(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-506916
(P2020-506916A)
(43)公表日　令和2年3月5日(2020.3.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	U	4B064
A61P 17/06	***(2006.01)***	A61P	17/06	ZNA	4C085
A61P 19/02	***(2006.01)***	A61P	19/02		4C086
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	4H045
A61K 31/519	***(2006.01)***	A61K	31/519		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 132 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-540538 (P2019-540538)
(86)(22)出願日　平成29年11月16日 (2017.11.16)
(85)翻訳文提出日　令和1年8月2日 (2019.8.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/061949
(87)国際公開番号　WO2018/140121
(87)国際公開日　平成30年8月2日 (2018.8.2)
(31)優先権主張番号　62/452,079
(32)優先日　平成29年1月30日 (2017.1.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

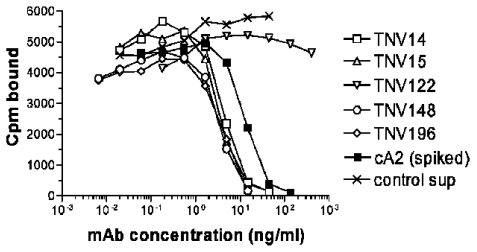
(71)出願人　509087759
ヤンセン　バイオテツク，インコーポレーテツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０４４ホーシヤム・リツジビユードライブ８００／８５０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林　純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】活動性乾癬性関節炎の治療のための抗ＴＮＦ抗体、組成物、及び方法

(57)【要約】
本発明は、活動性乾癬性関節炎（active Psoriatic Arthritis、ＰｓＡ）の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、抗ＴＮＦ抗体を利用する組成物及び方法に関する。

FIGURE 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤と、を含む、組成物であって、前記組成物が、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、前記抗ＴＮＦ抗体で処置された患者が、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６　ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６　ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する、組成物。
【請求項２】
前記抗ＴＮＦ抗体が、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で投与されるように、前記組成物が投与される、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記組成物をメトトレキサート（ＭＴＸ）と共に、又はメトトレキサートなしで投与することを更に含む、請求項１～２に記載の組成物。
【請求項４】
活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤と、を含む、組成物であって、前記組成物が、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、前記抗ＴＮＦ抗体で処置された患者が、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する、組成物。
【請求項５】
前記抗ＴＮＦ抗体が、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で投与されるように、前記組成物が投与される、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
前記組成物をメトトレキサート（ＭＴＸ）と共に、又はメトトレキサートなしで投与することを更に含む、請求項４～５に記載の組成物。
【請求項７】
活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体であって、前記抗ＴＮＦ抗体が、静脈内（ＩＶ）注入を介して投与され、前記処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する、抗ＴＮＦ抗体。
【請求項８】
前記患者の６５％以上が、５０％以上の処置差（プラセボと比較して改善）で、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する、請求項７に記載の抗ＴＮＦ抗体。
【請求項９】
前記抗体が、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、請求項７～８に記載の抗ＴＮＦ抗体。
【請求項１０】
前記抗体が、メトトレキサート（ＭＴＸ）と共に、又はメトトレキサートなしで投与される、請求項７～８に記載の抗ＴＮＦ抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、活動性乾癬性関節炎（active Psoriatic Arthritis、ＰｓＡ）の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（heavy chain、ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（light chain、ＬＣ）を有する抗ＴＮＦ抗体を利用する組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

ＴＮＦαは、１７ｋＤのタンパク質サブユニットの可溶性ホモ三量体である。ＴＮＦの膜結合型の２６ｋＤの前駆体形態もまた存在する。

【０００３】

単球又はマクロファージ以外の細胞もＴＮＦαを生成する。例えば、ヒト非単球腫瘍細胞株はＴＮＦα並びにＣＤ４＋及びＣＤ８＋末梢血Ｔリンパ球を生成し、いくつかの培養されたＴ及びＢ細胞株もＴＮＦαを生成する。

【０００４】

ＴＮＦαは、軟骨及び骨の分解、接着分子の誘導、血管内皮細胞で凝血促進活性を誘導する、好中球及びリンパ球の接着を増大させる、並びにマクロファージ、好中球及び血管内皮細胞からの血小板活性化因子の放出を刺激するなどの組織損傷をもたらす炎症誘発作用を引き起こす。

【０００５】

ＴＮＦαは、感染、免疫障害、腫瘍性病態、自己免疫病態及び移植片対宿主病態に関連している。ＴＮＦαと癌及び感染性病態との関連は、宿主の異化状態に関連していることが多い。癌患者は、通常食欲不振に関連する体重減少に悩まされる。

【０００６】

癌及び他の疾患に関連する大幅な衰弱は、「悪液質」として知られる。悪液質は、悪性腫瘍の成長に応答する、進行性の体重減少、食欲不振、及び除脂肪体重の持続的衰えを含む。悪液質状態は、多くの癌罹患率及び死亡率の原因となる。ＴＮＦαが、癌、感染性病態及び他の異化状態における悪液質に関与するという証拠がある。

【０００７】

ＴＮＦαは、発熱、倦怠感、食欲不振、及び悪液質を含む、グラム陰性敗血症及び内毒素ショックにおいて中心的な役割を果たすと考えられている。内毒素は、単球／マクロファージ生成並びにＴＮＦα及び他のサイトカインの分泌を強く活性化する。ＴＮＦα及び他の単球由来サイトカインは、内毒素に対する代謝及び神経ホルモン応答を媒介する。ヒトボランティアへの内毒素投与は、発熱、頻脈、増加した代謝速度、及びストレスホルモン放出など、インフルエンザのような症状を伴う急性疾患をもたらす。ＴＮＦαの循環が、グラム陰性敗血症に罹患した患者において増加する。

【０００８】

したがって、ＴＮＦαは、炎症性疾患、自己免疫疾患、ウイルス、細菌及び寄生虫感染、悪性腫瘍、並びに／又は神経変性疾患に関連付けられており、関節リウマチ及びクローン病などの疾患における特定の生物学的治療に有用な標的である。ＴＮＦαに対するキメラモノクローナル抗体（ｃＡ２）を用いた非盲検試験における有益な作用が、炎症の抑制、並びに関節リウマチ及びクローン病における再発後の良好な再処置と共に報告されている。ｃＡ２を用いた無作為の二重盲検プラセボ対照試験における有益な結果も、関節リウマチにおいて炎症の抑制と共に報告されている。

【０００９】

他の研究者は、インビトロで中和活性を有した組換えヒトＴＮＦに特異的なｍＡｂを説明している。これらのｍＡｂのうちのいくつかが、ヒトＴＮＦのエピトープをマッピングし、酵素イムノアッセイを開発するため、また組換えＴＮＦの精製を補助するために使用された。しかしながら、これらの研究は、免疫原性、低特異性、及び／又は薬学的不適性により、ヒトにおけるインビボ診断又は治療用途に使用することができるＴＮＦ中和抗体を生成するための基礎を提供しない。

【００１０】

ＴＮＦに対する中和抗血清又はｍＡｂは、ヒト以外の哺乳動物において、実験的内毒素血症及び菌血症における致死的攻撃後の有害な生理学的変化を抑止し、死亡を阻止することが示されている。この作用は、例えば、げっ歯類致死率アッセイ及び霊長類病理モデル系において示されている。

【００１１】

ｈＴＮＦの推定受容体結合座位が開示されており、ＴＮＦのアミノ酸１１～１３、３７～４２、４９～５７及び１５５～１５７からなるＴＮＦαの受容体結合座位が開示されている。

