 本文使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染至宿主细胞(以下进一步描述)内的重组表达载体表达的抗体;自重组、组合人抗体库(以下进一步描述)中分离的抗体;从对于人类免疫球蛋白基因而言为转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见,例如, Taylor 等人 (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287);或通过包括将人类免疫球蛋白基因序列剪接为其它DNA序列的任意其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区。然而,在某些实施方案中,这些重组人抗体经受体外诱变(或当使用对于人类Ig序列而言为转基因的动物时,经受体体内细胞诱变),因此重组抗体的VH及VL区的氨基酸序列是这样的序列:当衍生自人类种系VH及VL序列并且与人类种系VH及VL序列相关时,可能并非天然存在于体内人抗体种系所有组成部分内。

[0096] 这些嵌合、人源化、人和双特异性抗体可以通过本领域公知的重组DNA技术产生,例如使用以下所述的方法:PCT国际申请No. PCT/US86/02269;欧洲专利申请No. 184,187;欧洲专利申请No. 171,496;欧洲专利申请No. 173,494;PCT国际申请No. W086/01533;美国专利No. 4,816,567;欧洲专利申请No. 125,023;Better等人.(1988) Science 240 :1041-1043;Liu等人.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :3439-3443;Liu等人.(1987) J. Immunol. 139 :3521-3526;Sun等人.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :214-218;Nishimura等人.(1987) Cancer Res. 47 :999-1005;Wood等人.(1985) Nature 314 :446-449;Shaw等人.(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80 :1553-1559;Morrison (1985) Science 229 :1202-1207;Oi等人.(1986) BioTechniques 4 :214;美国专利No. 5,225,539;Jones等人.(1986) Nature 321 :552-525;Verhoeyan等人.(1988) Science 239 :1534;Beidler等人.(1988) J. Immunol. 141 :4053-4060, Queen等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :10029-10033 (1989), US5,530,101, US5,585,089, US5,693,761, US5,693,762, Selick等人., W090/07861, 和 Winter, US5,225,539。

[0097] 本文使用的“分离的抗体”指基本上不含其它具有不同抗原特异性的抗体的抗体(例如特异性结合hTNF $\alpha$ 的分离的抗体基本上不含特异性结合除hTNF $\alpha$ 之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合hTNF $\alpha$ 的分离的抗体可具有与其它抗原例如来自其它物种的TNF $\alpha$ 分子的交叉反应性(以下进一步详细描述)。此外,分离的抗体基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。

[0098] 本文使用的“中和抗体”(或“中和hTNF $\alpha$ 活性的抗体”)是指其与hTNF $\alpha$ 的结合导致hTNF $\alpha$ 的生物活性受到抑制的抗体。此hTNF $\alpha$ 的生物活性的抑制可通过测定一种或多种hTNF $\alpha$ 生物活性指标(例如hTNF $\alpha$ 诱导的细胞毒性(体外或体内),hTNF $\alpha$ 诱导的细胞活化,及hTNF $\alpha$ 与hTNF $\alpha$ 受体的结合)来评估。这些hTNF $\alpha$ 生物活性指标可通过一种或多种现有技术中已知的若干标准体外或体内测定进行评估(参见美国专利第6,090,382号)。优选地,抗体中和hTNF $\alpha$ 活性的能力通过抑制hTNF $\alpha$ 诱导的L929细胞的细胞毒性来评估。作为hTNF $\alpha$ 活性的另一个或替代性参数,可评估作为hTNF $\alpha$ 诱导的细胞活化的量度的抗体抑制hTNF $\alpha$ 诱导的ELAM-1在HUVEC上表达的能力。

[0099] 本文使用的术语“表面等离子共振”是指例如使用BIAcore系统(Pharmacia

Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) 通过检测生物传感器基质内蛋白质的浓度改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。进一步的描述参见美国专利第 6,258,562 号的实施例 1 及 Jönsson 等人 (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19; Jönsson 等人 (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson 等人 (1995) J. Mol. Recognit. 8:125 及 Johnson 等人 (1991) Anal. Biochem. 198:268。

[0100] 本文使用的术语 " $K_{off}$ " 是指抗体从抗体 / 抗原复合物上解离的解离速率常数。

[0101] 本文使用的术语 " $K_d$ " 是指特定抗体 - 抗原相互作用的解离常数。

[0102] 本文使用的术语 " $IC_{50}$ " 是指抑制目的生物终点 (例如中和细胞毒性) 所需要的抑制剂的浓度。

[0103] 本文使用的术语 "核酸分子" 包括 DNA 分子及 RNA 分子。核酸分子可为单链或双链, 但优选为双链 DNA。

[0104] 本文在关于编码结合 hTNF  $\alpha$  的抗体或抗体部分 (例如 VH、VL、CDR3) 的核酸时使用的术语 "分离的核酸分子" 是指以下核酸分子, 其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码结合除 hTNF  $\alpha$  之外的抗原的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列, 其它序列可以天然地位于人类基因组 DNA 中该核酸的侧翼。因此, 例如, 编码抗 hTNF  $\alpha$  抗体的 VH 区的本发明的分离的核酸不含编码结合除 hTNF  $\alpha$  之外的抗原的其它 VH 区的其它序列。

[0105] 本文使用的术语 "载体" 是指能转运另一个已经与它连接的核酸的核酸分子。一种类型的载体为 "质粒", 其指其他 DNA 片段可连接至其中的环状双链 DNA 环。另一类载体为病毒载体, 其中其他 DNA 片段可连接至病毒基因组内。某些载体能在其导入的宿主细胞内自主复制 (例如具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。其它载体 (例如非游离型哺乳动物载体) 可在导入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组内, 且由此随宿主基因组一起复制。此外, 某些载体能引导与它们有效连接的基因的表达。在本文中这些载体被称作 "重组表达载体" (或简称为 "表达载体")。一般而言, 用于重组 DNA 技术中的表达载体通常以质粒形式存在。在本说明书中, "质粒" 与 "载体" 可互换使用, 因为质粒为载体的最常用形式。然而, 本发明包括表达载体的其它形式, 例如起等同作用的病毒载体 (例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒及腺伴随病毒)。

[0106] 本文使用的术语 "重组宿主细胞" (或简称为 "宿主细胞") 是指已将重组表达载体导入其中的细胞。应理解这些术语不仅是指特定受试细胞而且指该细胞的子代。由于在后代中因突变作用或环境影响可发生某些改变, 因此该子代可能实际上不同于亲代细胞, 但仍包括于本文中所使用的术语 "宿主细胞" 的范围内。

[0107] 本文使用的术语 "剂量" 是指给受试者施用的 TNF  $\alpha$  抑制剂的量。

[0108] 术语 "多可变剂量" 包括为治疗目的给受试者施用的 TNF  $\alpha$  抑制剂的不同剂量。"多可变剂量方案" 或 "多可变剂量治疗" 描述基于在整个治疗过程中不同时间点施用不同量的 TNF  $\alpha$  抑制剂的治疗方案。多可变剂量方案描述于 PCT 申请号 PCT/US05/12007 中。

[0109] 本文使用的术语 "给药" 是指为了获得治疗目的 (例如治疗类风湿性关节炎) 而施用物质 (例如抗 TNF  $\alpha$  抗体)。

[0110] 本文使用的术语 "两周一次给药方案"、"两周一次给药" 及 "两周一次施用" 是指为了达到治疗目的而给受试者施用物质 (例如抗 TNF  $\alpha$  抗体) 的时间进程。两周一次

给药方案并不包括每周一次给药方案。优选每隔 9-19 天、更优选每隔 11-17 天、甚至更优选每隔 13-15 天及最优选每隔 14 天施用物质。

[0111] 短语“与第二药剂联合的第一药剂”中的术语“联合”包括共同施用第一药剂及第二药剂,例如它们可溶解于或混合于相同的药学上可接受的载体中,或施用第一药剂随后施用第二药剂,或施用第二药剂随后施用第一药剂。因此,本发明包括联合治疗的方法及联合药物组合物。

[0112] 短语“伴随治疗”中的术语“伴随”包括在第二药剂存在下施用药剂。伴随治疗方法包括共同施用第一、第二、第三或其他药剂的方法。伴随治疗方法也包括在第二或其他药剂存在下施用第一或其他药剂的方法,其中该第二或其他药剂(例如)可以预先施用。伴随治疗方法可由不同执行者逐步执行。例如,一名执行者可给受试者施用第一药剂且第二名执行者给该受试者施用第二药剂,且给药步骤可同时或几乎同时或在不同时间进行,只要该第一药剂(及其他药剂)在该第二药剂(及其他药剂)存在时施用即可。执行者与受试者可为相同的个体(例如人)。

[0113] 本文使用的术语“联合疗法”是指施用两种或两种以上的治疗物质,例如抗 TNF  $\alpha$  抗体及另一种药物。该其它药物可在抗 TNF  $\alpha$  抗体之前或之后或同时施用。

[0114] 本文使用的术语“试剂盒”是指包含为了治疗 TNF  $\alpha$  相关疾病而与其一起施用本发明的 TNF  $\alpha$  抗体的成分的包装产品。该试剂盒优选包含容纳试剂盒成分的盒或容器。该盒或容器附有标签或食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration) 批准的协议。该盒或容器装有优选包含在塑料、聚乙烯、聚丙烯、乙烯或丙烯容器内的本发明的成分。这些容器可为带盖的管或瓶。试剂盒也可包括施用本发明的 TNF  $\alpha$  抗体的说明。在一个实施方案中,本发明的试剂盒包括包含人抗体 D2E7 的制剂,如 PCT/IB03/04502 及美国申请 10/222140 中所述。

[0115] 本发明的各方面在本文中进一步详细描述。

## [0116] II. 软骨降解和脊柱炎生物标志物

[0117] 需要建立一种有意义的强直性脊柱炎 (AS) 评价工具,以能够确定接受 TNF 抑制剂治疗的 AS 患者的改善,特别是早期结构改善。当前,红细胞沉降率 (ESR) 和 C-反应蛋白 (CRP) 水平是最广泛使用的评价 AS 活性的方法,然而,这些标记物单独时不足以评价 AS 疾病的活动性 (Ruof 和 Stucki (1999) J Rheumatol 26 :966)。本发明提供了已被鉴定为在评价抗-TNF 治疗防止患者中与 AS 有关的结构损伤的能力方面有用的生物标志物。另外,本发明提供了一种测定患者对与 AS 有关的关节结构破坏改善的应答的方法。本文所述的方法鉴定患者的结构损伤进展的变化,这种变化使用其它传统方法如放射照相法可能无法容易地检测出。本发明的方法是有利的,因为它们给医生提供了一种测定抗 TNF 治疗在患者中的有效性的手段,而不需要等待临床结果,这种等待可能要花费很长的时间。

[0118] 通常,本发明包括将来自 AS 患者或怀疑患有 AS 的患者的生物标志物水平和与疾病活动性有关的已知标准水平进行比较,以确定患者的生物标志物水平相对于对照是升高、降低还是相同。在测定 TNF 抑制剂治疗患者 AS 的有效性时,特别是在改善结构损伤方面,可以预先测定生物标志物水平,或者,可以包括从患者中获得样品,然后在本发明的比较评价中使用从该样品测定的生物标志物水平。

[0119] 本发明鉴定了某些与包括软骨降解和滑膜炎在内的结构破坏有关的生物标志物,

这些生物标志物可以用来确定选择的抗 TNF 治疗是否足以进行治疗或者是否应当考虑不同的治疗,包括不同的抗 TNF 治疗。这种预测手段有益于受试者的总体健康,因为可以进行较快的应答来确定适当的治疗。本文所述的方法也通过快速取消无效治疗而降低了治疗方法的总费用。

[0120] 本发明提供一种测定 TNF 抑制剂在治疗脊椎关节病例如强直性脊柱炎中的有效性的方法,包括测定软骨破坏和滑膜炎的生物标志物。根据 TNF 抑制剂减少已知反映受试者中与软骨降解和 / 或滑膜炎有关的疾病活动性的生物标志物的能力来测定有效性。

[0121] 在一个实施方案中,本发明包括一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂例如人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗强直性脊柱炎 (AS) 中的有效性的方法,其中将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后 AS 患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的预先测定的水平 (治疗后生物标志物水平) 和与疾病状态有关的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较。一旦比较两个水平,即确定患者的治疗后胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平是否低于已知标准水平,其中来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示 TNF  $\alpha$  抑制剂在 AS 的治疗方面有效。

[0122] 在另外一个实施方案中,本发明提供一种测定 TNF 抑制剂例如人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分对于强直性脊柱炎 (AS) 的有效性的方法,包括将从 AS 患者获得的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的治疗前水平和从该患者获得的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的治疗后水平进行比较,其中较低的治疗后生物标志物水平指示 TNF 抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性。

[0123] 通过降低与软骨降解和 / 或滑膜炎有关的生物标志物的水平, TNF 抑制剂可以用来减轻或防止与 AS 有关的结构损伤。在一个方面,本发明提供一种监测 TNF 抑制剂例如人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在减缓患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤进展方面的有效性的方法,包括测定患者中胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的水平,并且将该胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的水平和与 AS 有关的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较。在这种情况下,患者生物标志物水平相对于已知标准水平降低指示 TNF 抑制剂在减慢患者中与 AS 有关的结构损伤进展速度方面有效。

[0124] 在另一方面,本发明提供一种预测 TNF 抑制剂例如人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 中的有效性的方法,包括将来自人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分治疗后患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的预先测定的水平和来自 AS 患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平进行比较。基于两个生物标志物水平,评价患者的治疗后胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平是否低于胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平。在这种情况下,来自患者的胶原降解生物标志物和 / 或滑膜炎生物标志物水平低于已知标准水平指示预测人 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 方面有效。

[0125] 在上述情况中确定 TNF 抑制剂可以有效减少与软骨破坏和 / 或滑膜炎有关的生物标志物,这反映了结构破坏即关节破坏的减少,在这种情况下可以考虑继续 TNF 抑制剂治疗。在一个实施方案中,可以考虑给患者应用相同的剂量方案。或者,可以考虑减少证明在

治疗患者 AS 中有效的 TNF 抑制剂的剂量。

[0126] 本发明提供一种单独使用或与滑膜炎生物标志物结合使用软骨降解生物标志物的方法,以及一种单独使用或与软骨降解生物标志物结合使用滑膜炎生物标志物测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性的方法。

[0127] 另外,可以对来自尚未接受 TNF 抑制剂治疗的患者的样品进行胶原降解和 / 或滑膜炎生物标志物的分析。可以进行胶原降解和滑膜炎生物标志物的分析,来确定患者是否可能对抗 -TNF  $\alpha$  抗体例如阿达木单抗治疗有反应。来自患者样品的胶原降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平与表征为 AS 指示水平的已知标准水平相当可以指示该患者患有 AS,因此是 TNF 抑制剂治疗的候选者。因此,可以选择这名患者进行抗 -TNF  $\alpha$  抗体例如阿达木单抗治疗,以防止可能随疾病进展而发生的结构损伤。

[0128] 在一个实施方案中,对照水平是基于患者自身的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的基线水平,其中基线水平在 TNF 抑制剂治疗前测定。在这种情况下,将治疗后测定的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平与患者的基线水平进行比较。之后,根据治疗后患者中软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平是否降低,确定 TNF 抑制剂是否有效。在另外一个实施方案中,用作对照的基线水平基于患者自身在 TNF 抑制剂治疗特定时间点的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平,其中将治疗过程中特定时间点的基线水平与之后特定时间的生物标志物水平进行比较,同时患者继续治疗。

[0129] 在一个实施方案中,已知标准水平基于与疾病状态有关的、即与 AS 患者有关的公认的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平。软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平可能基于单个 AS 患者,或者基于从一组 AS 患者获得的平均值。例如,在一个实施方案中,AS 患者的血清 MMP-3 的已知标准水平为大约 10-200、大约 15-180、大约 20-140、大约 30-120、大约 40-100、大约 50-80、大约 25-57、或大约 60-70ng/ml。在另外一个实施方案中,AS 患者的尿 CTX-II 的已知标准水平为大约 300-1000、大约 300-800、大约 300-600、大约 315-395、大约 320-390、大约 325-385、大约 330-380、大约 325-385、大约 324-388、大约 335-375、大约 340-370、大约 345-365、或大约 350-360ng/ml。