【００１２】

非ヒト哺乳類、キメラ、ポリクローナル（例えば、抗血清）、及び／又はモノクローナル抗体（Ｍａｂ）並びに断片（例えば、タンパク質分解消化又はその融合タンパク質生成物）は、場合によっては、ある特定の疾患を処置する試みのために調査されている有力な治療薬である。しかしながら、かかる抗体又は断片は、ヒトに投与された場合、免疫応答を誘発する場合がある。かかる免疫応答は、血液循環からの抗体又は断片の免疫複合媒介クリアランスをもたらし、反復投与を、治療に不適なものとし得、それにより、患者に対する治療的利益が低減し、抗体又は断片の再投与が制限される。例えば、非ヒト部分を含む抗体又は断片の反復投与は、血清病及び／又はアナフィラキシーをもたらし得る。これら及び他の問題を回避するために、当該技術分野において周知のように、キメラ化及びヒト化を含む、かかる抗体及びその部分の免疫原性を低減するための多くのアプローチが取られてきた。しかしながら、これら及び他のアプローチは尚も、多少の免疫原性、低親和性、低結合活性を有する、又は細胞培養、スケールアップ、生成及び／若しくは低収率における問題を伴う抗体又は断片をもたらし得る。したがって、かかる抗体又は断片は、治療用タンパク質としての製造又は使用にあまり理想的には適していない可能性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

したがって、これらの問題のうちのもう１つを克服する抗ＴＮＦ抗体又は断片、並びに既知の抗体又はその断片の改善を提供する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、静脈内（intravenous、ＩＶ）注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、健康評価質問表障害指標スコア（Health Assessment Questionnaire Disability Index score、ＨＡＱ－ＤＩ）＝－０．６０±０．５３標準偏差（standard deviation、ＳＤ）、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、３６項目ショートフォーム健康調査身体サマリースコア（36-item Short-Form Health Survey Physical Summary score、ＳＦ－３６ＰＣＳ）＝８．６５±７．６０ＳＤ、及び３６項目ショートフォーム健康調査精神成分サマリースコア（36-item Short-Form Health Survey Mental Component Summary score、ＳＦ－３６ＭＣＳ）＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００１５】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、静脈内（ＩＶ）注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指

炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００１６】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００１７】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００１８】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、ＭＴＸと共に、又はＭＴＸなしで投与され、組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００１９】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２０】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３Ｓ

Ｄ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２１】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＭＴＸと共に、又はＭＴＸなしで投与され、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２２】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の１４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ＨＡＱ－ＤＩ＝－０．６０±０．５３ＳＤ、腱付着部炎＝－１．８７±１．７５ＳＤ、指炎＝－７．８±８．５７ＳＤ、ＳＦ－３６ＰＣＳ＝８．６５±７．６０ＳＤ、及びＳＦ－３６ＭＣＳ＝５．３３±９．９５ＳＤからなる群から選択される１つ又は２つ以上の基準におけるベースラインからの平均変化を達成し、方法は、前述の前、同時、又は後に、（ａ）検出可能な標識又はレポーター、ＴＮＦ拮抗薬、抗リウマチ薬、筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌薬、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、刺激薬、ぜんそく薬、β作動薬、吸入ステロイド、エピネフリン若しくは類似薬、サイトカイン、又はサイトカイン拮抗薬のうちの少なくとも１つから選択される、有効量の少なくとも１つの化合物又はタンパク質を含む少なくとも１つの組成物を投与することを更に含む。

【００２３】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、静脈内（ＩＶ）注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、修正総ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｈｅｉｊｄｅシャープスコア（total modified van der Heijde-Sharp score、ｖｄＨ－Ｓ）＝－０．３６±０．１４４標準誤差（Standard error、ＳＥ）におけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２４】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、静脈内（ＩＶ）注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２５】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための配列番号

３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、ＭＴＸと共に、又はＭＴＸなしで投与され、抗ＴＮＦ抗体は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、静脈内（ＩＶ）注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２６】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２７】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２８】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療において使用するための、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を提供し、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００２９】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００３０】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００３１】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＭＴＸと共に、又はＭＴＸなしで投与され、組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍ

ｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成する。

【００３２】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、ＭＴＸと共に、又はＭＴＸなしで投与され、組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置の２４週目に、抗ＴＮＦ抗体で処置された患者は、ｖｄＨ－Ｓ＝－０．３６±０．１４４ＳＥにおけるベースラインからの平均変化を達成し、方法は、前述の前、同時、又は後に、（ａ）検出可能な標識又はレポーター、ＴＮＦ拮抗薬、抗リウマチ薬、筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌薬、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、刺激薬、ぜんそく薬、β作動薬、吸入ステロイド、エピネフリン若しくは類似薬、サイトカイン、又はサイトカイン拮抗薬のうちの少なくとも１つから選択される、有効量の少なくとも１つの化合物又はタンパク質を含む少なくとも１つの組成物を投与することを更に含む。

【００３３】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療又は予防において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、ＩＶ注入を介して投与され、以下の表における応答からなる群から選択される臨床応答を誘発する。

【００３４】

【表１】

	プラセボ	ゴリムマブ2mg／kg	P値
無作為化した患者、n	239	241	
14週目における臨床的有効性			
ACR20、n（%）	52（21．8%）	181（75．1%）	p＜0．001
ACR50、n（%）	15（6．3%）	105（43．6%）	p＜0．001
ACR70、n（%）	5（2．1%）	59（24．5%）	p＜0．001
PASI75、n（%）*	27／198（13．6%）	116／196（59．2%）	p＜0．001
最小疾患活動性			
MDA n／N（%）	10／239（4．2%）	65／241（27．0%）	p＜0．001
治療が必要な数			
NNT（95%CI）		1．9（1．64、2．18）	
24週目の臨床的有効性			
ACR50、n（%）	15（6．3%）	129（53．5%）	
*3%以上のBSA関与を有する患者間 ACR、米国リウマチ学会基準（American College of Rheumatology Criteria）；PASI、乾癬の面積及び重症度指標（Psoriasis Area Severity Index）			

【００３５】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療又は予防において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、ＩＶ注入を介して投与され、処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する。

【００３６】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療又は予防において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する。

【００３７】

本発明は、活動性乾癬性関節炎の安全かつ有効な治療又は予防において使用するための配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する、少なくとも１つの単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を提供し、前述の抗ＴＮＦ抗体は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成し、前述の６５％以上の患者が、５０％以上の処置差（プラセボと比較して改善）で、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する。