[0130] 或者,在另外一个实施方案中,已知标准水平可能基于健康、未受影响的受试者的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平。软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的已知标准水平可能基于单个未受影响的健康受试者,或者基于来自一组未受影响的健康受试者的平均值。尿 CTX-II 正常值的实例,即来自健康非 AS 受试者的值,描述于 Haima (2005) Osteo Medical Group Clinical and Technical Monograph 和 Mouritzen 等人. (2003) Annals of the Rheumatic Diseases 62 :332 中。例如,在一个实施方案中,未受影响的健康受试者的血清 MMP-3 的已知标准水平为大约 13 至 15ng/ml (参见,Chen 等人. (2006) Rheumatology 45 : 414)。

[0131] 介于上述生物标志物水平中间的范围,例如大约 323 至大约 329mg/ml 的尿 CTX-II,也是本发明的一部分。另外,也包括使用上述任意数值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。另外,上述上限并非意在限制 AS 患者中升高的 MMP-3 和 CTX-II 水平。

[0132] 如果软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平相对于对照较高 / 升高或较低 / 降低,则认为该水平相对于对照即患者自身的治疗前水平或已知标准水平发生改变。在一个实施方案中,如果来自于 AS 患者的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平比对照水平高

/ 增加大于用来分析该水平的试验的标准差的量,则认为该软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平相对于对照水平较高 / 增加。在一个实施方案中,如果来自于 AS 患者的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平比对照水平低 / 降低大于用来分析该水平的试验的标准差的量,则认为该软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平相对于对照水平较低 / 降低。在另外一个实施方案中,如果对照水平与来自于患者样品的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物水平的差异比对照和样品测定值的标准差至少高或低大约 2、3、4 或 5 倍,则认为来自于患病患者的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平比对照水平高 / 增加或低 / 降低。

[0133] 在一个实施方案中,当受试者的 CTX-II 水平基线或已知标准水平降低至少约 5-100%、大约 5-80%、大约 5-60%、大约 5-45%、大约 5-40%、大约 5-35%、大约 5-30%、大约 5-25%、大约 5-20%、大约 5-15%、大约 5-10%、大约 6-9%、大约 7-8% 或大约 9% 时,证明 TNF 抑制剂的有效性。在一个实施方案中,当 MMP-3 水平相对于患有 AS 的受试者的基线或已知标准水平至少降低大约 5-50%、大约 5-45%、大约 5-40%、大约 5-35%、大约 5-30%、大约 5-25%、大约 5-20%、大约 5-15%、大约 5-13%、大约 6-12%、大约 7-11% 或大约 8% 时,证明 TNF 抑制剂的有效性。在另外一个实施方案中,当 MMP-3 水平相对于患有 AS 的受试者的基线或已知标准水平至少降低大约 12% 时,证明 TNF 抑制剂的有效性。

[0134] 介于上述生物标志物水平之间的范围,例如大约 8% 至大约 10%,也是本发明的一部分。另外,也包括使用上述任意数值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。另外,上述上限并非意在限制 AS 患者中降低的 MMP-3 和 CTX-II 水平的百分比,即本发明也涉及较高百分比的降低。

#### [0135] 软骨降解生物标志物

[0136] 关节软骨主要由与蛋白聚糖 - 聚集蛋白聚糖 (aggrecan) 复合的基于 II 型胶原的纤维网络组成 (参见 Poole AR, 2003. Rheum Dis Clin North Am 29 :803-818 和 Eyre (1991) Semin Arthritis Rheum. 21 (3Suppl2) :2-11)。在关节疾病中, II 型胶原被胶原酶逐渐切割。II 型胶原降解,使得降解过程的产物根据胶原分子内特定表位的定位而落入三个组中 (综述见 Birmingham 等人. (2006) Biomarker Insights 2 :61,在此引入作为参考)。不同类型的表位,包括新表位 (neoepitopes) 和端肽表位,可以用作与胶原有关的降解事件的指示。

[0137] 成熟 II 型胶原由三螺旋结构组成,在两端具有短的端肽。端肽与其他胶原链共价交联,用来连接个体胶原分子到刚性纤维网络中。当软骨胞外基质降解时,产生成熟胶原的片段。这些片段在血清和尿中发现,并且可以作为软骨代谢的标记来测定。端肽包括 col2CTx 和 CTX-II (W091/08478 ;Christgau 等人. (2001) Bone 29 :209 ;Matyas 等人. (2004) Arthritis Rheum 50 :543 ;和 Eyre (1989) "Peptide fragments containing HP and LP cross-links, USP5702909,均在此引入作为参考)。

[0138] 蛋白质分解导致 II 型胶原表位向体液的损失,因此,通过检测体液中的 II 型胶原表位,可以测定胶原降解的程度 (参见 Birmingham 等人. (2006) Biomarker Insights 2 :61 和 Christgau 等人. (2001) Bone 29 :209,均在此引入作为参考)。从临床观点来看,监测和延缓或逆转胶原降解过程的能力是重要的,因为成熟交联 II 型胶原纤维的广泛降解被认为是关节破坏中关键的、可能甚至是不可逆的阶段 (Billingham 等人. (1997))。

[0139] 本发明在此描述了使用软骨降解生物标志物测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性的

应用, AS 具有包括结构损伤即关节损伤的疾病成分。在一个实施方案中, 在本发明的方法和组合物中使用几乎仅仅定位于软骨中的 CTX-II, 作为软骨断裂的生物标志物。

#### [0140] CTX-II

[0141] 在一个优选实施方案中, 胶原降解生物标志物是 II 型胶原 C- 端肽 (CTX-II)。CTX-II 是胶原的片段, 从 C- 末端 II 型胶原开始。CTX-II 与新表位 Col2CTx 相同, 在切割的 II 型胶原的 1/4 长度片段的 C 末端处发现 (综述见 Birmingham 等人. (2006), 在此引入作为参考)。

[0142] CTX-II 已知为软骨降解的生物标志物。CTX-II 首先与膝骨关节炎患者的软骨降解有关 (Gamero 等人. (2001) Annals Rheum Dis 60 :619), 其中确定在重度骨关节炎患者的尿中 CTX-II 随后升高 (Jung 等人. (2004) Pathobiol 171 :70)。CTX-II 也已证明与关节破坏程度相关 (Christgau 等人. (2001) Bone 29 :209 ;Garnero 和 Delmas (2003) Curr Op Rheumat 25 :641)。

[0143] 在一个方面, 本发明提供一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法, 包括将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后患者的 CTX-II 的预先测定的水平和与 AS 相关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较。然后进行关于两个 CTX-II 水平之间关系的评价, 以确定患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平。CTX-II 水平低于代表 AS 疾病状态的已知标准指示 TNF  $\alpha$  抑制剂在患者 AS 的治疗方面有效。在这种情况下, 已知标准水平代表来自具有 AS 疾病活动性的受试者、即受影响的未治疗的患者的 CTX-II 水平。

[0144] 在一个方面, 本发明提供一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与强直性脊柱炎 (AS) 有关的结构损伤方面的有效性的方法, 包括将来自 TNF  $\alpha$  抑制剂治疗后 AS 患者的 CTX-II 的预先测定的水平和与 AS 相关的 CTX-II 的已知标准水平进行比较。然后进行关于两个 CTX-II 水平的评价, 以确定患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于 CTX-II 的已知标准水平。如果患者的 CTX-II 水平低于 CTX-II 的已知标准水平, 则该结果表示 TNF  $\alpha$  抑制剂在减轻患者中与 AS 有关的结构损伤方面有效。

[0145] 在一个实施方案中, 本发明描述了一种测定 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面的有效性的方法, 包括将从患者获得的预先测定的治疗后 CTX-II 水平和从该患者获得的预先测定的治疗前 CTX-II 水平进行比较。然后进行关于两个 CTX-II 水平的评价, 以确定患者的治疗后 CTX-II 水平是否低于治疗前 CTX-II 水平, 其中来自患者的治疗后 CTX-II 水平低于治疗前 CTX-II 水平指示 TNF  $\alpha$  抑制剂在治疗患者的 AS 方面有效。

#### [0146] 滑膜炎生物标志物

[0147] 现在已知滑膜炎 (炎症) 在炎性疾病例如骨关节炎的早期发生, 并且与疾病的放射学进展相关。炎症 (包括亚临床炎症) 可能加重关节损伤的过程可能涉及软骨细胞功能的变化、增加的血管发生、和 / 或加速的骨更新 (Bonnet 和 Walsh DA. (2005) Rheumatology 44 :7-16)。本发明在此描述了使用滑液生物标志物测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性的应用。在一个实施方案中, 使用可能起源于发炎关节的血清 MMP-3 (Kruihof 等人. (2005) Arthritis Rheum 52 :3898) 作为滑膜炎生物标志物, 来测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性。

#### [0148] MMP-3

[0149] 软骨基质分子的降解涉及依赖于锌的骨肽酶, 即基质金属蛋白质酶 (MMP)。MMP 是

依赖于  $Zn^{2+}$  的内肽酶家族,切割胞外基质 (ECM) 组分,如胶原和蛋白聚糖。MMP 通过消化胞外基质的成分介导不同的生理过程。

[0150] MMP3 是一种降解纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原 III、IV、IX 和 X 和软骨蛋白聚糖的酶。当前至少存在 20 种人 MMP,它们根据结构和特异性底物分组为:胶原酶 (MMP-1, -8, -13)、溶基质蛋白酶 (stromelysin)、明胶酶 (MMP-2, -9) 和血浆膜结合金属蛋白酶 (参见,例如, Nabeshima K 等人. 2002 Pathol Int 52:255-64)。

[0151] 在一个优选实施方案中,在本发明中使用的滑膜炎生物标志物是 MMP-3。已经表明 MMP-3 血清水平在以关节滑膜炎为特征的炎性风湿性疾病如 RA、风湿性多肌痛、银屑病关节炎和急性结晶性关节炎中升高。MMP-3 血清水平公认为反映滑液的炎症 (参见 Ribbens 等人. (2002) Annals of the Rheumatic Diseases 61:161)。另外,以前的研究已经将基质金属蛋白酶 (MMPs),特别是 MMP-3 (溶基质蛋白酶 1),与 AS 患者的 Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数 (BASDAI) 值相关联 (参见 Yang, C. 等人. (2004) Arthritis Rheum 51:691-9)。

[0152] MMP-3 的氨基酸序列是已知的,可见于例如 GenBank 保藏号 AAI07491。MMP-3 的核苷酸序列也是已知的,可见于例如 GenBank 保藏号 NM002422。

[0153] 本发明进一步包括软骨降解生物标志物例如 CTX-II 和滑膜炎生物标志物例如 MMP-3 单独或彼此组合实现本发明的方法的应用。另外,生物标志物可以与 C-反应蛋白联用,以进一步测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性。

[0154] C-反应蛋白 (CRP) 水平可以与软骨降解生物标志物例如 CTX-II 和滑膜炎生物标志物例如 MMP-3 组合应用,作为 AS 疾病状态和特定抗 TNF 治疗有效性的指示。CRP 属于五聚环蛋白 (pentraxin) 蛋白质家族,这样叫是因为它具有由染色体 1 上的一个基因编码的五个相同的亚单位,它们结合形成稳定的圆盘样五聚体结构。CRP 只在肝脏中形成,并且在急性炎性刺激的 6 个小时内以增加的量分泌。升高的 CRP 水平提供了灵敏的炎症的指标,因此为仔细的临床评价提供了有价值的帮助。

#### [0155] 测定生物标志物水平的试验

[0156] 样品中软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平可以用本领域公知的大量方法来分析。一旦从患者获得样品,即可以使用任何本领域公知适合检测和定量用于本发明方法的软骨降解或滑膜炎生物标志物的方法 (在核酸水平上,或者优选地在蛋白质水平上)。这些方法在本领域中众所周知,包括但不限于 Western blots、Northern blots、Southern blots、免疫组化、ELISA 例如扩增 ELISA、基于血液的定量测定例如血清 ELISA、基于尿的定量测定例如在 CTX-II 的情况下检测蛋白质表达或降解水平、免疫沉淀、免疫荧光、流式细胞术、免疫细胞化学、质谱分析例如 MALDI-TOF 和 SELDI-TOF、核酸杂交技术、核酸逆转录方法、和核酸扩增方法。这些测定的实例在下面更详细地描述:

#### [0157] 基于蛋白质的测定

[0158] 本发明的方法可以用基于蛋白质的测定进行,以测定特定生物标志物的水平。基于蛋白质的测定的例子包括免疫组化和 / 或 Western 分析、基于血液的定量分析例如血清 ELISA 和基于尿液的定量分析例如尿 ELISA。在一个实施方案中,进行免疫测定来提供特定生物标志物的定量评价。

[0159] 可以利用本领域公知的技术从患者样品中分离蛋白质。使用的蛋白质分离方法可以是,例如,Harlow 和 Lane 公开的方法 (Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies :A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

[0160] 软骨降解或滑膜炎生物标志物的量可以通过检测或定量相应表达的多肽来测定。多肽可以利用本领域技术人员公知的大量方法中的任意一种来检测和定量。这些方法可以包括分析生物化学方法,如电泳、毛细管电泳、高效液相层析 (HPLC)、薄层层析 (TLC)、超扩散层析 (hyperdiffusion chromatography) 等,或者各种免疫学方法,如液体或凝胶沉淀素反应、免疫扩散 (单向或双向)、免疫电泳、放射免疫测定 (RIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光测定和 Western 印迹法。

[0161] 在一个实施方案中,软骨降解或滑膜炎生物标志物的水平可以利用免疫试验来测定。可以利用针对本文所述的生物标志物的抗体筛选人生物样品,例如液体,测定特定生物标志物抗原,即胶原降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平。例如,可以从患者采集人液体,如血液、血清或尿,在例如本领域公知的标准 RIA 或 ELISA 中利用抗生物标志物抗体测定样品液体中作为释放的抗原或在样品液体中细胞上与膜结合的特定表位。这些方法中使用的抗体优选地是单克隆抗体。在一个实施方案中,从患者采集的血清的体外免疫血清学评价允许基于相应生物标志物的血清水平非侵入性地测定软骨退化的进展或减轻,以及滑膜炎的加重或减轻。在一个实施方案中,进行定量分析软骨降解的免疫测定,以测定人尿中的 CTX-II 水平。在一个实施方案中,进行定量分析滑膜炎的免疫测定,以测定人血清中的 MMP-3 水平。

[0162] 在免疫测定中,检测软骨降解或滑膜炎生物标记多肽的试剂可以是能够与软骨降解或滑膜炎生物标记蛋白质结合的抗体。抗体可以是多克隆抗体,或者更优选地,是单克隆抗体。可以使用完整抗体或其片段 (例如 Fab 或  $F(ab')_2$ )。

[0163] 在一个实施方案中,在免疫测定例如 ELISA 中使用抗 CTX-II (包括尿 CTX-II) 的抗体,以测定来自 AS 患者的样品中的 CTX-II 水平。在一个实施方案中,可以测定来自患者的尿或血清样品中的 CTX-II 水平。在一个实施方案中,可以在本发明的抗体和组合物中用于检测和定量人尿 CTX-II 的抗体是单克隆抗体 mAbF46 (见 Christgau 等人. (2001) Bone 29 :209) 和 F4601 (见 Oestergaard 等人. (2006) Osteoarthritis Cartilage. 14(7) : 670)。

[0164] 在一个实施方案中,在免疫测定例如 ELISA 中使用抗 MMP-3 (包括血清 MMP-3) 的抗体,以测定来自 AS 患者的样品中 MMP-3 的水平。在一个实施方案中,可以在来自患者的血清样品中测定 MMP-3。在一个实施方案中,用于检测和定量人血清 MMP-3 的抗体是单克隆抗体 mAb1B4 (Murray GI 等人. Gut 43 :791-7 (1998))。