【００３８】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する。

【００３９】

本発明は、ＴＮＦ関連状態を治療するための方法を提供し、ＴＮＦ関連状態は、活動性乾癬性関節炎であり、方法は、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する安全かつ有効量の単離された哺乳類抗ＴＮＦ抗体を含む組成物を投与することを含み、前述の組成物は、０及び４週目に、次いでその後８週間毎（ｑ８ｗ）に、３０±１０分にわたって２ｍｇ／ｋｇの用量で、ＩＶ注入を介して投与され、処置を受けている患者の６５％以上が、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成し、前述の６５％以上の患者が、５０％以上の処置差（プラセボと比較して改善）で、処置の１４週目にＡＣＲ２０を達成する。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１】ハイブリドーマ細胞上清中のＴＮＶ　ｍＡｂが組換えＴＮＦ受容体へのＴＮＦα結合を阻害する能力のアッセイを示すグラフ表示を示す。既知量のＴＮＶ　ｍＡｂを含有する様々な量のハイブリドーマ細胞上清を、固定濃度（５ｎｇ／ｍＬ）の^{125}Ｉ標識ＴＮＦαと共にプレインキュベートした。混合物を、組換えＴＮＦ受容体／ＩｇＧ融合タンパク質ｐ５５－ｓｆ２で予めコーティングされた９６ウェルのＯｐｔｉｐｌａｔｅに移した。ｍＡｂの存在下でｐ５５受容体に結合したＴＮＦαの量は、未結合の材料を洗い流し、γ計数器を使用して計数した後に決定した。これらの実験において８つのＴＮＶ　ｍＡｂ試料を試験したが、簡潔化のため、ＤＮＡ配列分析により、他のＴＮＶ　ｍＡｂのうちの１つと同一であることを示したｍＡｂのうちの３つ（セクション５．２．２を参照のこと）は、ここに示されていない。各試料を二重に試験した。示される結果は、２つの独立した実験を代表する。

【図２Ａ】ＴＮＶ　ｍＡｂ重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示す。示される生殖系列遺伝子は、ＤＰ－４６遺伝子である。「ＴＮＶｓ」は、示される配列がＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１９６の配列であることを示す。ＴＮＶ配列の最初の３つのヌクレオチドは、翻訳開始Ｍｅｔコドンを定義する。ＴＮＶ　ｍＡｂ遺伝子配列中の点線は、ヌクレオチドが生殖系列配列中のものと同じであることを示す。ＴＮＶ配列の最初の１９のヌクレオチド（下線付き）は、可変領域をＰＣＲ増幅するために使用されたオリゴヌクレオチドに対応する。成熟ｍＡｂで始まるアミノ酸翻訳（一文字表記）は、生殖系列遺

伝子についてのみ示される。生殖系列アミノ酸翻訳における３つのＣＤＲドメインは、太字で示され、下線付きである。ＴＮＶ１４８（Ｂ）と標識された行は、示される配列がＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４８Ｂの両方に関することを示す。生殖系列ＤＮＡ配列（ＣＤＲ３）中のギャップは、知られていないか又は生殖系列遺伝子に存在しない配列のためである。ＴＮＶ　ｍＡｂ重鎖は、Ｊ６結合領域を使用する。

【図２Ｂ】ＴＮＶ　ｍＡｂ重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示す。示される生殖系列遺伝子は、ＤＰ－４６遺伝子である。「ＴＮＶｓ」は、示される配列がＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１９６の配列であることを示す。ＴＮＶ配列の最初の３つのヌクレオチドは、翻訳開始Ｍｅｔコドンを定義する。ＴＮＶ　ｍＡｂ遺伝子配列中の点線は、ヌクレオチドが生殖系列配列中のものと同じであることを示す。ＴＮＶ配列の最初の１９のヌクレオチド（下線付き）は、可変領域をＰＣＲ増幅するために使用されたオリゴヌクレオチドに対応する。成熟ｍＡｂで始まるアミノ酸翻訳（一文字表記）は、生殖系列遺伝子についてのみ示される。生殖系列アミノ酸翻訳における３つのＣＤＲドメインは、太字で示され、下線付きである。ＴＮＶ１４８（Ｂ）と標識された行は、示される配列がＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４８Ｂの両方に関することを示す。生殖系列ＤＮＡ配列（ＣＤＲ３）中のギャップは、知られていないか又は生殖系列遺伝子に存在しない配列のためである。ＴＮＶ　ｍＡｂ重鎖は、Ｊ６結合領域を使用する。

【図３】ＴＮＶ　ｍＡｂ軽鎖可変領域のＤＮＡ配列を示す。示される生殖系列遺伝子は、ヒトκ生殖系列可変領域遺伝子のＶｇ／３８Ｋファミリーの代表的なメンバーである。ＴＮＶ　ｍＡｂ遺伝子配列中の点線は、ヌクレオチドが生殖系列配列中のものと同じであることを示す。ＴＮＶ配列の最初の１６のヌクレオチド（下線付き）は、可変領域をＰＣＲ増幅するために使用されたオリゴヌクレオチドに対応する。成熟ｍＡｂのアミノ酸翻訳（一文字表記）は、生殖系列遺伝子についてのみ示される。生殖系列アミノ酸翻訳における３つのＣＤＲドメインは、太字で示され、下線付きである。ＴＮＶ１４８（Ｂ）と標識された行は、示される配列がＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４８Ｂの両方に関することを示す。生殖系列ＤＮＡ配列（ＣＤＲ３）中のギャップは、知られていないか又は生殖系列遺伝子に存在しない配列のためである。ＴＮＶ　ｍＡｂ軽鎖は、Ｊ３結合領域を使用する。

【図４】ＴＮＶ　ｍＡｂ重鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す。示されるアミノ酸配列（一文字表記）は、非クローン化ＰＣＲ生成物及びクローン化ＰＣＲ生成物の両方から決定されたＤＮＡ配列から推定された。分泌シグナル配列（シグナル）、フレームワーク（ＦＷ）、及び相補性決定領域（ＣＤＲ）ドメインに分割したアミノ配列が示される。ＤＰ－４６生殖系列遺伝子のアミノ酸配列は、各ドメインの上の行に示されている。点線は、ＴＮＶ　ｍＡｂにおけるアミノ酸が生殖系列遺伝子と同一であることを示す。ＴＮＶ１４８（Ｂ）は、示される配列がＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４８Ｂの両方に関することを示す。「ＴＮＶ」は、異なる配列が示されない限り、示される配列が全てのＴＮＶ　ｍＡｂに関することを示す。生殖系列配列（ＣＤＲ３）中の破線は、配列が知られていないか又は生殖系列遺伝子に存在しないことを示す。

【図５】ＴＮＶ　ｍＡｂ軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す。示されるアミノ酸配列（一文字表記）は、非クローン化ＰＣＲ生成物及びクローン化ＰＣＲ生成物の両方から決定されたＤＮＡ配列から推定された。分泌シグナル配列（シグナル）、フレームワーク（ＦＷ）及び相補性決定領域（ＣＤＲ）ドメインに分割したアミノ配列が示される。Ｖｇ／３８Ｋ型軽鎖生殖系列遺伝子のアミノ酸配列は、各ドメインの上の行に示される。点線は、ＴＮＶ　ｍＡｂにおけるアミノ酸が生殖系列遺伝子と同一であることを示す。ＴＮＶ１４８（Ｂ）は、示される配列がＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４８Ｂの両方に関することを示す。「Ａｌｌ」は、示される配列がＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、ＴＮＶ１４８Ｂ、及びＴＮＶ１８６に関することを示す。

【図６】ｒＴＮＶ１４８Ｂ発現Ｃ４６６細胞を作製するために使用された重鎖及び軽鎖発現プラスミドの概略図を示す。ｐ１７８３は重鎖プラスミドであり、ｐ１７７６は軽鎖プラスミドである。ｒＴＮＶ１４８Ｂ可変及び定常領域コードドメインは、黒色のボックスで示される。Ｊ－Ｃイントロンの免疫グロブリンエンハンサは、灰色のボックスで示され

る。関連する制限部位が示される。Ａｂ遺伝子の転写が時計方向に進むように配向されたプラスミドが示される。プラスミドｐ１７８３の長さは１９．５３ｋｂであり、プラスミドｐ１７７６の長さは１５．０６ｋｂである。両プラスミドの完全なヌクレオチド配列は既知である。ｐ１７８３の可変領域コード配列は、ＢｓｉＷＩ／ＢｓｔＢＩ制限断片を置き換えることにより、別の重鎖可変領域配列に容易に置き換えることができる。ｐ１７７６の可変領域コード配列は、ＳａｌＩ／ＡｆｌＩＩ制限断片を置き換えることにより、別の可変領域配列に置き換えることができる。

【図７】５つのｒＴＮＶ１４８Ｂ生成細胞株の成長曲線分析のグラフ表示を示す。３０ｍｌの容量中に１．０×１０^{5}細胞／ｍｌの生存細胞密度を有するように、Ｔ７５フラスコ内のＩ５Ｑ＋ＭＨＸ培地に細胞を播種することにより、０日目に培養を開始した。これらの研究に使用された細胞培養物は、トランスフェクション及びサブクローニングが行われるため、連続培養であった。その後、Ｔフラスコ内の細胞を十分に再懸濁し、０．３ｍｌの培養物のアリコートを取り出した。成長曲線研究は、細胞計数が１．５×１０^{5}細胞／ｍｌ未満に低下したときに終了した。アリコート中の生細胞数をトリパン（typan）ブルー排除により決定し、残りのアリコートは後のｍＡｂ濃度決定のために保管された。ヒトＩｇＧのＥＬＩＳＡが、同じ時に全ての試料アリコートに対して行われた。

【図８】様々なＭＨＸ選択物濃度の存在下での細胞成長速度の比較のグラフ表示を示す。細胞サブクローンＣ４６６Ａ及びＣ４６６Ｂを、無ＭＨＸ培地（ＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン）に解凍し、更に２日間培養した。次いで、両細胞培養物を、ＭＨＸなし、０．２×ＭＨＸ又は１×ＭＨＸのいずれかを含有した３つの培養に分割した。１日後、新しいＴ７５フラスコに、１×１０^{5}細胞／ｍｌの開始密度で培養物を播種し、細胞を１週間、２４時間間隔で計数した。最初の５日間の倍加時間は、ＳＯＰ　ＰＤ３２．０２５の式を使用して計算し、バーの上に示す。

【図９】２つのｒＴＮＶ１４８Ｂ生成細胞株からの経時的なｍＡｂ生成の安定性のグラフ表示を示す。トランスフェクション及びサブクローニングを行った後、連続培養にあった細胞のサブクローンを使用して、２４ウェル培養皿中での長期連続培養を開始した。ＭＨＸ選択物を伴う又は伴わないＩ５Ｑ培地中で細胞を培養した。細胞を、４～６日毎に培養物を分けることにより連続して継代して、新たな生存培養物を維持し、同時に前の培養物を消耗させた。消耗した細胞上清のアリコートは、培養物が消耗した直後に回収し、ｍＡｂ濃度が決定されるまで保管した。ヒトＩｇＧのＥＬＩＳＡが、同じ時に全ての試料アリコートに対して行われた。

【図１０】実施例４の対照と比較した、本発明の抗ＴＮＦ抗体に応答した関節炎マウスモデルマウスＴｇ１９７の体重変化を示す。約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき９つの処置群のうちの１つに割り当て、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ（Ｄ－ＰＢＳ）、又は１ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇのいずれかの本発明の抗ＴＮＦ抗体（ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１４８、若しくはＴＮＶ１９６）の単回腹腔内ボーラス用量で処置した。体重を投与前からの変化として分析したとき、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究を通してＤ－ＰＢＳ処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この体重増加は、３～７週目で有意であった。１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物も、研究の７週目に有意な体重増加を達成した。

【図１１Ａ】実施例４に示す関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、３週目から始まり、残りの研究全体を通して（７週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目以降のＡＩにおいて有意な減少を示すことができなかった。各々を類似の用量の他のものと比較したとき（１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４、１４８、及び１９６と比較した１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２）、１０ｍｇ／ｋｇの処置群の間に有意差はなかった。１ｍｇ／ｋｇの処置群を比較したとき、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２よりも３、４及び７週で有意に低いＡＩを示した。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８も、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４処置群よりも３及び４週目で有意に低かった。ＴＮＶ１９６は研究の６週目ま

でＡＩにおいて有意な減少を示したが（Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき）、ＴＮＶ１４８はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の１ｍｇ／ｋｇ処置群であった。
【図１１Ｂ】実施例４に示す関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、３週目から始まり、残りの研究全体を通して（７週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目以降のＡＩにおいて有意な減少を示すことができなかった。各々を類似の用量の他のものと比較したとき（１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４、１４８、及び１９６と比較した１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２）、１０ｍｇ／ｋｇの処置群の間に有意差はなかった。１ｍｇ／ｋｇの処置群を比較したとき、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２よりも３、４及び７週で有意に低いＡＩを示した。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８も、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４処置群よりも３及び４週目で有意に低かった。ＴＮＶ１９６は研究の６週目までＡＩにおいて有意な減少を示したが（Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき）、ＴＮＶ１４８はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の１ｍｇ／ｋｇ処置群であった。
【図１１Ｃ】実施例４に示す関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、３週目から始まり、残りの研究全体を通して（７週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目以降のＡＩにおいて有意な減少を示すことができなかった。各々を類似の用量の他のものと比較したとき（１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４、１４８、及び１９６と比較した１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２）、１０ｍｇ／ｋｇの処置群の間に有意差はなかった。１ｍｇ／ｋｇの処置群を比較したとき、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２よりも３、４及び７週で有意に低いＡＩを示した。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８も、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４処置群よりも３及び４週目で有意に低かった。ＴＮＶ１９６は研究の６週目までＡＩにおいて有意な減少を示したが（Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき）、ＴＮＶ１４８はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の１ｍｇ／ｋｇ処置群であった。
【図１２】実施例５の対照と比較した、本発明の抗ＴＮＦ抗体に応答した関節炎マウスモデルマウスＴｇ１９７の体重変化を示す。約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを体重に基づき８つの処置群のうちの１つに割り当て、対照品（Ｄ－ＰＢＳ）、又は３ｍｇ／ｋｇの抗体（ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１４８）（０週目）の腹腔内ボーラス投与で処置した。注射は１、２、３及び４週目に全ての動物において繰り返された。群１～６は、試験品の有効性に関して評価された。群７及び８の動物から得られた血清試料は、２、３及び４週目のＴＮＶ１４又はＴＮＶ１４８の免疫応答誘導及び薬物動態クリアランスに関して評価された。
【図１３Ａ】関節炎指数に基づく実施例５の疾患の重症度の進行を表すグラフである。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、２週目から始まり、残りの研究全体を通して（５週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも有意に低かった。１ｍｇ／ｋｇ又は３ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物及び３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点でＡＩにおいて任意の有意な減少を達成することができなかった。３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目から始まり、５週目まで継続する有意な減少を示した。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究の４及び５週目でより低い用量の両ｃＡ２（１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇ）と比較したとき、ＡＩにおいて有意な減少を示し、また３～５週目でＴＮＶ１４で処置した動物よりも有意に低かった。３ｍｇ／ｋｇの処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物に関するＡＩは、ある時点で１０ｍｇ／ｋｇよりも有意に高く、一方ＴＮＶ１４８で処置した動物は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物と有意に異ならなかった。
【図１３Ｂ】関節炎指数に基づく実施例５の疾患の重症度の進行を表すグラフである。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、２週目から始まり、残りの研究全体を通して（５週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも有意に低かった。１ｍｇ／ｋｇ又は３ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物及び３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物は、ｄ－ＰＢ