[0165] 可以利用竞争性结合试验测定对应于胶原降解和 / 或滑膜炎生物标志物的蛋白质的水平。竞争性结合试验的一个例子是酶联免疫吸附夹心测定 (ELISA)。可以利用 ELISA 检测样品中胶原降解和 / 或滑膜炎生物标志物的存在。ELISA 是一种灵敏的免疫测定,它使用与抗体或抗原连接的酶作为检测特异性蛋白质特别是抗原或抗体的标记物。ELISA 是这样一种测定,其中通过连接的酶检测结合的抗原或抗体,该酶通常将无色底物转化为有颜色的产物,或可以检测到的产物。最常用的一种类型的 ELISA 是“夹心 ELISA”。在一个实施方案中,利用 ELISA 试验测定软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的水平。

[0166] 另外,本领域技术人员可以容易地将已知的蛋白质 / 抗体检测方法应用于测定本发明标记 (即 CTX-II 和 / 或 MMP-3) 的量。

[0167] 用于测定作为关节破坏生物标志物的 CTX-II 的方法在本领域中公知,例如在 Oestergaard 等人.(2006)Osteoarthritis Cartilage.14(7):670 和 Mouritzen 等人.(2003)Annals of the Rheumatic Diseases62:332 中描述,所述文献引入本文作为参考。用于测定 CTX-II 水平的试验在商业上可以获得,包括,例如, Urine **Cartilaps**<sup>®</sup> 和 Serum **Cartilaps**<sup>®</sup> (Nordic Bioscience Diagnostics)。Urine **Cartilaps**<sup>®</sup> 测定已经在临床研究中用于定量分析类风湿性关节炎和骨关节炎中的软骨降解。例如, Urine **CartiLaps**<sup>®</sup> ELISA 基于单克隆抗体与 II 型胶原的尿片段即 CTX-II 或与结合到链霉抗生物素包被的微量滴定板表面上的生物素化合成肽的竞争性结合。在开始时,生物素化的合成肽与链霉抗生物素包被的微量滴定板孔的表面结合。洗涤后,将标准、对照和尿样移液到孔中,然后加入单克隆抗体溶液。洗涤孔,向孔中加入过氧化物酶偶联的抗小鼠免疫球蛋白(兔)溶液。第二次洗涤步骤后,向所有孔中加入显色底物,用硫酸终止颜色反应,测量吸光度。关于如何利用 ELISA 测定 CTX-II 的其它例子在 Christgau(2001Bone29:209 中描述,在此引用作为参考。

[0168] 在一个实施方案中,进行免疫测定来测定人血清中滑膜炎生物标志物 MMP-3 的水平。测定作为滑膜炎生物标志物的 MMP-3 的方法在本领域中公知,例如描述于 Tamarat 等人.(2003)PNAS100:8555 中。另外,可用于检测 MMP-3 蛋白质水平的商品试剂盒包括人基质金属蛋白酶-3Biotrak ELISA 系统(Human Matrix Metalloproteinase-3Biotrak ELISA system)(Amersham)(参见, Yang 等人.(2004)Arthritis and Rheumatism51:691)。描述如何测定 MMP-3 蛋白的其它例子在 Chen 等人.(2006)Rheumatology45:414 中描述。

[0169] 在一个实施方案中,在诸如印迹法或免疫荧光技术的方法中使用抗体或抗体片段来检测表达的蛋白质。在这些应用中,通常优选地将抗体或蛋白质固定在固体支持物上。合适的固相支持物或载体包括任何能够结合抗原或抗体的支持物。众所周知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿。

[0170] 本领域技术人员应当知道许多其他合适的用于结合抗体或抗原的载体,并且将能够将这些载体用于本发明。例如,从细胞中分离的蛋白质可以在聚丙烯酰胺凝胶电泳上电泳,并且固定在固相支持物如硝酸纤维素上。然后可以用适当的缓冲液洗涤支持物,然后用可检测的标记抗体处理。然后可以用缓冲液第二次洗涤固相支持物,以除去未结合的抗体。然后通过常规方法检测固相支持物上结合的标记物的量。使用电泳技术检测蛋白质的方法是本领域技术人员公知的(总的参见, R. Scopes(1982)Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.;Deutscher, (1990)Methods in Enzymology Vol.182:Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y.)。

[0171] 使用抗体检测和定量胶原降解和/或滑膜炎标记的其它标准方法包括但不限于放射免疫测定("RIA")、受体测定、酶免疫测定("EIA")、细胞化学生物测定、配体测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、和酶联免疫吸附测定("ELISA")。进一步的方法包括易于检测和其定量性质的夹心或双抗体测定,其具有大量变化形式,均包括在本发明内。这些方法是公知的,本领域技术人员理解其需要适量的实验来优化抗体和抗原之间的相互作用以及用抗体对抗原的检测。这些和其它免疫测定技术可见于 Principles And Practice

Of Immunoassay, 2nd Edition, Price and Newman, eds., MacMillan (1997) 和 Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Ch. 9 (1988), 均在此全文引入作为参考。

[0172] 在本领域公知的和本文描述的免疫测定中用来测定生物标志物水平的抗体可以用检测标记物进行标记。术语“标记”对于探针或抗体而言, 包括通过偶联(即物理连接)可检测物质与探针或抗体而对探针或抗体的直接标记, 以及通过与直接标记的另外一种试剂的反应性而对探针或抗体的间接标记。间接标记的例子包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体, 用生物素末端标记 DNA 探针, 使其可以用荧光标记的链霉抗生物素检测到。

[0173] 在一个实施方案中, 抗体是标记的, 例如放射性标记的、生色团标记的、荧光团标记的、或酶标记的抗体。在另外一个实施方案中, 抗体衍生物(例如与底物或蛋白质-配体对(例如生物素-链霉抗生物素)的蛋白质或配体偶联的抗体, 或抗体片段(例如单链抗体, 分离的抗体超变域等, 它们特异性结合软骨降解或滑膜炎生物标记蛋白质。

[0174] 在本发明的一个实施方案中, 蛋白质组方法, 例如质谱法, 用于检测和定量软骨降解或滑膜炎生物标志物。例如, 基质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)或表面增强的激光解吸/电离飞行时间质谱法(SELDI-TOF MS)涉及将生物样品如血清加样到蛋白质结合芯片上(Wright, G. L., Jr., 等人.(2002)Expert Rev Mol Diagn 2: 549; Li, J., 等人.(2002)Clin Chem 48: 1296; Laronga, C., 等人.(2003)Dis Markers 19: 229; Petricoin, E. F., 等人.(2002)359: 572; Adam, B. L., 等人.(2002)Cancer Res 62: 3609; Tolson, J., 等人.(2004)Lab Invest 84: 845; Xiao, Z., 等人.(2001)Cancer Res 61: 6029), 可以用来检测和定量软骨降解或滑膜炎生物标志物。质谱法例如在美国专利 Nos. 5, 622, 824, 5, 605, 798 和 5, 547, 835 中描述, 其完整内容均在此引入作为参考。

[0175] RNA

[0176] 在一个实施方案中, 编码所述生物标志物的 mRNA 的水平可以利用本领域公知的方法例如 Northern 分析来测定。生物标志物的基因表达可以在 RNA 水平上检测。可以利用 RNA 提取技术从细胞中提取 RNA, 包括, 例如, 使用酸酚/异硫氰酸胍提取法(RNAzol B; Biogenesis)、RNeasy RNA 制备试剂盒(Qiagen)或 PAXgene (PreAnalytix, Switzerland)。使用核糖核酸杂交的典型测定形式包括核连缀测定(nuclear run-on assays)、RT-PCR、RNase 保护测定(Melton 等人., Nuc. Acids Res. 12: 7035)、Northern 印迹法和原位杂交。基因表达也可以利用如下所述的微阵列分析来检测。

[0177] 对于 Northern 印迹法, 首先通过变性条件下的琼脂糖凝胶电泳按大小分离 RNA 样品。然后将 RNA 转移到膜上, 交联, 并且与标记的探针杂交。可以使用非同位素或高特异性放射标记的探针, 包括随机引发的、缺口平移的、或 PCR 产生的 DNA 探针, 体外转录的 RNA 探针和寡核苷酸。另外, 只有部分同源性的序列(例如来自不同种的 cDNA 或可能含有外显子的基因组 DNA 片段)也可以用作探针。

[0178] 核酸酶保护测定(包括核糖核酸酶保护测定和 S1 核酸酶测定)提供了一种极其灵敏的检测和定量特定 mRNA 的方法。NPA 的基础是反义探针(放射性标记的或非同位素的)与 RNA 样品的溶液杂交。杂交后, 未杂交的单链探针和 RNA 被核酸酶降解。剩余的被保护的片段在丙稀酰胺凝胶上分离。NPA 允许同时检测几种 RNA 种类。

[0179] 原位杂交(ISH)是有力的和通用的定位细胞或组织中的特定 mRNA 的工具。探针

的杂交发生在细胞或组织内。由于细胞结构在整个过程中保持,因此 ISH 提供关于组织样品内 mRNA 位置的信息。

[0180] 程序开始于在中性缓冲的福尔马林中固定样品,将组织包埋在石蜡中。然后将样品切成薄片,固定在显微镜载玻片上。(或者,可以将组织冷冻切片,并且在低聚甲醛中后固定(post-fix))。在一系列洗涤以使切片脱蜡和再水合后,进行蛋白酶 K 消化,以提高探针的可及性,然后使标记的探针与样品切片杂交。放射标记的探针用在载玻片上干燥的液膜显示,而非同位素标记的探针用比色和荧光试剂常规检测。后一种检测方法是荧光原位杂交(FISH)的基础。

[0181] 可以使用的检测方法包括放射性标记、酶标记、化学发光标记、荧光标记和其它合适的标记。

[0182] 一般而言,利用 RT-PCR 扩增 RNA 靶标。在该方法中,利用逆转录酶将 RNA 转化为互补 DNA(cDNA),然后可以将其扩增,以利于检测。相对定量 RT-PCR 包括与目标基因同时扩增内部控制(internal control)。内部控制用来将样品标准化。一旦标准化,即在样品之间进行特定 mRNA 相对丰度的直接比较。常用的内部控制包括,例如,GAPDH、HPRT、肌动蛋白和亲环蛋白(cyclophilin)。

[0183] 多种 DNA 扩增方法是已知的,其中大多数依赖于酶促链反应(如聚合酶链反应、连接酶链反应、或自动维持序列扩增)或克隆到其中的所有或部分载体的复制。

[0184] 许多靶标和信号扩增(TAS)方法已经在文献中描述,例如,这些方法的综述见 Landegren, U. 等人., Science242:229-237(1988) 和 Lewis, R., Genetic Engineering News10:1,54-55(1990)。PCR 是本领域中常见的核酸扩增方法,尤其在美国专利 Nos. 4,683,195 和 4,683,202 中描述。PCR 可以用来在诊断应用中扩增任何已知的核酸(Mok 等人.,1994,Gynaecologic Oncology52:247-252)。自动维持序列扩增(3SR)是 TAS 的变化形式,包括通过连续几轮由酶混合物和适当的寡核苷酸引物介导的逆转录酶(RT)、聚合酶和核酸酶活动,核酸模板的等温扩增(Guatelli 等人.,1990,Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:1874)。连接扩增反应或连接扩增系统使用 DNA 连接酶和四种寡核苷酸,每个靶链两种。该技术由 Wu, D. Y. 和 Wallace, R. B.,1989, Genomics4:560 描述。在 Q $\beta$  复制酶技术中,用于噬菌体 Q $\beta$  的复制单链 RNA 的 RNA 复制酶,用来扩增靶 DNA,如 Lizardi 等人.,1988, Bio/Technology6:1197 所述。定量 PCR(Q-PCR)是一种允许测定样品内转录物的相对量的技术。

### [0185] III. TNF 抑制剂

[0186] 本发明描述一种测定 TNF $\alpha$  抑制剂例如人 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗强直性脊柱炎(AS)中的有效性的方法。本发明还提供一种监测 TNF $\alpha$  抑制剂例如人 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在减缓患者中与强直性脊柱炎(AS)有关的结构损伤进展方面的有效性的方法。本发明进一步包括一种预测 TNF $\alpha$  抑制剂例如人 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分在治疗患者的 AS 中的有效性的方法。也包括涉及要求保护的方法的组合物和试剂盒作为本发明的部分。

[0187] 在一个实施方案中,这些方法包括测定分离的人抗体或其抗原结合部分的有效性,该人抗体或其抗原结合部分以高亲和力和低解离速度与人 TNF $\alpha$  结合,并且具有高中和能力。优选地,本发明使用的人抗体为重组、中和人抗-hTNF $\alpha$  抗体。本发明的最优选的

重组、中和抗体在本文中称作 D2E7, 也称作 **HUMIRA**<sup>®</sup> 及阿达木单抗 (D2E7VL 区的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :1 中 ;D2E7VH 区的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :2 中)。D2E7 (阿达木单抗 / **HUMIRA**<sup>®</sup>) 的性质已描述于 Salfeld 等人, 美国专利 No. 6, 090, 382、6, 258, 562 及 6, 509, 015 中, 均引入本文作为参考。本发明的方法也可以使用已进行治疗类风湿性关节炎的临床试验的嵌合及人源化鼠抗 hTNF  $\alpha$  抗体进行 (参见例如 Elliott 等人 (1994) Lancet 344 :1125-1127 ;Elliot 等人 (1994) Lancet 344 :1105-1110 ;Rankin 等人 (1995) Br. J. Rheumatol. 34 :334-342)。

[0188] 在一个实施方案中, 本发明的方法包括测定 D2E7 抗体及抗体部分、与 D2E7 相关的抗体及抗体部分及具有与 D2E7 等同性质 (例如以低解离动力学结合 hTNF  $\alpha$  的高亲和力及高中和能力) 的其它人抗体及抗体部分在 AS 治疗中的有效性。在一个实施方案中, 本发明提供用分离的人抗体或其抗原结合部分的治疗, 该分离的人抗体或其抗原结合部分以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $K_d$  与  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离, 并在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。更优选地, 该分离的人抗体或其抗原结合部分以  $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$ , 或甚至更优选以  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  与人 TNF  $\alpha$  解离。更优选地, 该分离的人抗体或其抗原结合部分在标准体外 L929 分析中以  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$ , 甚至更优选以  $1 \times 10^{-9} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$ 、更优选以  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  或更低的  $\text{IC}_{50}$  中和人 TNF  $\alpha$  细胞毒性。在一个优选实施方案中, 该抗体为分离的人重组抗体或其抗原结合部分。

[0189] 本领域公知抗体重链及轻链 CDR3 域在抗体对抗原的结合特异性 / 亲和力中起重要作用。因此, 在另一方面, 本发明涉及预测患者对 AS 治疗的应答的方法, 其中所述治疗包括施用具有与 hTNF  $\alpha$  结合的低解离动力学且具有结构上与 D2E7 相同或相关的轻链及重链 CDR3 域的人抗体。D2E7VL CDR3 的位置 9 可由 Ala 或 Thr 占据而不会显著影响  $K_{\text{off}}$ 。因此, D2E7VL CDR3 的共有基序包含氨基酸序列 :Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO :3)。另外, D2E7VH CDR3 的位置 12 可由 Tyr 或 Asn 占据而不会显著影响  $K_{\text{off}}$ 。因此, D2E7VH CDR3 的共有基序包含氨基酸序列 :V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO :4)。此外, 如美国专利 No. 6, 090, 382 的实施例 2 中所述, D2E7 重链及轻链的 CDR3 域适合以单一丙氨酸残基 (在 VLCDR3 内的位置 1、4、5、7 或 8 或在 VH CDR3 内的位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11) 置换而基本不影响  $K_{\text{off}}$ 。另外, 熟练技术人员应当理解, 如果 D2E7VL 及 VH CDR3 域适合丙氨酸置换, 则 CDR3 域内其它氨基酸的置换可以是可能的, 同时仍保持抗体的低解离速率常数, 尤其是用保守氨基酸置换。优选地, 在 D2E7VL 和 / 或 VH CDR3 域内进行不超过 1 至 5 个保守氨基酸的置换。更优选地, 在 D2E7VL 和 / 或 VH CDR3 域内进行不超过 1 至 3 个保守氨基酸的置换。另外, 保守氨基酸置换不应在对结合 hTNF  $\alpha$  而言关键的氨基酸位置上进行。D2E7VL CDR3 的位置 2 和 5 和 D2E7VH CDR3 的位置 1 和 7 看来对于与 hTNF  $\alpha$  的相互作用是关键的, 并且因此优选地不在这些位置上进行保守氨基酸置换 (尽管如上所述在 D2E7VL CDR3 的位置 5 上进行丙氨酸置换是可接受的) (参见美国专利 No. 6, 090, 382)。