Ｓ対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点でＡＩにおいて任意の有意な減少を達成することができなかった。３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目から始まり、５週目まで継続する有意な減少を示した。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究の４及び５週目でより低い用量の両ｃＡ２（１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇ）と比較したとき、ＡＩにおいて有意な減少を示し、また３～５週目でＴＮＶ１４で処置した動物よりも有意に低かった。３ｍｇ／ｋｇの処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物に関するＡＩは、ある時点で１０ｍｇ／ｋｇよりも有意に高く、一方ＴＮＶ１４８で処置した動物は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物と有意に異ならなかった。

【図１３Ｃ】関節炎指数に基づく実施例５の疾患の重症度の進行を表すグラフである。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、２週目から始まり、残りの研究全体を通して（５週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも有意に低かった。１ｍｇ／ｋｇ又は３ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物及び３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点でＡＩにおいて任意の有意な減少を達成することができなかった。３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目から始まり、５週目まで継続する有意な減少を示した。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究の４及び５週目でより低い用量の両ｃＡ２（１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇ）と比較したとき、ＡＩにおいて有意な減少を示し、また３～５週目でＴＮＶ１４で処置した動物よりも有意に低かった。３ｍｇ／ｋｇの処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物に関するＡＩは、ある時点で１０ｍｇ／ｋｇよりも有意に高く、一方ＴＮＶ１４８で処置した動物は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物と有意に異ならなかった。

【図１４】実施例６の対照と比較した、本発明の抗ＴＮＦ抗体に応答した関節炎マウスモデルマウスＴｇ１９７の体重変化を示す。約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき６つの処置群のうちの１つに割り当て、３ｍｇ／ｋｇ又は５ｍｇ／ｋｇのいずれかの抗体（ｃＡ２又はＴＮＶ１４８）の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。この研究は、Ｄ－ＰＢＳ及び１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２対照群を利用した。

【図１５】実施例６に示す関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。全ての処置群が初期の時点で多少の保護を示し、５ｍｇ／ｋｇのｃＡ２及び５ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１～３週目にＡＩにおいて有意な減少を示し、全ての処置群が２週目で有意な減少を示した。実験の後期に、５ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は多少の保護を示し、４、６及び７週目で有意に減少した。低用量（３ｍｇ／ｋｇ）のｃＡ２及びＴＮＶ１４８は両方とも、６週目で有意な減少を示し、全ての処置群が７週目で有意な減少を示した。研究の終わりで（８週目）有意な減少を維持することができた処置群はなかった。任意の時点で処置群のいずれかの間（食塩水対照群は除く）に有意差はなかった。

【図１６】実施例７の対照と比較した、本発明の抗ＴＮＦ抗体に応答した関節炎マウスモデルマウスＴｇ１９７の体重変化を示す。ＴＮＶ１４８（ハイブリドーマ細胞に由来する）及びｒＴＮＶ１４８Ｂ（トランスフェクトした細胞に由来する）の単回腹腔内投与の有効性を比較するために。約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき９つの処置群のうちの１つに割り当て、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ（Ｄ－ＰＢＳ）、又は１ｍｇ／ｋｇの抗体（ＴＮＶ１４８、ｒＴＮＶ１４８Ｂ）の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。

【図１７】実施例７に示す関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、４週目から始まり、残りの研究全体を通して（８週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。ＴＮＶ１４８で処置した群及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群は両方とも、４週目でＡＩにおける有意な減少を示した。以前の研究（Ｐ－０９９－０１７）は、ＴＮＶ１４８が単回の１ｍｇ／ｋｇの腹腔内ボーラス後の関節炎指数の減少にわずかにより効果的であることを示したが、この研究では、両バージョンのＴＮＶ抗体で処置した群からのＡＩがわずかに高いことを示した。１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群（６週目を除く）は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２群と比較したとき、有

意に増加せず、ＴＮＶ１４８で処置した群は、７及び８週目で有意に高かったが、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８及び１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８Ｂの間には研究の任意の時点でＡＩにおいて有意差はなかった。

【図１８】活動性乾癬性関節炎（ＰｓＡ）を有する対象において静脈内投与されたＳｉｍｐｏｎｉ（ゴリムマブ）の試験のための研究デザインの図を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４１】

本発明は、配列番号１、２、及び３の重鎖可変ＣＤＲ領域の全て、並びに／若しくは配列番号４、５、及び６の軽鎖可変ＣＤＲ領域の全てを含む、単離された組換え及び／又は合成抗ＴＮＦヒト、霊長類、げっ歯類、哺乳類、キメラ、ヒト化若しくはＣＤＲ移植された抗体、及びそれに対するＴＮＦ抗イディオタイプ抗体、並びに少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体又は抗イディオタイプ抗体をコード化する少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物及びコード核酸分子を提供する。本発明は、診断用及び治療用組成物、方法、並びにデバイスを含む、かかる核酸及び抗体、並びに抗イディオタイプ抗体の作製及び使用方法を更に含むが、これらに限定されない。

【００４２】

本明細書で使用するとき、「抗腫瘍壊死因子α抗体」、「抗ＴＮＦ抗体」、「抗ＴＮＦ抗体部分」若しくは「抗ＴＮＦ抗体断片」、及び／又は「抗ＴＮＦ抗体変異体」などは、本発明の抗体中に組み込まれ得る、重鎖若しくは軽鎖のうちの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）若しくはそのリガンド結合部分、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域、又はこれらの任意の部分、あるいはＴＮＦ受容体又は結合タンパク質の少なくとも一部分などであるが、これらに限定されない免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含む、任意のタンパク質又はペプチド含有分子を含む。かかる抗体は、任意選択的に、特定のリガンドに更に影響を及ぼし、これらに限定されないが、かかる抗体は、インビトロで、その場で、及び／又はインビボで、少なくとも１つのＴＮＦ活性若しくは結合、又はＴＮＦ受容体活性若しくは結合を調節、減少、増加、拮抗、作動、軽減、緩和、遮断、阻害、抑止、及び／又は干渉する。非限定的な例として、本発明の好適な抗ＴＮＦ抗体、特定された部分又は変異体は、少なくとも１つのＴＮＦ又はその特定された部分、変異体若しくはドメインに結合することができる。好適な抗ＴＮＦ抗体、特定された部分又は変異体はまた、任意選択的に、ＲＮＡ、ＤＮＡ、若しくはタンパク質合成、ＴＮＦ放出、ＴＮＦ受容体シグナル伝達、膜ＴＮＦ切断、ＴＮＦ活性、ＴＮＦ生成、及び／又は合成などであるがこれらに限定されない、ＴＮＦ活性又は機能のうちの少なくとも１つに影響を及ぼすこともできる。「抗体」という用語は、更に、抗体、その消化断片、特定された部分、及び変異体を包含することを意図し、これには抗体模倣薬が挙げられるか、又は抗体の構造及び／若しくは機能を模倣する抗体の部分若しくはその特定断片若しくは一部分を含み、単鎖抗体及びその断片が挙げられる。機能断片としては、哺乳類のＴＮＦに結合する抗原結合断片が挙げられる。例えば、Ｆａｂ（例えば、パパイン消化による）、Ｆａｂ’（例えば、ペプシン消化及び部分的還元による）及びＦ（ａｂ’）$_2$（例えば、ペプシン消化による）、ｆａｃｂ（例えば、プラスミン消化による）、ｐＦｃ’（例えば、ペプシン又はプラスミン消化による）、Ｆｄ（例えば、ペプシン消化、部分的還元及び再集合による）、Ｆｖ又はｓｃＦｖ（例えば、分子生物学的技術による）断片が挙げられるがこれらに限定されない、ＴＮＦ又はその部分に結合することができる抗体断片が、本発明に包含される（例えば、上記のＣｏｌｌｉｇａｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙを参照のこと）。