[0190] 因此, 在另外一个实施方案中, 本发明提供测定 AS 治疗有效性的方法, 包括施用分离的人抗体或其抗原结合部分。该抗体或其抗原结合部分优选地具有以下特征 :

[0191] a) 以通过表面等离子共振测定的  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  速率常数与人 TNF  $\alpha$  解离 ;

[0192] b) 具有的轻链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换或通过位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列；

[0193] c) 具有的重链 CDR3 域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的 1 至 5 个保守氨基酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列。

[0194] 更优选地, 该抗体或其抗原结合部分以  $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  与人 TNF  $\alpha$  解离。甚至更优选地, 该抗体或其抗原结合部分以  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$  与人 TNF  $\alpha$  解离。

[0195] 在另一实施方案中, 本发明提供测定 AS 的治疗有效性的方法, 包括施用分离的人抗体或其抗原结合部分。该抗体或其抗原结合部分优选含有一个轻链可变区 (LCVR), 该 LCVR 具有包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或通过位置 1、4、5、7 或 8 处的单丙氨酸置换而由 SEQ ID NO:3 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域; 且含有一个重链可变区 (HCVR), 该 HCVR 具有包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或通过位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单丙氨酸置换而由 SEQ ID NO:4 修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。优选地, 该 LCVR 进一步具有一个包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 CDR2 域 (即 D2E7VL CDR2), 并且该 HCVR 进一步具有一个包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 CDR2 域 (即 D2E7VH CDR2)。甚至更优选地, 该 LCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 CDR1 域 (即 D2E7VL CDR1), 并且该 HCVR 具有包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 CDR1 域 (即 D2E7VH CDR1)。VL 的构架区优选来自  $V_{\kappa}1$  人类种系家族, 更优选来自 A20 人类种系  $V_{\kappa}$  基因, 且最优选来自美国专利 No. 6, 090, 382 的图 1A 及 1B 中所示的 D2E7VL 构架序列。VH 的构架区优选来自  $V_{\text{H}}3$  人类种系家族, 更优选来自 DP-31 人类种系 VH 基因, 且最优选来自美国专利 No. 6, 090, 382 的图 2A 及 2B 中所示的 D2E7VH 构架序列。

[0196] 因此, 在另外一个实施方案中, 本发明提供测定 AS 的治疗有效性的方法, 其中所述治疗包括施用分离的人抗体或其抗原结合部分。该抗体或其抗原结合部分优选地含有一个包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) (即 D2E7VL) 及一个包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) (即 D2E7VH)。在某些实施方案中, 该抗体包含一个重链恒定区, 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。优选地, 该重链恒定区为 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。此外, 该抗体可包含一个轻链恒定区, 其为  $\kappa$  轻链恒定区或  $\lambda$  轻链恒定区。优选地, 该抗体包含一个  $\kappa$  轻链恒定区。或者, 该抗体部分可为 (例如) Fab 片段或单链 Fv 片段。

[0197] 在其它实施方案中, 本发明提供测定 AS 的治疗有效性的方法, 其中该治疗包括施用分离的人抗体或其抗原结合部分, 该抗体或其抗原结合部分优选地含有与 D2E7 相关的 VL 及 VH CDR3 域。例如抗体或其抗原结合部分具有一个轻链可变区 (LCVR), 该 LCVR 具有包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 CDR3 域; 或具有一个重链可变区 (HCVR), 该 HCVR 具有包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的 CDR3 域。

[0198] 在另外一个实施方案中,本发明的方法包括测定 AS 治疗的有效性,其中所述治疗包括施用 TNF  $\alpha$  抑制剂,包括但不限于抗 -TNF  $\alpha$  抗体或其片段,包括英利昔单抗 (**Remicade**<sup>®</sup>, Johnson and Johnson; 美国专利 No. 5,656,272 中描述,在此引入作为参考)、CDP571(一种人源化单克隆抗 TNF  $\alpha$  IgG4 抗体)、CDP870(一种人源化单克隆抗 TNF  $\alpha$  抗体片段)、抗 TNF dAb (Peptech)、CNT0148(戈利木单抗; Medarex and Centocor, 参见 W002/12502) 及阿达木单抗 (**Humira**<sup>®</sup> Abbott Laboratories, 一种人抗 TNF mAb, 在美国 6,090,382 中描述为 D2E7)。其它例子包括依那西普(描述于 W091/03553 和 W009/406476 中)、可溶性 I 型 TNF 受体、聚乙二醇化的可溶性 I 型 TNF 受体 (PEGs TNF-R1) 或 p55TNFR1gG(来那西普)。在另一实施方案中,该 TNF  $\alpha$  抑制剂为重组 TNF 结合蛋白质 (r-TBP-I) (Serono)。

[0199] 在本发明的方法和组合物中使用的 TNF  $\alpha$  抗体也可以为了改善 AS 的治疗而进行修饰。在一些实施方案中,该 TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段被化学修饰以提供所需的效应。例如,本发明的抗体及抗体片段的聚乙二醇化作用可通过本领域中已知的任意聚乙二醇化反应进行,如(例如)以下参考文献中所述: Focus on Growth Factors 3:4-10(1992); EP0154316; 及 EP0401384(均全文引入本文作为参考)。优选地,使用反应性聚乙二醇分子(或类似的反应性水溶性聚合物)通过酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化作用。用于本发明的抗体及抗体片段的聚乙二醇化作用的优选的水溶性聚合物为聚乙二醇(PEG)。如本文中使用的“聚乙二醇”包括已经用来衍生化其它蛋白质的任意形式的 PEG,例如单(C1-C10)烷氧基聚乙二醇或芳氧基聚乙二醇。

[0200] 制备本发明的聚乙二醇化抗体及抗体片段的方法通常应包括以下步骤:(a) 在可使抗体或抗体片段连接于一个或多个 PEG 基团的条件下使抗体或抗体片段与聚乙二醇例如 PEG 的反应性酯或醛衍生物反应,及 (b) 获得反应产物。本领域技术人员应当清楚基于已知参数及所需结果选择最佳反应条件或酰化反应。

[0201] 聚乙二醇化抗体及抗体片段通常可以用来通过施用本文中所述的 TNF  $\alpha$  抗体及抗体片段来治疗 AS。通常,与未聚乙二醇化抗体及抗体片段相比,聚乙二醇化抗体及抗体片段的半衰期延长。聚乙二醇化抗体及抗体片段可单独使用、一起使用或与其它药物组合物联合使用。

[0202] 在本发明的另一实施方案中,TNF  $\alpha$  抗体或其片段可以被改变,其中该抗体的恒定区被修饰以相对于未修饰的抗体减少至少一种恒定区介导的生物效应功能。为了修饰本发明的抗体从而使其显示出对 Fc 受体降低的结合,可使抗体的免疫球蛋白恒定区片段在对 Fc 受体 (FcR) 相互作用所必需的特定区突变(参见例如 Canfield 和 Morrison(1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491; 和 Lund 等人(1991) J. of Immunol. 147:2657-2662)。降低抗体的 FcR 结合力也可减少依赖于 FcR 相互作用的其它效应功能,例如调理作用及吞噬作用及抗原依赖性细胞毒性。

[0203] 在本发明的方法中使用的抗体或抗体部分可以衍生化或连接于另一功能分子(例如另一个肽或蛋白质)。因此,本发明的抗体及抗体部分包括本文中所述的人抗 hTNF  $\alpha$  抗体的衍生化及其它修饰形式,包括免疫粘附分子。例如,本发明的抗体或抗体部分可以(通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式)功能性连接于一种或多种其它分子实体,例如另一抗体(例如双特异性抗体或双抗体)、检测剂、细胞毒性剂、药剂和/或可介导

抗体或抗体部分与另一分子（例如链霉抗生物素核心区或聚组氨酸标签）结合的蛋白质或肽。

[0204] 一种类型的衍生化抗体通过使两种或多种（相同种类或不同种类的）抗体交联而产生（例如产生双特异性抗体）。适当的交联剂包括具有由适当间隔基分开的两种不同反应性基团的异双功能交联剂（例如间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯）或同双功能交联剂（例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯）。这些交联剂购自 Pierce Chemical Company, Rockford, IL。

[0205] 可用来使本发明的抗体或抗体部分衍生化的有用的检测剂包括荧光化合物。示例性荧光检测剂包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。也可以用诸如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等可检测酶使抗体衍生化。当用可检测酶使抗体衍生化时，通过添加该酶用来生成可检测反应产物的其他试剂进行检测。例如，当存在可检测剂辣根过氧化物酶时，添加过氧化氢及二氨基联苯胺导致生成可检测的有色反应产物。也可采用生物素使抗体衍生化，并通过间接测量抗生物素蛋白或链霉抗生物素的结合进行检测。

[0206] 在本发明的方法或组合物中使用的抗体或抗体部分可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链及重链基因而制备。为重组表达抗体，用一种或多种携带编码抗体的免疫球蛋白轻链及重链的 DNA 片段的重组表达载体转染宿主细胞，使得轻链及重链在宿主细胞内表达并且优选地分泌至培养宿主细胞的培养基中，可自该培养基回收抗体。标准重组 DNA 方法用来获得抗体重链及轻链基因，将这些基因引入重组表达载体中，并且将这些载体导入宿主细胞内，例如 Sambrook、Fritsch 及 Maniatis(编)，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel 等人(编) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) 及 Boss 等人的美国专利 No. 4, 816, 397 中所述的那些标准重组 DNA 方法。

[0207] 为了表达 D2E7 或与 D2E7 相关的抗体，首先获得编码轻链及重链可变区的 DNA 片段。这些 DNA 可通过使用聚合酶链反应 (PCR) 扩增及修饰种系轻链及重链可变序列而获得。人类重链及轻链可变区基因的种系 DNA 序列在本领域中已知（参见例如“Vbase”人类种系序列数据库；也参见 Kabat 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 第 91-3242 号；Tomlinson 等人 (1992) “The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227:776-798；及 Cox 等人 (1994) “A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J. Immunol. 24: 827-836；其内容均引入本文作为参考）。为获得编码 D2E7 或与 D2E7 相关的抗体的重链可变区的 DNA 片段，通过标准 PCR 扩增人类种系 VH 基因的 V<sub>H</sub>3 家族成员。最优选地，扩增 DP-31VH 种系序列。为获得编码 D2E7 或与 D2E7 相关的抗体的轻链可变区的 DNA 片段，通过标准 PCR 扩增人类种系 VL 基因的 V<sub>L</sub>I 家族成员。最优选地，扩增 A20VL 种系序列。适用于扩增 DP-31 种系 VH 及 A20 种系 VL 序列的 PCR 引物可基于先前引用的文献中所揭示的核苷酸序列使用标准方法进行设计。

[0208] 一旦获得种系 VH 及 VL 片段，则可使这些序列突变以编码本文中所揭示的 D2E7 或

与 D2E7 相关的氨基酸序列。首先将由种系 VH 及 VLDNA 序列编码的氨基酸序列与 D2E7 或与 D2E7 相关的 VH 及 VL 氨基酸序列比较以鉴定与种系不同的 D2E7 或与 D2E7 相关的序列中的氨基酸残基。随后,使用遗传密码确定应进行哪些核苷酸改变,使种系 DNA 序列的适当核苷酸突变,从而使突变的种系序列编码 D2E7 或与 D2E7 相关的氨基酸序列。种系序列的诱变通过例如 PCR 介导的突变(其中突变的核苷酸引入 PCR 引物中,使得 PCR 产物含有该突变)或定点诱变的标准方法进行。

[0209] 一旦(如上所述通过种系 VH 和 VL 基因的扩增及诱变)获得编码 D2E7 或与 D2E7 相关的 VH 和 VL 片段的 DNA 片段,则这些 DNA 片段可通过标准重组 DNA 技术进一步操作,例如使可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中,编码 VL 或 VH 的 DNA 片段有效连接于编码另一种蛋白质的另一种 DNA 片段上,例如抗体恒定区或柔性接头。如本发明内容中所使用的术语“有效连接”意思是使两个 DNA 片段连接,使得由这两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持在阅读框内。

[0210] 编码 VH 区的分离的 DNA 可通过使编码 VH 的 DNA 有效连接于另一编码重链恒定区(CH1、CH2 及 CH3)的 DNA 分子而转变为全长重链基因。人类重链恒定区基因的序列在本领域中已知(参见例如 Kabat 等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No. 91-3242),并且包含这些区的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区,但最优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因而言,编码 VH 的 DNA 可有效连接于另一仅编码重链 CH1 恒定区的 DNA 分子。

[0211] 编码 VL 区的分离的 DNA 可通过使编码 VL 的 DNA 有效连接于另一编码轻链恒定区(CL)的 DNA 分子而转变为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列在本领域中已知(参见例如 Kabat 等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No. 91-3242),并且包含这些区的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可为  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区,但最优选为  $\kappa$  恒定区。

[0212] 为得到 scFv 基因,将编码 VH 及 VL 的 DNA 片段有效连接于另一编码柔性接头(例如编码氨基酸序列  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$ )的片段,使得 VH 及 VL 序列可表达为相邻的单链蛋白,且 VL 及 VH 区由柔性接头连接(参见例如 Bird 等人(1988)Science242:423-426;Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883;McCafferty 等人, Nature(1990)348:552-554)。

[0213] 为表达本发明的抗体或抗体部分,将如上所述获得的编码部分或全长轻链及重链的 DNA 插入表达载体内,使得这些基因有效连接于转录及翻译控制序列。在本发明内容中,术语“有效连接”意思是将抗体基因连接至载体内使得载体内的转录及翻译控制序列起调节抗体基因的转录及翻译的预期功能。选择表达载体及表达控制序列以使其可与所使用的表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因及抗体重链基因插入各自载体中,或更通常地将两种基因均插入同一表达载体中。通过标准方法(例如连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者若不存在限制性位点则钝端连接)将抗体基因插入表达载体中。在插入 D2E7 或与 D2E7 相关的轻链或重链序列之前,该表达载体可以已经携带抗体恒定区序列。例如,一种使 D2E7 或与 D2E7 相关的 VH 及 VL 序列转变为全长抗体基因的方法是将其分别插入

已编码重链恒定区及轻链恒定区的表达载体中,使得 VH 片段有效连接于该载体内的 CH 片段且 VL 片段有效连接于该载体内的 CL 片段。另外或者可替代地,重组表达载体可编码促进抗体链从宿主细胞中分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,使得该信号肽在阅读框内连接于抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0214] 除抗体链基因之外,本发明的重组表达载体还携带控制抗体链基因在宿主细胞内表达的调节序列。术语“调节序列”意思是包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子及其它表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。这些调节序列描述于(例如)Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology185,Academic Press, San Diego, CA(1990)中。熟练技术人员应当了解包括选择调节序列的表达载体的设计可取决于例如待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括引导蛋白质在哺乳动物细胞内高水平表达的病毒元件,例如由以下病毒衍生的启动子和/或增强子:巨细胞病毒(CMV)(例如 CMV 启动子/增强子)、猿猴病毒 40(SV40)(例如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))及多瘤病毒。关于病毒调节元件及其序列的进一步描述,参见例如 Stinski 的美国专利 No. 5,168,062、Bell 等人的美国专利 No. 4,510,245 及 Schaffner 等人的美国专利 No. 4,968,615。