【００４３】

かかる断片は、当該技術分野において既知であるように、及び／又は本明細書に記載されるように、酵素切断、合成又は組換え技術により生成することができる。抗体は、１つ以上の終止コドンが自然な終止部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して、様々な切断型でも生成され得る。例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$重鎖部分をコード化する遺伝子の組み合わせは、重鎖のＣＨ$_1$ドメイン及び／又はヒンジ領域をコード化するＤＮＡ配列を含むよ

う設計することができる。抗体の様々な部分を従来の技術により化学的に結合することができ、又は遺伝子工学技術を用いて隣接タンパク質（contiguous protein）として調製することができる。

【００４４】

本明細書で使用するとき、「ヒト抗体」という用語は、実質的にタンパク質の全ての部分（例えば、ＣＤＲ、フレームワーク、C_L、C_Hドメイン（例えば、C_H1、C_H2、C_H3）、ヒンジ（V_L、V_H））が軽微な配列の変化又は変異だけで実質的にヒトにおいて非免疫原性である抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスターなど）、及び他の哺乳類動物を指定された抗体は、かかる種、亜属、属、亜科、及び科の特異的抗体を指定する。更に、キメラ抗体は、上記の任意の組み合わせを含む。このような変化又は変異は、任意選択的に、また好ましくは、非改変抗体に比べて、ヒト又は他の種における免疫原性を保持するか又は低下させる。したがって、ヒト抗体は、キメラ又はヒト化抗体とは異なる。ヒト抗体は、機能的に再構成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖及び／又は軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物、又は原核若しくは真核細胞により生成され得ることが指摘される。更に、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、天然のヒト抗体では見られないリンカーペプチドを含み得る。例えば、Ｆｖは、重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を接続する２～約８個のグリシン又は他のアミノ酸残基などのリンカーペプチドを含み得る。このようなリンカーペプチドは、ヒト由来のものとみなされる。

【００４５】

また、少なくとも２つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル、好ましくはヒト又はヒト化抗体である、二重特異的、異種特異的、異種結合性、又は類似の抗体を使用してもよい。この場合では、結合特異性のうち一方は少なくとも１つのＴＮＦタンパク質に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。二重特異的抗体の製造方法は、当該技術分野において既知である。従来、二重特異的抗体の組換え体生成は、２種の免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の共発現に基づくが、ここで２本の重鎖は異なる特異性を有する（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ、Ｎａｔｕｒｅ、３０５：５３７（１９８３））。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は１０種の異なる抗体分子の可能な混合物を生成し、これらのうち１種のみが正しい二重特異的構造を有する。正しい分子の精製（通常アフィニティクロマトグラフィ工程により行われる）は、かなり面倒であり、生成物の収率は低い。類似する手順が、例えば、国際公開第９３／０８８２９号、米国特許第６，２１０，６６８号、同第６，１９３，９６７号、同第６，１３２，９９２号、同第６，１０６，８３３号、同第６，０６０，２８５号、同第６，０３７，４５３号、同第６，０１０，９０２号、同第５，９８９，５３０号、同第５，９５９，０８４号、同第５，９５９，０８３号、同第５，９３２，４４８号、同第５，８３３，９８５号、同第５，８２１，３３３号、同第５，８０７，７０６号、同第５，６４３，７５９号、同第５，６０１，８１９号、同第５，５８２，９９６号、同第５，４９６，５４９号、同第４，６７６，９８０号、国際公開第９１／００３６０号、国際公開第９２／００３７３号、欧州特許第０３０８９号、Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：３６５５（１９９１）、Ｓｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ１２１：２１０（１９８６）に開示されており、これらの各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００４６】

本発明の方法及び組成物において有用である抗ＴＮＦ抗体（ＴＮＦ抗体とも称される）は、ＴＮＦへの高親和性結合、並びに任意選択的にかつ好ましくは低毒性を有することによって、任意選択的に特徴付けられ得る。具体的には、可変領域、定常領域、及びフレームワークなどの個々の構成要素が、個々に及び／又は集合的に、任意選択的にまた好ましくは低い免疫原性を有する、本発明の抗体、その特定された断片、又は変異体が本発明において有用である。本発明で使用することができる抗体は、任意選択的に、症状の測定可

能な緩和並びに低い及び／又は許容できる毒性を備えて、長期間患者を治療する能力によって特徴付けられる。低い若しくは許容される免疫原性、及び／又は高い親和性、並びに他の好適な特性は、得られる治療結果に寄与することができる。「低い免疫原性」は、本明細書では、治療される患者の約７５％未満、若しくは好ましくは約５０％未満で有意にＨＡＨＡ、ＨＡＣＡ、若しくはＨＡＭＡ応答が増加する、及び／又は治療される患者において低い力価（二重抗原酵素イムノアッセイで測定したとき約３００未満、好ましくは約１００未満）が増加することとして定義される（Ｅｌｌｉｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３４４：１１２５－１１２７（１９９４）、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【００４７】

有用性：本発明の単離核酸は、細胞、組織、器官又は動物（哺乳類及びヒトを含む）において測定し、又は作用して、免疫障害若しくは疾患、循環器障害若しくは疾患、感染性、悪性及び／若しくは神経性障害又は疾患のうちの少なくとも１つから選択されるがこれらに限定されない、少なくとも１つのＴＮＦ状態を診断、監視、調節、処置、緩和、発生を予防するのを助ける、又はその症状を低減するために使用され得る、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体又はその特定された変異体を生成するために使用され得る。

【００４８】

かかる方法は、症状、作用、又は機序のかかる調節、処置、緩和、予防、若しくは低減を必要としている細胞、組織、器官、動物又は患者に、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む有効量の組成物又は薬学的組成物を投与することを含み得る。有効量は、本明細書に記載される、又は関連分野で既知である、既知の方法を使用して行い決定するとき、単回（例えば、ボーラス）、複数回、若しくは持続投与あたり約０．００１～５００ｍｇ／ｋｇの量、又は単回、複数回、若しくは持続投与あたり０．０１～５０００μｇ／ｍＬの血清濃度を達成する量、又はこの中の任意の有効範囲若しくは値を含み得る。引用文献。本明細書で引用する全ての刊行物又は特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、本発明の時点での最高水準を示し、かつ／又は本発明の説明及び使用可能性を提供する。刊行物は、任意の科学刊行物若しくは特許公報、又は全ての記録された電子若しくは印刷型式を含む、任意の媒体形式で利用可能な他の任意の情報を指す。以下の文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる：Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，ＮＹ（１９８７－２００１）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）、Ｃｏｌｌｉｇａｎ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ（１９９４－２００１）、Ｃｏｌｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ，ＮＹ，（１９９７－２００１）。

【００４９】

本発明の抗体：配列番号１、２、及び３の重鎖可変ＣＤＲ領域の全て、並びに／又は配列番号４、５、及び６の軽鎖可変ＣＤＲ領域の全てを含む、本発明の少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体は、任意選択的に、当該技術分野において周知であるように、細胞株、混合細胞株、不死化細胞又は不死化細胞のクローン集団により生成され得る。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，ＮＹ（１９８７－２００１）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎ

e，antibodies，a Laboratory Manual，Cold Spring Harbor，NY（１９８９）、Colligan，et al.，eds.，Current Protocols in Immunology，John Wiley&Sons，Inc.，NY（１９９４－２００１）、Colligan et al.，Current Protocols in Protein Science，John Wiley&Sons，NY，NY，（１９９７－２００１）を参照されたく、各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００５０】

ヒトＴＮＦタンパク質又はその断片に特異的なヒト抗体は、単離された及び／若しくはＴＮＦタンパク質、又はそれらの一部分（合成ペプチドなどの合成分子を含む）などの適切な免疫原性抗原に対して生じ得る。他の特定の又は一般的な哺乳類抗体も同様に生じ得る。免疫原性抗原の調製及びモノクローナル抗体の生成は、任意の好適な技術を使用して行うことができる。

【００５１】

１つのアプローチでは、ハイブリドーマは、好適な不死化細胞株（例えば、Ｓｐ２／０、Ｓｐ２／０－ＡＧ１４、ＮＳＯ、ＮＳ１、ＮＳ２、ＡＥ－１、Ｌ．５、＞２４３、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、Ｓｐ２ＳＡ３、Ｓｐ２ＭＡＩ、Ｓｐ２ＳＳ１、Ｓｐ２ＳＡ５、Ｕ９３７、ＭＬＡ１４４、ＡＣＴ　ＩＶ、ＭＯＬＴ４、ＤＡ－１、ＪＵＲＫＡＴ、ＷＥＨＩ、Ｋ－５６２、ＣＯＳ、ＲＡＪＩ、ＮＩＨ３Ｔ３、ＨＬ－６０、ＭＬＡ１４４、ＮＡＭＡＩＷＡ、ＮＥＵＲＯ２Ａなどであるがこれらに限定されない骨髄腫細胞株、又はヘテロミローマ（heteromylomas）、その融合生成物、又はそれらに由来する任意の細胞若しくは融合細胞、又は当該技術分野において既知の任意の他の好適な細胞株を融合させることにより生成される。例えば、ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ、ｗｗｗ．ｌｉｆｅｔｅｃｈ．ｃｏｍ．などを参照のこと。単離若しくはクローニングされた脾臓、末梢血、リンパ、扁桃、又は他の免疫若しくはＢ細胞含有細胞などであるがこれらに限定されない抗体生成細胞、あるいは組換え若しくは内因性、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫類、爬虫類、魚類、哺乳類、げっ歯類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ヒツジ、霊長類、真核生物、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ，ｒＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ若しくはＲＮＡ、葉緑体ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、一本鎖、二本鎖若しくは三本鎖、ハイブリダイズなど、又はそれらの組み合わせのような、内因性若しくは異種の核酸のいずれかとして、重鎖若しくは軽鎖定常若しくは可変若しくはフレームワーク若しくはＣＤＲ配列を発現する任意の他の細胞を有する。例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ及びＣｏｌｌｉｇａｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｃｈａｐｔｅｒ２を参照されたく、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００５２】

抗体産生細胞はまた、目的の抗原で免疫化されたヒト又は他の好適な動物の末梢血、又は好ましくは脾臓若しくはリンパ節から得ることもできる。任意の他の好適な宿主細胞も、本発明の抗体、特定された断片又はその変異体をコード化する異種若しくは内因性の核酸を発現するために使用され得る。融合細胞（ハイブリドーマ）又は組換え細胞は、選択的培養条件又は他の好適な既知の方法を使用して単離され、限界希釈若しくは細胞選別又は他の既知の方法によってクローニングされ得る。所望の特異性を有する抗体を生成する細胞は、好適なアッセイ（例えばＥＬＩＳＡ）によって選択することができる。

【００５３】

ペプチド又はタンパク質ライブラリから組換え抗体を選択する（例えば、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、ＲＮＡ、ｃＤＮＡなどのディスプレイライブラリであるがこれに限定されない、例えば、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ，ＵＫ、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ，Ｍａｒｔｉｎｓｒｅｉｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，ＤＥ、Ｂｉｏｖａｔｉｏｎ，Ａｂｅｒｄｅｅｎ，Ｓｃｏｔｌａｎｄ，ＵＫ、ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ，Ｌｕｎｄ，Ｓｗｅｄｅｎ、Ｄｙａｘ　Ｃｏｒｐ．，Ｅｎｚｏｎ，Ａｆｆｙｍａｘ／Ｂｉｏｓｉｔｅ、Ｘｏｍａ，Ｂｅｒｋｅｌ

ｅｙ，ＣＡ、Ｉｘｓｙｓ。例えば、欧州特許第３６８，６８４号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９２／０１７５５号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９２／００２２４０号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９２／００８８３号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９３／００６０５号、米国特許出願公開第０８／３５０２６０号（５／１２／９４）、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９４／０１４２２号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９４／０２６６２号、国際出願ＰＣＴ／ＧＢ９７／０１８３５号、（ＣＡＴ／ＭＲＣ）、国際公開第９０／１４４４３号、国際公開第９０／１４４２４号、国際公開第９０／１４４３０号、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９４／１２３４号、国際公開第９２／１８６１９号、国際公開第９６／０７７５４号、（Ｓｃｒｉｐｐｓ）、欧州特許第６１４　９８９号（ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ）、国際公開第９５／１６０２７号（ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ）、国際公開第８８／０６６３０号、国際公開第９０／３８０９号（Ｄｙａｘ）、米国特許第４，７０４，６９２号（Ｅｎｚｏｎ）、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９１／０２９８９号、国際公開第８９／０６２８３号、欧州特許第３７１　９９８号、欧州特許第５５０　４００号、（Ｘｏｍａ）、欧州特許第２２９　０４６号、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７１４９号、又は確率論的に生成されるペプチド若しくはタンパク質－米国特許第５７２３３２３号、同第５７６３１９２号、同第５８１４４７６号、同第５８１７４８３号、同第５８２４５１４号、同第５９７６８６２号、国際公開第８６／０５８０３号、欧州特許第５９０　６８９号（Ｉｘｓｙｓ、現在はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ（ＡＭＥ）、各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）か、又は当該技術分野において既知であり、かつ／又は本明細書に記載される、ヒト抗体のレパートリーを生成することができるトランスジェニック動物の免疫化に依存する（例えば、ＳＣＩＤマウス、Ｎｇｕｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４１：９０１－９０７（１９９７）、Ｓａｎｄｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：９５－１１８（１９９６）、Ｅｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．９３：１５４－１６１（１９９８）（各々は、参照により全体が組み込まれる）、並びに関連する特許及び出願）方法を含むがこれらに限定されない、必要な特異性の抗体を生成又は単離する他の好適な方法を使用することができる。かかる技術には、リボソームディスプレイ（Ｈａｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９４：４９３７－４９４２（Ｍａｙ　１９９７）、Ｈａｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：１４１３０－１４１３５（Ｎｏｖ．１９９８））、単一細胞抗体生成技術（例えば、選択リンパ球抗体方法（「ＳＬＡＭ」）（米国特許第５，６２７，０５２号、Ｗｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７：８８７－８９２（１９８７）、Ｂａｂｃｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：７８４３－７８４８（１９９６））、ゲルマイクロドロップレット（ｇｅｌ　ｍｉｃｒｏｄｒｏｐｌｅｔ）、及びフローサイトメトリー（Ｐｏｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：３３３－３３７（１９９０）、Ｏｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ、Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍ．Ｍｅｔｈ．１８２：１５５－１６３（１９９５）、Ｋｅｎｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌ．１３：７８７－７９０（１９９５））、Ｂ細胞選択物（Ｓｔｅｅｎｂａｋｋｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｓ　１９：１２５－１３４（１９９４）、Ｊｏｎａｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｇｒｅｓｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｖｏｌ．５，Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ，ｅｄ．，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ　Ｂ．Ｖ．，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ（１９８８））が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５４】