[0215] 除抗体链基因及调节序列之外,本发明中使用的重组表达载体 gip 可携带其他序列,例如调节载体在宿主细胞内复制的序列(例如复制起点)及选择性标记基因。选择性标记基因有助于选择已导入载体的宿主细胞(参见例如均为 Axel 等人的美国专利 No. 4,399,216、4,634,665 及 5,179,017)。例如,选择性标记基因通常赋予已导入载体的宿主细胞对例如 G418、潮霉素或氨甲喋呤的药物的抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于氨甲喋呤选择/扩增的 dhfr<sup>-</sup>宿主细胞)及 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0216] 为了表达轻链及重链,通过标准技术将编码重链及轻链的表达载体转染至宿主细胞内。术语“转染”的各种形式包括通常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞的大量技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞内表达本发明的抗体在理论上是可能的,然而抗体最优选地在真核细胞中表达,最优选地在哺乳动物宿主细胞内表达,因为这些真核细胞、尤其哺乳动物细胞比原核细胞更有可能组装且分泌正确折叠的免疫活性抗体。已报道抗体基因的原核表达无法高产量地生产活性抗体(Boss 和 Wood(1985)Immunology Today6:12-13)。

[0217] 优选用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO 细胞)(包括 dhfr-CHO 细胞,描述于 Urlaub 和 Chasin, (1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:4216-4220,与 DHFR 选择性标记一起使用,例如,如 Kaufman 和 Sharp(1982)Mol. Biol. 159:601-621 中所述)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞及 SP2 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞持续足以使抗体在宿主细胞内表达或更优选地使抗体分泌至宿主细胞于其中生长的培养基内的一段时间来产生抗体。可使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

[0218] 宿主细胞也可用于产生完整抗体的部分,例如 Fab 片段或 scFv 分子。应了解以

上程序的变化在本发明的范围内。例如,可能期望用编码本发明的抗体的轻链或重链(而非两者)的 DNA 转染宿主细胞。也可利用重组 DNA 技术除去编码对于结合 hTNF $\alpha$  并非必需的轻链及重链的任一个或两者的一些或全部 DNA。由这些截短的 DNA 分子表达的分子也包含于本发明的抗体中。此外,可通过标准化学交联方法使本发明的抗体与第二抗体交联产生双功能抗体,其中一条重链及一条轻链为本发明的抗体,且另一条重链及轻链对除 hTNF $\alpha$  之外的抗原具有特异性。

[0219] 在用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合部分的优选系统中,通过磷酸钙介导的转染将编码抗体重链与抗体轻链的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞。在重组表达载体内,抗体重链及轻链基因各自有效连接于 CMV 增强子/AdMLP 启动子调节元件以驱动高水平的基因转录。重组表达载体也携带 DHFR 基因,其允许选择已使用氨甲喋呤选择/扩增用载体转染的 CHO 细胞。培养选择后的转化株宿主细胞以表达抗体重链及轻链并且从培养基中回收完整抗体。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞并且从培养基中回收抗体。

[0220] 除本文中所公开的 D2E7 或其抗原结合部分或与 D2E7 相关的抗体之外,本发明的重组人抗体可通过筛选使用由衍生自人类淋巴细胞的 mRNA 制备的人类 VL 及 VH cDNA 制备的重组组合抗体库、优选 scFv 噬菌体展示库而分离。制备及筛选这些文库的方法在本领域中已知。除商业上可购得的用于产生噬菌体展示文库的试剂盒(例如 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 目录号 27-9400-01; 及 Stratagene SurfZAP<sup>TM</sup> 噬菌体展示试剂盒, 目录号 240612) 之外,尤其适用于产生及筛选抗体展示文库的方法及试剂的实例可见于(例如) Ladner 等人的美国专利第 5,223,409 号; Kang 等人的 PCT 公开第 W092/18619 号; Dower 等人的 PCT 公开第 W091/17271 号; Winter 等人的 PCT 公开第 W092/20791 号; Markland 等人的 PCT 公开第 W092/15679 号; Breitling 等人的 PCT 公开第 W093/01288 号; McCafferty 等人的 PCT 公开第 W092/01047 号; Garrard 等人的 PCT 公开第 W092/09690 号; Fuchs 等人 (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay 等人 (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse 等人 (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty 等人, Nature (1990) 348:552-554; Griffiths 等人 (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins 等人 (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson 等人 (1991) Nature 352:624-628; Gram 等人 (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard 等人 (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom 等人 (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 及 Barbas 等人 (1991) PNAS 88:7978-7982 中。

[0221] 在一个优选实施方案中,为了分离对 hTNF $\alpha$  具有高亲和力及低解离速率常数的人抗体,首先使用 Hoogenboom 等人, PCT 公开第 W093/06213 号中所述的表位印记方法使用对 hTNF $\alpha$  具有高亲和力及低解离速率常数的鼠抗 hTNF $\alpha$  抗体(例如 MAK195, 保藏号为 ECACC87050801 的杂交瘤)选择对 hTNF $\alpha$  具有类似结合活性的人类重链及轻链序列。此方法中所使用的抗体库优选为如 McCafferty 等人, PCT 公开第 W092/01047 号、McCafferty 等人, Nature (1990) 348:552-554 及 Griffiths 等人, (1993) EMBO J 12:725-734 中所述制备并筛选的 scFv 库。scFv 抗体库优选地使用重组人 TNF $\alpha$  作为抗原进行筛查。

[0222] 一旦选择初始人类 VL 及 VH 片段,则进行“混合及匹配”试验(其中筛选不同对的初始选择的 VL 及 VH 片段用于 hTNF $\alpha$  结合),以选择优选的 VL/VH 对组合。另外,为了进

一步改善对 hTNF  $\alpha$  结合的亲和力和 / 或降低对 hTNF  $\alpha$  结合的解离速率常数, 优选的 VL/VH 对的 VL 及 VH 片段可在类似于天然免疫应答过程中引起抗体亲和力成熟的体内体细胞突变过程的过程中随机突变, 优选地在 VH 和 / 或 VL 的 CDR3 域内突变。该体外亲和力成熟可使用分别与 VH CDR3 或 VLCDR3 互补的 PCR 引物通过扩增 VH 及 VL 区实现, 这些引物已采用四种核苷酸碱基的随机混合物在特定位置“刺突” (spike), 使得产生的 PCR 产物编码 VH 及 VL 片段, 其中随机突变作用已被导入 VH 和 / 或 VL CDR3 域。可再次筛选用于结合 hTNF  $\alpha$  的这些随机突变的 VH 及 VL 片段, 并且可以选择显示对于 hTNF  $\alpha$  结合而言高亲和力及低解离速率的序列。

[0223] 从重组免疫球蛋白展示文库中筛选并分离本发明的抗 hTNF  $\alpha$  抗体之后, 可从展示包装体 (例如从噬菌体基因组) 中回收编码选择的抗体的核酸, 并通过标准重组 DNA 技术亚克隆到其它表达载体中。如果需要, 可以将核酸进一步操作, 以产生本发明的其它抗体形式 (例如连接于编码例如其他恒定区的其他免疫球蛋白域的核酸)。如以上进一步详细描述, 为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人类抗体, 将编码抗体的 DNA 克隆到重组表达载体中, 并导入哺乳动物宿主细胞中。

[0224] 分离对 hTNF  $\alpha$  具有高亲和力及低解离速率常数的人抗体的方法也描述于美国专利 No. 6, 090, 382; 6, 258, 562 及 6, 509, 015 中, 均引入本文作为参考。

#### [0225] IV. 脊椎关节病

[0226] TNF  $\alpha$  与多种疾病的病理生理学有关, 这些疾病包括炎性疾病, 如脊椎关节病 (参见, 例如, Moeller 等人. (1990) Cytokine 2:162; 美国专利 No. 5, 231, 024; 欧洲专利公开 No. 260610)。

[0227] 本文使用的术语“脊椎关节病”用来指影响脊椎关节的数种疾病中的任何一种, 其中这些疾病具有共同的临床、放射学和组织学特征。大量脊椎关节病具有共同的基因特征, 即, 它们与 HLA-B27 等位基因有关。在一个实施方案中, 术语脊椎关节病用来指影响不包括强直性脊柱炎的脊椎关节的数种疾病中的任何一种, 其中这些疾病具有共同的临床、放射学和组织学特征。脊椎关节病的实例包括强直性脊柱炎、银屑病关节炎 / 脊椎炎、肠病性关节炎、反应性关节炎或莱特尔氏综合征和未分化的脊椎关节病。用来研究脊椎关节病的动物模型的例子包括 ank/ank 转基因小鼠、HLA-B27 转基因大鼠 (参见, Taurog 等人. (1998) The Spondylarthritides. Oxford: Oxford University Press)。

[0228] 本发明的方法可以用来治疗已经发生脊椎关节病或有脊椎关节病危险的受试者。具有脊椎关节病危险的受试者的例子包括患有关节炎的人类。脊椎关节病可以与包括类风湿性关节炎在内的其它形式的关节炎有关。在本发明的一个实施方案中, 测定患有脊椎关节病或具有发生脊椎关节病危险的患者的软骨降解和 / 或滑膜炎生物标志物的生物标志物水平, 并用来评价该患者是否具有发生脊椎关节病的危险。下文描述了用 TNF  $\alpha$  抗体可以治疗、因此用本文所述的方法可以检查的脊椎关节病的例子:

#### [0229] 1. 强直性脊柱炎 (AS)

[0230] 肿瘤坏死因子与强直性脊柱炎 (AS) 的病理生理学有关 (参见, Verjans 等人. (1991) Arthritis Rheum. 34:486; Verjans 等人. (1994) Clin Exp Immunol. 97:45; Kaijzel 等人. (1999) Hum Immunol. 60:140)。AS 是一种涉及一块或数块椎骨的炎症的炎性疾病。AS 是一种慢性炎性疾病, 影响中轴骨骼和 / 或周围关节, 包括脊柱椎骨与骶髂关节

之间的关节,和脊柱与骨盆之间的关节。AS 最终可导致受影响的椎骨融合或生长在一起。脊椎关节病,包括 AS,可能与银屑病关节炎 (PsA) 和 / 或炎症肠病 (IBD) (包括溃疡性结肠炎和克罗恩病) 有关。

[0231] AS 的早期表现可以通过放射照相检查 (包括 CT 扫描和 MRI 扫描) 来确定。AS 的早期表现通常包括骶髂关节炎 (sacroiliitis) 和骶髂关节的变化,由软骨下骨 (subchondral bone) 皮质边缘的模糊 (blurring) 及随后的腐蚀和硬化得到证明。也已经指出疲劳是 AS 的共同症状 (Duffy 等人. (2002) ACR66th Annual Scientific Meeting 摘要)。因此,本发明的方法通过提供确定包括 TNF 抑制剂给药的治疗的有效性的方法,可以提供改善的 AS 治疗。

[0232] 在一个实施方案中,本发明的方法用来确定 TNF 抑制剂给药在治疗与 IBD 有关的脊椎关节病 (包括 AS) 中的有效性。

[0233] AS 通常用非甾体抗炎药 (NSAIDs) 如阿司匹林或吲哚美辛治疗。因此,本发明的方法可以用来确定治疗的有效性,该治疗包括与常用来减轻通常与强直性脊柱炎相关的炎症和疼痛的药物联合施用 TNF  $\alpha$  抗体。

#### [0234] 2. 银屑病关节炎

[0235] 肿瘤坏死因子与银屑病关节炎 (PsA) 的病理生理学有关 (Partsch 等人. (1998) Ann Rheum Dis. 57 :691 ;Ritchlin 等人. (1998) J Rheumatol. 25 :1544)。如本文所述,银屑病关节炎或与皮肤有关的银屑病是指与银屑病 (一种常见的慢性皮肤病) 有关的慢性炎症性关节炎,引起身体上的红斑。20 个银屑病个体中大约有 1 人将伴随皮肤病发生关节炎,在大约 75% 的病例中,银屑病早于关节炎。PsA 本身以多种方式表现,从轻度到重度关节炎,其中关节炎通常影响手指和脊柱。当脊柱受到影响时,症状类似于强直性脊柱炎,如上所述。另外, TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段治疗 PsA 的有效性可以利用本发明的方法和组合物进行测定。

[0236] PsA 有时与残毁性关节炎相关。残毁性关节炎是指以过度骨质侵蚀为特征的疾病,导致肉眼可见的毁伤关节的侵蚀性变形。在一个实施方案中, TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段治疗残毁性关节炎的有效性可以利用本发明的方法和组合物进行测定。

#### [0237] 3. 反应性关节炎 / 莱特尔氏综合征

[0238] 肿瘤坏死因子与反应性关节炎的病理生理学有关,反应性关节炎也被称为莱特尔氏综合征 (Braun 等人. (1999) Arthritis Rheum. 42(10) :2039)。反应性关节炎 (ReA) 是指在身体其它部位并发感染 (通常是肠或泌尿生殖道感染) 的关节炎。ReA 通常以特定临床症状为特征,这些症状包括关节的炎症 (关节炎)、尿道炎、结膜炎和皮肤和粘膜的损伤。另外,ReA 也可能在性传播疾病感染或痢疾感染后发生,这些感染包括衣原体、弯曲杆菌、沙门氏菌或耶尔森菌感染。在一个实施方案中, TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段治疗 ReA 的有效性可以利用本发明的方法和组合物进行测定。

#### [0239] 4. 未分化的脊椎关节病

[0240] 在一个实施方案中,利用本发明的方法获得的抗体用来治疗患有未分化的脊椎关节病的受试者 (参见, Zeidler 等人. (1992) Rheum Dis Clin North Am. 18 :187)。用来描述未分化的脊椎关节病的其它术语包括血清阴性少关节型关节炎 (oligoarthritis) 和未分化的少关节型关节炎。本文使用的未分化的脊椎关节病是指其中只证明受试者有某些与

脊椎关节病相关的症状的疾病。这种疾病通常在未患 IBD、银屑病或 AS 或莱特尔氏综合征经典症状的年轻成人中发现。在某些情况中,未分化的脊椎关节病可能是 AS 的早期体征。在一个实施方案中,TNF  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段治疗未分化的脊椎关节病的有效性可以用本发明的方法和组合物进行测定。

#### [0241] V. 药物组合物和药物给药

##### [0242] A. 组合物和给药

[0243] 用于本发明的方法中的抗体、抗体部分及其它 TNF  $\alpha$  抑制剂可引入适于施用于受试者的药物组合物中。通常,该药物组合物包含本发明的抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂及药物可接受的载体。本文使用的“药物可接受的载体”包括生理上相容的任意及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂等。药物可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇等的一种或多种及其组合。在许多情况中,优选地组合物中包括等渗剂,例如糖、例如甘露醇、山梨糖醇的多元醇或氯化钠。药物可接受的载体可进一步包括少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增加抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂的保存期或有效性。

[0244] 用于本发明的方法中的组合物可以以多种形式存在。这些形式包括(例如)液体、半固体及固体药剂形式,例如液体溶液(例如可注射及可输注溶液)、分散液或悬浮液、锭剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的给药方式及治疗应用。通常,优选的组合物为可注射或可输注溶液形式,例如类似于以其它抗体或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂用于人类的被动免疫的那些组合物的组合物。优选的给药方式为非肠胃(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)方式。在一个实施方案中,抗体或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂通过静脉内输注或注射施用。在另一实施方案中,抗体或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂通过肌肉内或皮下注射施用。

[0245] 治疗组合物在制造及储存条件下通常必须为无菌且稳定的。可将该组合物配制为溶液、微乳液、分散液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。无菌可注射溶液可通过采用以上列举的成份的一种或组合将活性化合物(即抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂)以所需要的量引入适当溶剂中并根据需要随后过滤灭菌而制备。一般而言,分散液通过将活性化合物引入含有碱性分散介质及来自以上列举的那些成份的所需其它成份的无菌载体中而制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况中,优选的制备方法为真空干燥及冷冻干燥,其产生活性成份加上来自其预先无菌过滤的溶液的任意其他所需成份的粉剂。溶液的适当流动性可(例如)通过使用例如卵磷脂的包衣,由在分散液情况中保持所需粒径及由使用界面活性剂而得以保持。可注射组合物的延迟吸收可通过将例如硬脂酸盐及明胶的延迟吸收剂包含于组合物中而获得。

[0246] 补充的活性化合物也可以引入组合物中。在某些实施方案中,用于本发明的方法中的抗体或抗体部分与一种或多种包括 AS 抑制剂或拮抗剂的其他治疗剂共配制和/或共施用。例如,本发明的抗 hTNF  $\alpha$  抗体或抗体部分可与一种或多种结合 TNF  $\alpha$  相关疾病的其它靶标的其他抗体(例如结合其它细胞因子或结合细胞表面分子的抗体)、一种或多种细胞因子、可溶性 TNF  $\alpha$  受体(参见例如 PCT 公开第 W094/06476 号)和/或一种或多种抑制 hTNF  $\alpha$  产生或活性的化学药剂(例如如 PCT 公开第 W093/19751 号中所述的环己烷-亚基衍生物)或其任意组合共配制和/或共施用。此外,本发明的一种或多种抗体可与两种或两种以上上述治疗剂组合使用。这些组合疗法可有利地利用以更低剂量施用的治疗剂,由

此避免患者可能出现的与各种单一疗法相关的副作用、并发症或低水平应答。

[0247] 在一个实施方案中,本发明包括包含有效量的 TNF  $\alpha$  抑制剂及药学上可接受的载体的药物组合物,其中该有效量的 TNF  $\alpha$  抑制剂可有效地治疗 AS。在一个实施方案中,将用于本发明的方法中的抗体或抗体部分掺入药物制剂中,如 PCT/IB03/04502 及美国申请 10/222140 中所述,引入本文作为参考。该制剂包括浓度为 50mg/ml 的抗体 D2E7,其中一个预先填充的注射器含有 40mg 的抗体用于皮下注射。在另一实施方案中,本发明的制剂包括 D2E7。

[0248] 尽管对于许多治疗应用而言优选的给药途径/方式是皮下注射,但是本发明的抗体、抗体部分及其它 TNF  $\alpha$  抑制剂可通过本领域中已知的多种方法施用。在另一实施方案中,给药通过静脉内注射或输注进行。如熟练技术人员所了解的,给药途径和/或方式可根据所需结果而改变。在某些实施方案中,活性化合物可用保护化合物不会快速释放的载体制备,例如制备为控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可使用生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯及聚乳酸。制备这些制剂的许多方法已申请专利或通常为熟练技术人员所知。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Robinson 编, Dekker, Inc., New York, 1978。

[0249] 本发明中使用的 TNF  $\alpha$  抗体也可以以蛋白质晶体制剂形式施用,包括包裹于聚合载体内以形成包衣颗粒的蛋白质晶体的组合。蛋白质晶体制剂的包衣颗粒可为球形,且为直径高达 500 微米的微球体或其可具有一些其它形态且为微粒。蛋白质晶体的增加的浓度使得本发明的抗体可以皮下方式递送。在一个实施方案中,本发明的 TNF  $\alpha$  抗体通过蛋白质递送系统递送,其中将一种或多种蛋白质晶体制剂或组合物施用于患有与 TNF  $\alpha$  相关的病症的受试者。组合物及制备全部抗体晶体或抗体片段晶体的稳定制剂的方法也描述于 W002/072636 中,引入本文作为参考。在一个实施方案中,描述于 PCT/IB03/04502 及美国申请 10/222140 中的包含晶体化抗体片段的制剂用来使用本发明的治疗方法治疗类风湿性关节炎。

[0250] 在某些实施方案中,本发明的抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂可口服给药,例如与惰性稀释剂或可吸收可食用的载体一起给药。该化合物(和,如果需要,其它成份)也可装入硬壳或软壳明胶胶囊中压缩成片剂,或直接掺入患者的饮食中。对于口服治疗给药而言,可将化合物与赋形剂一起掺入且可以以可摄取片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂等形式使用。为通过除非肠胃给药之外的形式施用本发明的化合物,必需以防止其失活的物质涂覆化合物或与化合物共施用。

[0251] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或抗体部分。“治疗有效量”是指在剂量上及对于所需要的时间而言对获得所需治疗结果有效的量。抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂的治疗有效量可根据例如个体的疾病状态、年龄、性别及体重及抗体、抗体部分、其它 TNF  $\alpha$  抑制剂在个体内引起所需应答的能力等因素而变化。治疗有效量也为其中治疗有益效果超过抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂的任意有毒或有害效果的量。“预防有效量”是指在剂量上及对于所需要的时间而言对获得所需预防结果有效的量。通常,由于预防剂量在疾病的较早期阶段之前或在疾病的较早期阶段时用于受试者,因此预防有效量比治疗有效量要小。

[0252] 可调节给药方案以提供最适宜的所需应答(例如治疗或预防应答)。例如,可施用

单个大丸剂,可随时间以几个分开的剂量施用或在显示紧急治疗状况时可成比例地减少或增加剂量。尤其有利的是配制易于施用且剂量均一的剂量单位形式的非肠胃组合物。本文使用的剂量单位形式是指适用于待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有计算为与所需药物载体产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的剂量单位形式的规格由以下条件规定并且直接取决于以下条件:(a) 活性化合物的独特特征及待获得的特定治疗或预防效果,及(b) 在配制该活性化合物用于治疗个体的敏感性的技术中的固有限制。

[0253] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗 TNF $\alpha$  相关疾病的单剂量方法,包括向需要治疗的受试者施用单剂量的 TNF $\alpha$  抑制剂,例如人抗体。在一个实施方案中,该 TNF $\alpha$  抑制剂为抗 TNF $\alpha$  抗体 D2E7。该 TNF $\alpha$  抑制剂的单剂量可为任意治疗或预防有效量。在一个实施方案中,将 20mg、40mg 或 80mg 单剂量的 D2E7 施用于受试者。单剂量可通过包括(例如)皮下给药的任意途径施用。两周一次给药方案可用于治疗其中 TNF $\alpha$  活性为有害的疾病,进一步描述于美国申请 10/163657 中。治疗或预防的多可变剂量方法也可用于治疗其中 TNF $\alpha$  活性为有害的疾病,进一步描述于 PCT 申请 PCT/US05/012007 中。

[0254] 应当注意,剂量值可随待减轻的疾病类型及严重性而变化。进一步应当理解,对于任意特定受试者而言,应根据个体需要及施用或监督组合物施用者的专业判断随时间调整特定给药方案,本文中所提出的剂量范围仅为示例性的,并不意在限制所要求保护的组合物的范围或实施。

[0255] 本发明也涉及用于施用本发明的抗 TNF 抗体以治疗 AS 的包装的药物组合物或试剂盒。在本发明的一个实施方案中,该试剂盒包含 TNF $\alpha$  抑制剂例如抗体、包含其他治疗剂的第二药物组合物及用于治疗 AS 的给药的说明。这些说明可描述如何(例如皮下)及何时(例如在第 0 周及第 2 周)将不同剂量的 TNF $\alpha$  抑制剂和/或其他治疗剂施用于受试者进行治疗。

[0256] 本发明的另一方面涉及含有包含抗 TNF $\alpha$  抗体及药物可接受的载体的药物组合物及各自包含适用于治疗 TNF $\alpha$  相关疾病的药物及药物可接受的载体的一种或多种药物组合物的试剂盒。或者,该试剂盒包含含有抗 TNF $\alpha$  抗体、一种或多种适用于治疗 TNF $\alpha$  相关疾病的药物及药物可接受的载体的单一药物组合物。该试剂盒含有用于药物组合物给药以治疗 TNF $\alpha$  相关疾病的说明。在一个实施方案中,该试剂盒包括关于如何测定 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性的说明。该试剂盒可以包括用于实施本发明的方法的任何以下成分:特异性识别 CTX-III 和/或 MMP-3 的检测剂;使用说明;和用于从患者中分离样品的试剂。

[0257] 该包装或试剂盒可含有 TNF $\alpha$  抑制剂,并且可将其促进以(在包装内或通过所附说明)使用或治疗本文中所述的病症。包装的药物或试剂盒另外可包括与使用第二药剂(如本文中所述)以及第一药剂(如本文中所述)的说明一同包装或共促进的第二药剂。

#### [0258] B. 其他治疗剂

[0259] 本发明涉及确定单独或与其他治疗剂联合使用的 TNF 抑制剂治疗 AS 的有效性。本文中所述的方法及药物组合物中所使用的药剂的联合可对所治疗的病症或疾病具有其他或协同治疗效果。本文中所述的方法或药物组合物中所使用的药剂的联合也可减少当单独施用或无特定药物组合物的其它药剂时与至少一种药剂相关的有害作用。例如,一种药剂的副作用毒性可被组合物的另一药剂削弱,因此允许更高剂量、改善患者顺应性及改善治

疗结果。组合物的加成或协同效应、益处及优点适用于治疗剂的种类（结构或功能类别）或个别化合物本身。

[0260] 补充的活性化合物也可掺入组合物中。在某些实施方案中，本发明的抗体或抗体部分与一种或多种可用于治疗 TNF  $\alpha$  相关疾病的其他治疗剂共配制和 / 或共施用。例如，本发明的抗 hTNF  $\alpha$  抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂可与一种或多种结合其它靶标的其他抗体（例如结合其它细胞因子或结合细胞表面分子的抗体）、一种或多种细胞因子、可溶性 TNF  $\alpha$  受体（参见例如 PCT 公开第 W094/06476 号）和 / 或一种或多种抑制 hTNF  $\alpha$  产生或活性的化学药剂（例如如 PCT 公开第 W093/19751 号中所述的环己烷 - 亚基衍生物）共配制和 / 或共施用。此外，一种或多种本发明的抗体或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂可与两种或两种以上的上述治疗剂组合使用。这些组合疗法有利地可利用更低剂量的施用的治疗剂，从而避免与各种单一疗法相关的可能的毒性或并发症。

[0261] 在根据本发明方法的治疗和评价方法中可以与抗体、抗体部分或其它 TNF  $\alpha$  抑制剂联用的治疗剂的非限定性实例包括以下药物：非甾体抗炎药（NSAID）；细胞因子抑制性抗炎药物（CSAID）；CDP-571/BAY-10-3356（人源化抗 TNF  $\alpha$  抗体；Celltech/Bayer）；cA2/ 英利昔单抗（嵌合抗 TNF  $\alpha$  抗体；Centocor）；75kdTNFR-IgG/ 依那西普（75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白；Immunex；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1994)Vol. 37, S295；J. Invest. Med. (1996)Vol. 44, 235A）；55kdTNF-IgG（55kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白；Hoffmann-LaRoche）；IDEC-CE9.1/SB210396（非消耗的灵长动物化抗 CD4 抗体；IDEC/SmithKline；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1995)Vol. 38, S185）；DAB486-IL-2 和 / 或 DAB389-IL-2（IL-2 融合蛋白；Seragen；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1993)Vol. 36, 1223）；抗 Tac（人源化抗 IL-2R  $\alpha$ ；Protein Design Labs/Roche）；IL-4（抗炎性细胞因子；DNAX/Schering）；IL-10（SCH52000；重组 IL-10，抗炎性细胞因子；DNAX/Schering）；IL-4、IL-10 和 / 或 IL-4 激动剂（例如激动剂抗体）；IL-1RA（IL-1 受体拮抗剂；Synergen/Amgen）；阿那白滞素（**Kineret**<sup>®</sup>，/Amgen）；TNF-bp/s-TNF（可溶性 TNF 结合蛋白；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S284（Amer. J. Physiol. -Heart and Circulatory Physiology(1995) 第 268 卷，第 37-42 页）；R973401（IV 型磷酸二酯酶抑制剂；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S282）；MK-966（COX-2 抑制剂；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S81）；伊洛前列素（参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S82）；氨甲喋呤；沙立度胺（thalidomide）（参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S282）及与沙立度胺相关的药物（例如 Celgen）；来氟米特（抗炎症及细胞因子抑制剂；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S131；Inflammation Research(1996)Vol. 45, pp. 103-107）；抗凝血酸（tranexamic acid）（血浆素原活化的抑制剂；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S284）；T-614（细胞因子抑制剂；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S282）；前列腺素 E1（参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S282）；替尼达普（Tenidap）（非甾体抗炎药；参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9（增刊），S280）；萘普生（Naproxen）（非甾体抗炎药；参见，例如，NeuroReport(1996)Vol. 7, pp. 1209-1213）；美洛昔康（非甾

体抗炎药);布洛芬(非甾体抗炎药);吡罗昔康(非甾体抗炎药);双氯芬酸(非甾体抗炎药);吲哚美辛(非甾体抗炎药);柳氮磺吡啶(参见,例如,Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9(增刊), S281);硫唑嘌呤(参见例如Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9(增刊), S281);ICE 抑制剂(酶白介素-1 $\beta$  转化酶的抑制剂);zap-70 和/或 lck 抑制剂(酪氨酸激酶 zap-70 或 lck 的抑制剂);VEGF 抑制剂和/或 VEGF-R 抑制剂(血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体的抑制剂;血管生成的抑制剂);皮质类固醇抗炎药物(例如 SB203580);TNF- 转化酶抑制剂;抗 IL-12 抗体;抗 IL-18 抗体;白介素-11(参见,例如,Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9(增刊), S296);白介素-13(参见,例如,Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9(增刊), S308);白介素-17 抑制剂(参见,例如,Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9(增刊), S120);金;青霉胺;氯喹;苯丁酸氮芥;羟氯喹;环孢菌素;环磷酰胺;全淋巴照射;抗胸腺细胞球蛋白;抗 CD4 抗体;CD5- 毒素;口服施用的肽及胶原蛋白;氯苯扎利二钠;细胞因子调节剂(CRA)HP228 及 HP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.);ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ISIS2302;Isis Pharmaceuticals, Inc.);可溶性补体受体 1(TP10;T Cell Sciences, Inc.);泼尼松;奥古蛋白;聚硫酸葡萄糖胺聚糖;米诺环素;抗 IL2R 抗体;海洋及植物脂质(鱼及植物种子脂肪酸;参见,例如,DeLuca 等人(1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777);金诺芬;苯基丁氮酮;甲氯芬那酸;氟芬那酸;静脉内免疫球蛋白;齐留通;阿扎立平;霉酚酸(RS-61443);他克莫司(FK-506);西罗莫司(雷帕霉素);氨普立糖(therafectin);克拉屈滨(2- 氯脱氧腺苷);氨甲喋呤;抗病毒药;免疫调节剂。任意上述药剂均可以与本发明的 TNF $\alpha$  抗体联合施用以使用本发明的多可变剂量或单剂量治疗方法治疗 TNF $\alpha$  相关疾病。

[0262] 在一个实施方案中,本发明包括一种制造物品或一种治疗方法,用于确定 TNF 抑制剂与作为治疗蛋白质的以下药剂之一联合治疗其中 TNF $\alpha$  活性有害的 TNF $\alpha$ - 相关疾病的有效性:抗-IL12 抗体(ABT874);抗-IL18 抗体(ABT325);LCK 的小分子抑制剂;COT 的小分子抑制剂;抗-IL1 抗体;MK2 的小分子抑制剂;抗-CD19 抗体;CXCR3 的小分子抑制剂;CCR5 的小分子抑制剂;CCR11 抗-E/L 选择素抗体的小分子抑制剂;P2X7 的小分子抑制剂;IRAK-4 的小分子抑制剂;糖皮质激素受体的小分子激动剂;抗-C5a 受体抗体;C5a 受体的小分子抑制剂;抗-CD32 抗体;和 CD32。

[0263] 在另一实施方案中,本发明包括一种制造物品或一种治疗方法,用于确定 TNF 抑制剂与抗生素或抗感染剂联用的有效性。抗感染剂包括本领域公知的治疗病毒、真菌、寄生虫或细菌感染的药物。本文使用的术语“抗生素”是指抑制微生物生长或杀死微生物的化学物质。该术语包括微生物产生的抗生素以及本领域公知的合成抗生素(例如类似物)。抗生素包括但不限于克拉霉素(Biaxin<sup>®</sup>)、环丙沙星(Cipro<sup>®</sup>)和甲硝唑(Flagyl<sup>®</sup>)。

[0264] 在另外一个实施方案中,本发明包括一种制造物品或一种治疗方法,用于确定 TNF 抑制剂与用于治疗克罗恩病或克罗恩相关疾病的药物联用的有效性。可以用来治疗克罗恩病的治疗剂的例子包括美沙拉秦、泼尼松、硫唑嘌呤、巯嘌呤、英利昔单抗、布地奈德、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙丁二酸钠、地芬诺酯/硫酸阿托品、盐酸咯哌丁胺、氨甲喋呤、奥美拉唑、叶酸盐(或酯)、环丙沙星/右旋糖-水、二酒石酸氢可酮/apap、盐酸四环素、氟轻松、甲硝唑、硫柳汞/硼酸、硫酸萆薢碱、考来烯胺/蔗糖、盐酸环丙沙星、盐酸哌替啶、盐酸咪达

唑、盐酸羟考酮 / 乙酰胺苯酚、盐酸异丙嗪、磷酸钠、磺胺甲噁唑 / 甲氧苄啶、塞来考昔、聚卡波非、萘磺酸丙氧芬、氢化可的松、多种维生素、巴柳氮二钠、磷酸可待因 / apap、盐酸考来维仑、氰钴胺素、叶酸、左氧氟沙星、那他珠单抗、甲泼尼龙、干扰素- $\gamma$  和沙莫司亭 (GM-CSF)。在一个实施方案中,以每周 2.5mg 到 30mg 的剂量施用氨甲喋呤来治疗克罗恩病。

[0265] TNF  $\alpha$  抗体可以与局部皮质类固醇、维生素 D 类似物和局部或口服类视黄醇或其组合联合施用以治疗银屑病。此外, TNF  $\alpha$  抗体也可以与以下药剂之一联合施用以治疗银屑病: KDR 的小分子抑制剂 (ABT-123)、Tie-2 的小分子抑制剂、卡泊三烯、丙酸氯倍他索、曲安奈德、丙酸卤倍他索、他扎罗汀、氨甲喋呤、氟西奈德、强化二丙酸倍他米松、氟轻松、奈德 (acetone)、阿昔曲丁 (acitretin)、焦油香波 (tar shampoo)、戊酸倍他米松、糠酸莫米松、酮康唑、丙吗卡因 / 氟轻松、戊酸氢化可的松、氟羟可舒松 (flurandrenolide)、尿素、倍他米松、丙酸氯倍他索 / emol1、丙酸氟替卡松、阿奇霉素、氢化可的松、增湿制剂、叶酸、地奈德、煤焦油、双醋二氟拉松、依那西普、叶酸盐、乳酸、甲氧沙林、hc/bismuth subgal/znox/resor、醋酸甲泼尼龙、泼尼松、防晒剂、水杨酸、哈西奈德、地蒽酚、特戊酸氯可托龙、煤提取物、煤焦油 / 水杨酸、煤焦油 / 水杨酸 / 硫、去羟米松、地西洋、软化剂、吡美莫司软化剂、氟轻松 / 软化剂、矿物油 / 蓖麻油 / 乳酸钠、矿物油 / 花生油、石油 / 十四烷酸异丙酯、补骨脂素、水杨酸、脂肪酸盐 / 三溴沙仑、硫柳汞 / 硼酸、塞来考昔、英利昔单抗、阿来法塞 (alefacept)、依法珠单抗 (efalizumab)、他克莫司、吡美莫司、PUVA、UVB 和其它光疗剂,以及柳氮磺吡啶。

[0266] 在一个实施方案中,采用多可变剂量法施用本发明的 TNF  $\alpha$  抗体,以与上述治疗肠病的药物中的一种联合治疗 AS。在另外一个实施方案中,在本发明的单剂量治疗方法中,上述其它药物与 TNF  $\alpha$  抗体联合使用。在另外一个实施方案中, TNF  $\alpha$  抗体以每两周一次的剂量方案给药。

[0267] 可采用多可变剂量治疗方案,将任一上述治疗剂 (单独或与其联合) 与 TNF  $\alpha$  抗体组合施用于患有其中 TNF  $\alpha$  为有害的 TNF  $\alpha$  相关疾病的受试者。在一个实施方案中,除 TNF  $\alpha$  抗体以外,将任一上述治疗剂 (单独或与其联合) 施用于患有肠病的受试者,以治疗另外一种 TNF  $\alpha$  相关的疾病,如类风湿性关节炎。应当理解,在如上所述的联合治疗中可以使用其它治疗剂,也可以用于本文所述的期望有益效果的其它适应症。

[0268] 本发明通过以下实施例进一步说明,这些实施例不应视为限制性的。

## 实施例

[0269] 实施例 1: 阿达木单抗抑制活动性强直性脊柱炎 (AS) 中软骨降解和滑膜炎的生物标志物

[0270] 以下研究的目的是在受控的用阿达木单抗治疗中度到重度 AS 的试验中分析软骨和骨降解的潜在的生物标志物,例如骨吸收标记物、胶原降解标记物和滑膜炎标记物。该研究也试图分析 TNF 抑制剂即阿达木单抗在 AS 研究群体中对骨吸收标记物、胶原降解标记物和滑膜炎标记物与 CRP (一种已知的 AS 标记物) 的相关性的影响。

[0271] 方法

[0272] 对至少一种 NSAID 或 DMARD 应答不足的活动性 AS 患者适合加入该研究。研究设计如图 1 所示。将患者随机化,在开始 24 周的双盲期中每隔一周 (eow) 皮下 (sc) 接受安

慰剂或阿达木单抗 40mg, 然后为 80 周的标签公开期。在基线处和在阿达木单抗或安慰剂治疗后在第 12 和 24 周分析三种生物标志物。具体来说, 分析了骨吸收标记物血清 I 型胶原 N- 端肽 (NTX)、胶原降解生物标志物尿 II 型胶原 C- 端肽 (尿 CTX-II) 和滑膜炎生物标志物血清基质金属蛋白酶 3 (MMP3)。因此, 主要有效性参数包括 AS 评价工作组标准 (ASsessment in AS(ASAS)Working Group criteria)、Bath AS 疾病活动性指数 (the Bath AS Disease Activity Index) (BASDAI) 和 CRP。通过 ELISA, 在基线 and 第 12、24 周时测定每个患者的尿 II 型胶原 C- 端肽 (尿 CTX-II)、血清 I 型胶原 N- 端肽 (NTX) 和血清 MMP3 的浓度。测定每个治疗组距基线的浓度差, 以及这些生物标志物的变化和其它 AS 结果之间的相关性。

[0273] 患者纳入标准包括以下: 患者 ≥ 18 岁; 活动性 AS, 根据满足以下 3 个标准中的至少 2 个来确定: (1) BASDAI 评分 ≥ 4, (2) 总背痛的 (Total Back Pain) 的视觉模拟 (Visual Analog Scale) (VAS) 评分 ≥ 4, 和 (3) 晨僵 (Morning stiffness) ≥ 1 小时; 以及对至少一种 NSAID 的应答不足。

[0274] 患者排除标准包括以下: 以前接受过抗 -TNF 治疗; 放射检查证明总脊柱关节强直 (竹节样脊柱); 在基线的 4 周内以前使用 DMARD (不是氨甲喋呤、柳氮磺吡啶或羟氯喹); 在基线的 4 周内关节内注射皮质类固醇; 以及在基线的 6 周内使用其它生物制品或研究性治疗。

[0275] 结果

[0276] 总共有 82 名患者加入: 44 名安慰剂患者以及 38 名阿达木单抗患者。在总共 82 名患者中, 80 名 (98%) 患者完成了 24 周的过程。没有完成 24 周过程的两名患者来自安慰剂组。基线特征在治疗组之间类似。基线群体统计学显示在以下的表 1 中。

[0277] 表 1. 基线群体统计学

[0278]

|  |               |                              |
|--|---------------|------------------------------|
|  | 安慰剂<br>(N=44) | 阿达木单抗<br>40 mg eow<br>(N=38) |
|--|---------------|------------------------------|

[0279]

|                     |           |           |
|---------------------|-----------|-----------|
| 年龄 (岁)†             | 40.0      | 41.9      |
| 种族 (%高加索人)          | 42 (95.5) | 37 (97.4) |
| 性别 (% 男性)           | 36 (81.8) | 29 (76.3) |
| 体重 (kg) †           | 78.2      | 76.1      |
| AS 持续时间 (年) †       | 12.1      | 14.5      |
| CRP (mg/dL) †       | 2.3       | 1.8       |
| NTX (nm/bce) †      | 9.77      | 10.5      |
| 尿 CTX-II 浓度 (ng/ml) | 388.2     | 324.8     |
| MMP-3 (ng/ml) †     | 57.1      | 25.3      |

[0280] 在本研究的所有患者中,在基线处 CRP 水平与尿 CTX-II、MMP3 和 NTX 水平显著相关。CRP 和尿 CTX-II 水平之间的相关性高于 CRP 与 MMP3 和 NTX 水平之间的相关性。基线处生物标志物和 CRP 的相关性显示在下面的表 2 中。

[0281] 表 2. 基线处生物标志物和 CRP 的相关性

[0282]

| 基线处的所有患者 | r=相关值<br>(N, p-值) |                   |                   |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
|          | 尿 CTX-II          | MMP3              | NTX               |
| CRP      | 0.71 (80, <0.001) | 0.45 (81, <0.001) | 0.37 (80, 0.001)  |
| 尿 CTX-II | -                 | 0.27 (79, 0.015)  | 0.49 (78, <0.001) |

[0283] r = 相关值

[0284] N = 患者

[0285] 与安慰剂组患者相比,阿达木单抗组患者在第 12 和 24 周发生尿 CTX-II 和 MMP3 浓度显著降低 (显示在以下表 3 中) ( $p < 0.001$ ),但是对于 NTX 来说没有显著性差异。

[0286] 表 3. 尿 CTX-II 和 MMP3 显著降低

[0287]

| 生物标志物    | 就诊    | 阿达木单抗的变化 (%) | 安慰剂的变化 (%)  |
|----------|-------|--------------|-------------|
| 尿 CTX-II | 12- 周 | -76.8 (-9.6) | 43.8 (22.2) |
|          | 24- 周 | -64.7 (3.2)  | 47.4 (29.8) |
| MMP3     | 12- 周 | -3.9 (-12.3) | 12.4 (18.9) |

|  |       |              |              |
|--|-------|--------------|--------------|
|  | 24- 周 | -3. 2(-8. 6) | 12. 5(20. 1) |
|--|-------|--------------|--------------|

[0288]

[0289] 如图 2 所示,与安慰剂组相比,阿达木单抗组患者在第 12 和 24 周的尿 CTX-II 水平显著降低。如图 3 所示,与安慰剂组患者相比,阿达木单抗组患者在第 12 和 24 周的 MMP3 水平也有统计学显著的降低。与安慰剂患者相比,阿达木单抗组患者在第 12 和 24 周的 CRP 水平显著降低(见图 4)。

[0290] 在阿达木单抗组中,CRP、尿 CTX-II 和 MMP-3 水平从基线到第 12 周的变化在统计学上显著相关。在基线 CRP 和 1) 尿 CTX-II( $r = 0.71$ )、2)MMP3( $r = 0.45$ )、和 3)NTX( $r = 0.37$ )( $p \leq 0.001$ )之间,以及在尿 CTX-II 和 NTX( $r = 0.49$ ; $p < 0.0001$ )之间观察到显著相关性。尿 CTX-II 和 MMP3 的 12 周变化与 CRP 的变化显著相关(分别为  $r = 0.40$  和  $0.43$ )( $p \leq 0.005$ )。另外,尿 CTX-II 的 12 周变化与 MMP3 的变化显著相关( $r = 0.41$ ,  $p < 0.0001$ )。在阿达木单抗组中,相关分析证实了 CRP 水平的提高与尿 CTX-II 和 MMP-3 水平的降低有关。第 12 周相对于基线的 CRP 和生物标志物变化之间的相关性显示在表 4 中。

[0291] 表 4. 第 12 周相对于基线的 CRP 和生物标志物变化之间的相关性 \*

[0292]

[0293]

| 安慰剂      | R=相关值<br>(N, $p$ -值†) |                     |                     |
|----------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|          | 尿 CTX-II              | MMP3                | NTX                 |
| CRP      | 0.21<br>(42, 0.172)   | 0.34<br>(44, 0.023) | 0.08<br>(43, 0.629) |
| 尿 CTX-II | --                    | 0.45<br>(42, 0.003) | 0.27<br>(41, 0.089) |
| 阿达木单抗    | 尿 CTX-II              | MMP3                | NTX                 |
| CRP      | 0.41<br>(38, 0.010)   | 0.37<br>(37, 0.024) | 0.08<br>(37, 0.620) |
| 尿 CTX-II | --                    | 0.15<br>(37, 0.375) | 0.10<br>(37, 0.540) |

[0294] 结论是,在中度到重度 AS 患者中,阿达木单抗显著抑制反映滑膜炎和软骨基质降解的生物标志物。阿达木单抗诱导反映滑膜炎(MMP3)和软骨基质降解(尿 CTX-II)的生物标志物的抑制,提示阿达木单抗延缓了与 AS 有关的结构损伤。另外,尿 CTX-II 和 MMP3 的变化与 CRP 的变化显著相关。

[0295] 等同方案

[0296] 熟练技术人员应当认识到或仅仅使用常规试验就能确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等同方案。这些等同方案包括于以下的权利要求书范围中。贯穿本申请

中所引用的所有参考文献、专利及公开的专利申请的内容均引入本文作为参考。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; W·P·马克西莫怀茨 等人

&lt;120&gt; 使用生物标志物诊断强直性脊柱炎的方法和组合物

&lt;130&gt; BBI-235PC

&lt;140&gt; PCT/US06/42564

&lt;141&gt; 2006-10-31

&lt;150&gt; 60/732444

&lt;151&gt; 2005-11-1

&lt;160&gt; 37

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2E7轻链可变区

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Gly | Ile | Arg | Asn | Tyr |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Ala | Ala | Ser | Thr | Leu | Gln | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Glu | Asp | Val | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Arg | Tyr | Asn | Arg | Ala | Pro | Tyr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |
| Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2E7重链可变区

&lt;400&gt; 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Arg |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asp | Asp | Tyr |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Ala | Ile | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | His | Ile | Asp | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Glu | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | 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 | Lys | Val | Ser | Tyr | Leu | Ser | Thr | Ala | Ser | Ser | Leu | Asp | Tyr | Trp | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0002]

<220>  
<223> D2E7轻链可变区 CDR3  
  
<221> VARIANT  
<222>)9  
<223> Xaa = Thr或Ala  
  
<400> 3  
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa  
1 5  
  
<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> D2E7重链可变区 CDR3  
  
<221> VARIANT  
<222> 12  
<223> Xaa = Tyr或Asn  
  
<400> 4  
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa  
1 5 10  
  
<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> D2E7轻链可变区 CDR2  
  
<400> 5  
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
1 5  
  
<210> 6  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> D2E7重链可变区 CDR2  
  
<400> 6  
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15  
Gly  
  
<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> D2E7轻链可变区 CDR1  
  
<400> 7  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10  
  
<210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>

[0003]

<223> D2E7重链可变区 CDR1

<400> 8

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 2SD4轻链可变区

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95  
Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 2SD4重链可变区

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30  
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val  
35 40 45  
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 2SD4轻链可变区 CDR3

<400> 11

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala  
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0004]

<220>  
<223> EP B12 轻链可变区 CDR3  
  
<400> 12  
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL10E4轻链可变区 CDR3  
  
<400> 13  
Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL100A9轻链可变区 CDR3  
  
<400> 14  
Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLL100D2轻链可变区 CDR3  
  
<400> 15  
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLL0F4轻链可变区 CDR3  
  
<400> 16  
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LOE5轻链可变区 CDR3

<400> 17  
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr  
1 5

[0005]

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLLOG7轻链可变区 CDR3

<400> 18  
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLLOG9轻链可变区 CDR3

<400> 19  
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLLOH1轻链可变区 CDR3

<400> 20  
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VLLOH10轻链可变区 CDR3

<400> 21  
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL1B7轻链可变区 CDR3

<400> 22  
Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL1C1轻链可变区 CDR3

<400> 23  
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr

[0006]

1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL0.1F4轻链可变区 CDR3

<400> 24  
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL0.1H8轻链可变区 CDR3

<400> 25  
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LOE7.A轻链可变区 CDR3

<400> 26  
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala  
1 5

<210> 27  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 2SD4重链可变区 CDR3

<400> 27  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn  
1 5 10

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1B11重链可变区 CDR3

<400> 28  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys  
1 5 10

<210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1D8重链可变区 CDR3

[0007]

<400> 29  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1A11重链可变区 CDR3

<400> 30  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp  
1 5 10

<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1B12重链可变区 CDR3

<400> 31  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1E4重链可变区 CDR3

<400> 32  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr  
1 5 10

<210> 33  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH1F6重链可变区 CDR3

<400> 33  
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

<210> 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 3C-H2重链可变区 CDR3

<400> 34  
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

<210> 35  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0008]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH1-D2.N重链可变区 CDR3

&lt;400&gt; 35

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn  
 1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2E7轻链可变区

&lt;400&gt; 36

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcaagtc gggcatcaga aattacttag cctggatca gcaaaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180  
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240  
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2E7重链可变区

&lt;400&gt; 37

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60  
 tectgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120  
 ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtggtea catagactat 180  
 gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatac acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300  
 taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360  
 agt 363

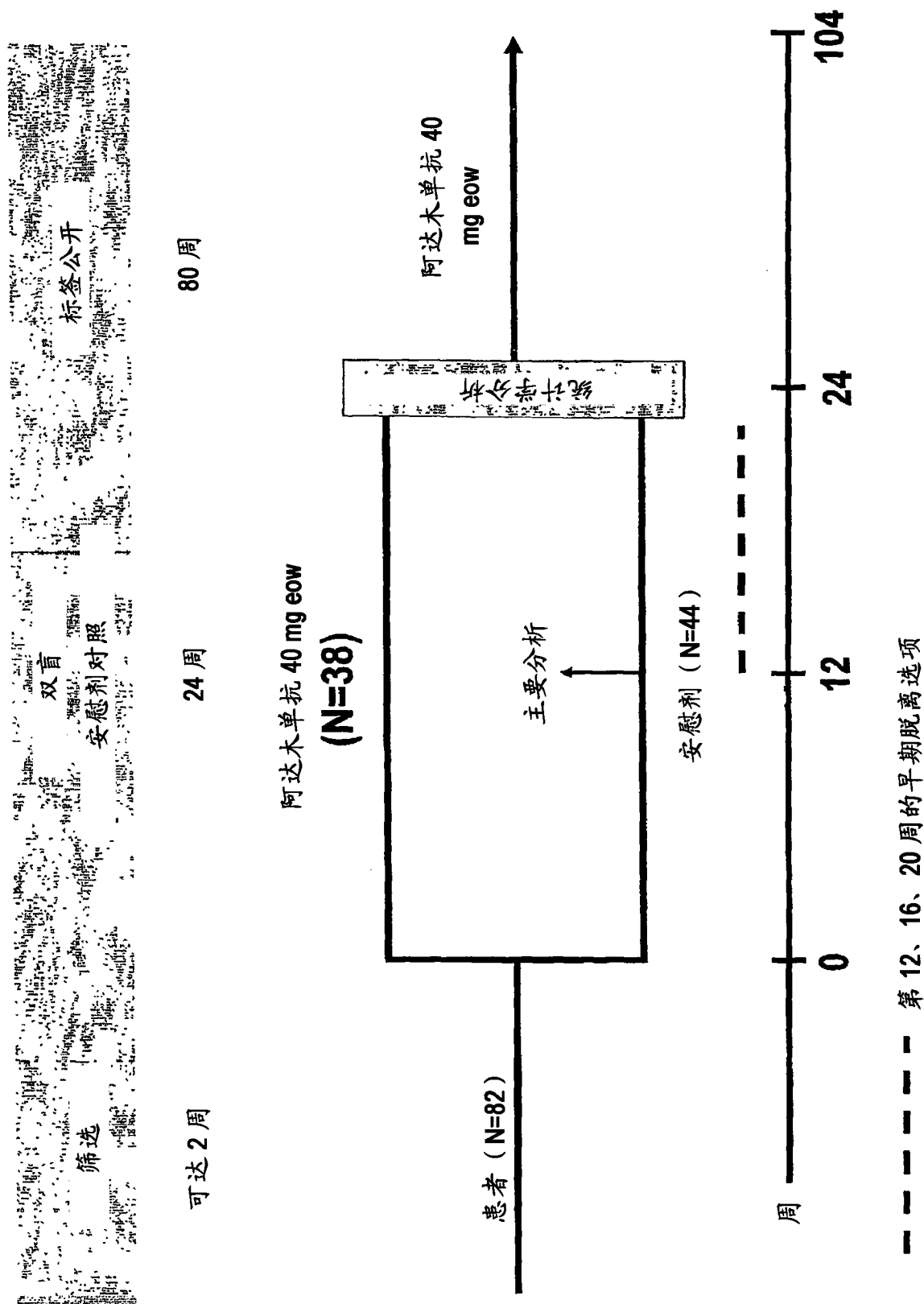
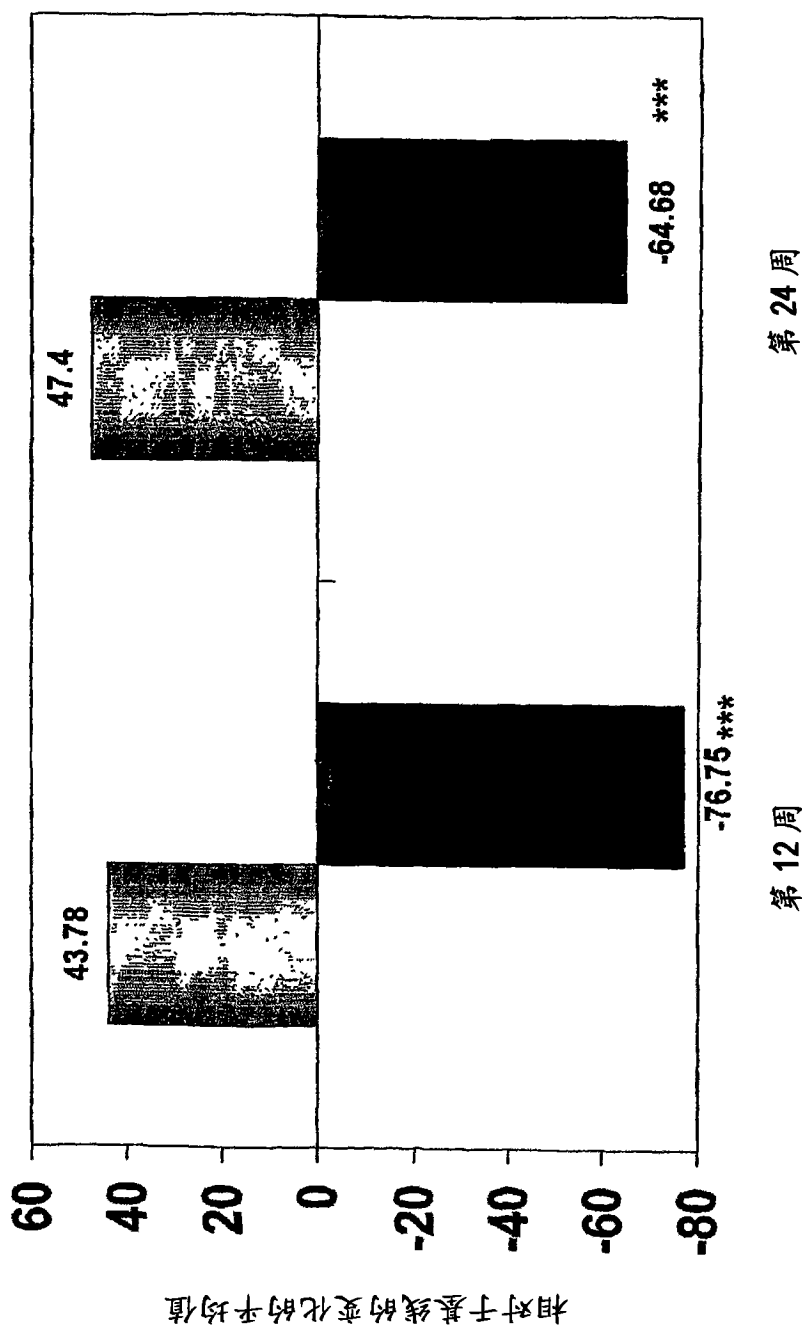


图 1

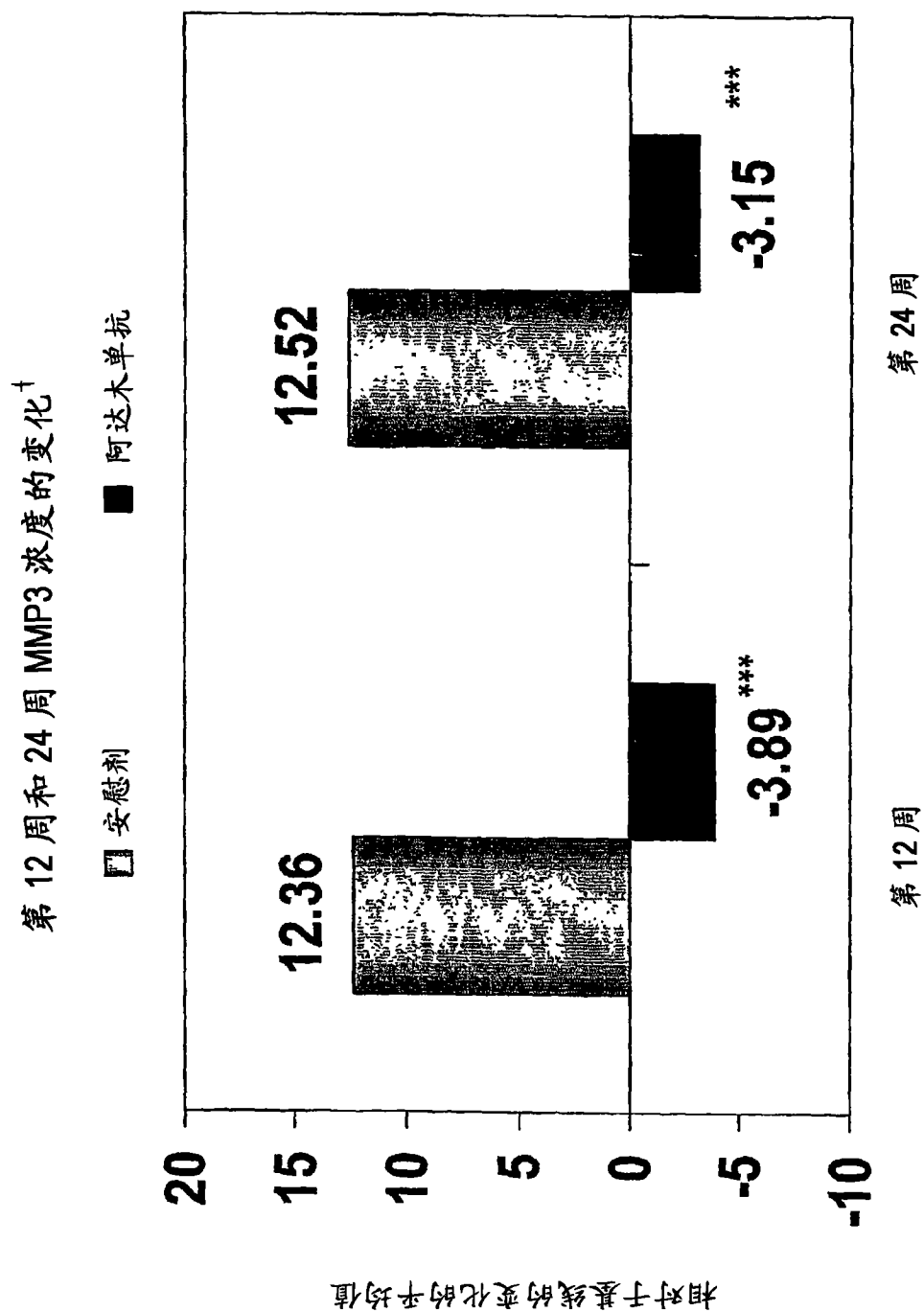
第12周和24周CTX-II浓度的变化<sup>†</sup>

■ 安慰剂      ■ 阿达木单抗



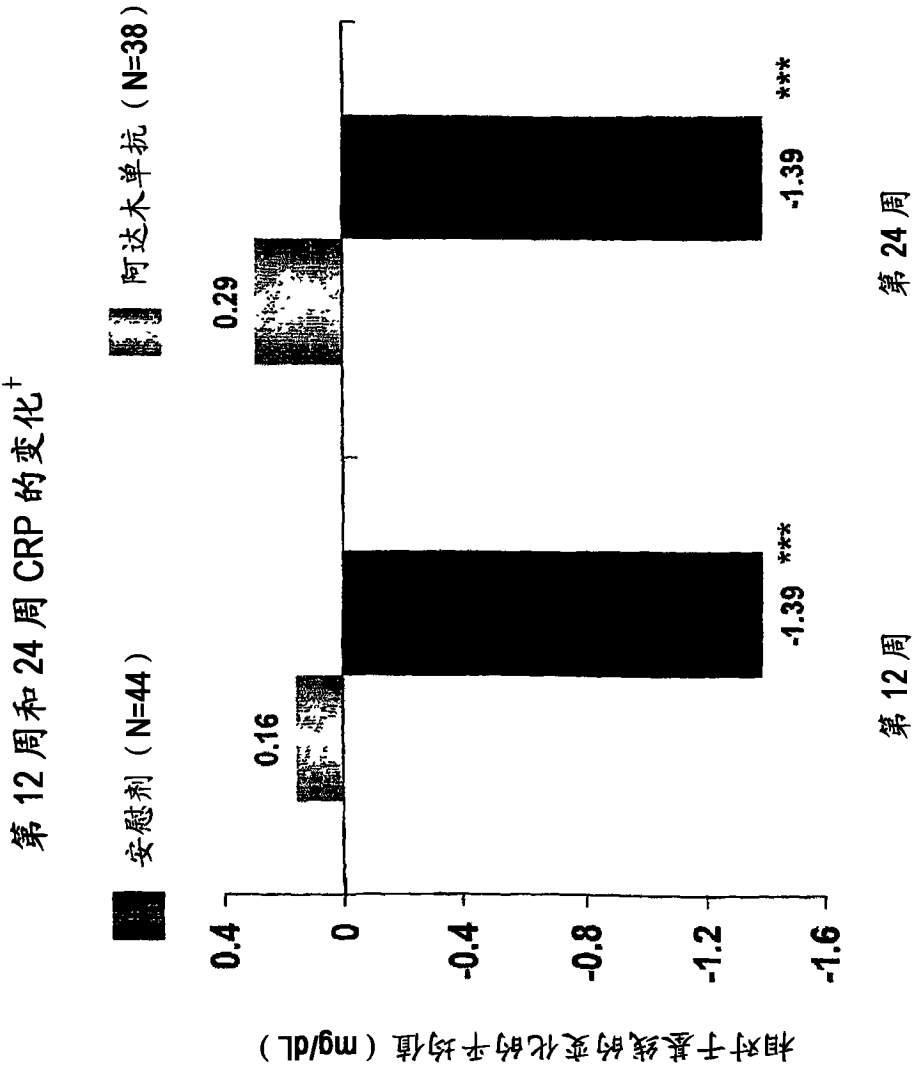
<sup>†</sup>LOCF 校正平均值    \*\*\* 统计学显著, P=0.001, 阿达木单抗对比安慰剂

图 2



<sup>†</sup>LOCF 校正平均值    \*\*\* 统计学显著, P=0.001, 阿达木单抗对比安慰剂

图 3



<sup>†</sup>LOCF \*\*\* 统计学显著, P=0.001. 通过 ANCOVA 获得的治疗组间差异的 P 值

图 4