非ヒト抗体又はヒト抗体を工学的処理又はヒト化するための方法も同様に使用でき、当該技術分野において周知である。一般に、ヒト化又は工学処理された抗体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、又は他の哺乳動物などであるがこれらに限定されない、非ヒトの供給源からの１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒトアミノ酸残

基は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、典型的には既知のヒト配列の「インポート」可変領域、定常領域又は他のドメインから採取される。既知のヒトＩｇ配列が開示されており、例えば、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、ａｘｉｍｔ１．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／ＡＨＯｓｅｍｉｎａｒ／Ｓｌｉｄｅ０１．ｈｔｍｌ、ｗｗｗ．ｃｒｙｓｔ．ｂｂｋ．ａｃ．ｕｋ／～ｕｂｃｇ０７ｓ／、ｗｗｗ．ｎｉｍｒ．ｍｒｃ．ａｃ．ｕｋ／ＣＣ／ｃｃａｅｗｇ／ｃｃａｅｗｇ．ｈｔｍ、ｗｗｗ．ｐａｔｈ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／～ｍｒｃ７／ｈｕｍａｎｉｓａｔｉｏｎ／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．Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ（１９８３）である（各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【００５５】

このようなインポートされた配列は、免疫原性を減少させるため、あるいは、当該技術分野において既知のように、結合、親和性、オン速度、オフ速度、結合活性、特異性、半減期、又は他の好適な任意の特性を低減、増強又は改変するために使用することができる。一般に、非ヒト若しくはヒトＣＤＲ配列の一部又は全ては、可変及び定常領域の非ヒト配列がヒト若しくは他のアミノ酸に置き換えられる間も維持される。抗体はまた、任意選

択的に、抗原に対する高い親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持したままで、ヒト化され得る。この目的を達成するために、任意選択的に、ヒト化抗体を、親配列及びヒト化配列の３次元モデルを使用した、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析プロセスによって調製することが可能である。３次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補の免疫グロブリン配列について、可能性の高い３次元立体構造を図示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補の免疫グロブリン配列の機能における残基の役割として可能性の高いものの分析、即ち候補の免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増大など、望ましい抗体特性が達成されるように、コンセンサス配列及びインポート配列から、ＦＲ残基を選択し組み合わせることができる。一般的に、ＣＤＲ残基は抗原結合に対する影響において、直接的かつ最も実質的に関与している。本発明の抗体のヒト化又は工学的処理は、Ｗｉｎｔｅｒ（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２（１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３（１９８８）、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４（１９８８））、Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６（１９９３）、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１（１９８７），Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：４２８５（１９９２）、Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２６２３（１９９３）、米国特許第５７２３３２３号、同第５９７６８６２号、同第５８２４５１４号、同第５８１７４８３号、同第５８１４４７６号、同第５７６３１９２号、同第５７２３３２３号、同第５，７６６８８６号、同第５７１４３５２号、同第６２０４０２３号、同第６１８０３７０号、同第５６９３７６２号、同第５５３０１０１号、同第５５８５０８９号、同第５２２５５３９号、同第４８１６５６７号、国際出願ＰＣＴ／：ＵＳ９８／１６２８０号、ＵＳ９６／１８９７８号、ＵＳ９１／０９６３０号、ＵＳ９１／０５９３９号、ＵＳ９４／０１２３４号、ＧＢ８９／０１３３４号、ＧＢ９１／０１１３４号、ＧＢ９２／０１７５５号、国際公開第９０／１４４４３号、国際公開第９０／１４４２４号、国際公開第９０／１４４３０号、欧州特許第２２９２４６号（各々、参照により全体が明細書に組み込まれ、その中に引用される文献を含む）に記載されるものなどであるがこれらに限定されない、任意の既知の方法を使用して行うことができる。

【００５６】

抗ＴＮＦ抗体はまた、任意選択的に、本明細書に記載されかつ／又は当該技術分野において既知である、ヒト抗体のレパートリーを生成することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、非ヒト霊長類など）の免疫化により生成することもできる。ヒト抗ＴＮＦ抗体を生成する細胞をかかる動物から単離し、本明細書に記載される方法などの好適な方法を使用して不死化してもよい。

【００５７】

ヒト抗原に結合するヒト抗体のレパートリーを生成することができるトランスジェニックマウスは、既知の方法によって生成することができる（例えば、これらに限定されないが、Ｌｏｎｂｅｒｇらに発行された米国特許第５，７７０，４２８号、同第５，５６９，８２５号、同第５，５４５，８０６号、同第５，６２５，１２６号、同第５，６２５，８２５号、同第５，６３３，４２５号、同第５，６６１，０１６号、及び同第５，７８９，６５０号、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓらの国際公開第９８／５０４３３号、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓらの国際公開第９８／２４８９３号、Ｌｏｎｂｅｒｇらの国際公開第９８／２４８８４号、Ｌｏｎｂｅｒｇらの国際公開第９７／１３８５２号、Ｌｏｎｂｅｒｇらの国際公開第９４／２５５８５号、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｅらの国際公開第９６／３４０９６号、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｅらの欧州特許第０４６３　１５１（Ｂ１）号、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｅらの欧州特許第０７１０　７１９（Ａ１）号、Ｓｕｒａｎｉらの米国特許第５，５４５，８０７号、Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎらの国際公開第９０／０４０３６号、Ｂｒｕ

ｇｇｅｍａｎｎらの欧州特許第０４３８　４７４（Ｂ１）号、Ｌｏｎｂｅｒｇらの欧州特許第０８１４　２５９（Ａ２）号、Ｌｏｎｂｅｒｇらのイギリス特許第２　２７２　４４０（Ａ）号、Ｌｏｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　３６８：８５６－８５９（１９９４）、Ｔａｙｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６（４）５７９－５９１（１９９４）、Ｇｒｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　７：１３－２１（１９９４）、Ｍｅｎｄｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１５：１４６－１５６（１９９７）、Ｔａｙｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０（２３）：６２８７－６２９５（１９９２）、Ｔｕａｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ９０（８）３７２０－３７２４（１９９３）、Ｌｏｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１３（１）：６５－９３（１９９５）、及びＦｉｓｈｗａｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４（７）：８４５－８５１（１９９６）、これらはそれぞれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。一般に、これらのマウスは、機能的に再配列された、又は機能的な再配列を受けることができる少なくとも１つのヒト免疫グロブリン遺伝子座からのＤＮＡを含む、少なくとも１つの導入遺伝子を含む。このようなマウスの内因性免疫グロブリン遺伝子座を分断又は欠失させて、内因性遺伝子によりコード化されている抗体を産生する動物の能力を除去することができる。

【００５８】

類似のタンパク質又は断片への特異的結合についての抗体のスクリーニングは、ペプチドディスプレイライブラリを使用して首尾よく達成することができる。この方法は、望ましい機能又は構造を持つ個々のメンバーについてペプチドの多数の試料採集をスクリーニングすることを伴う。ペプチドディスプレイライブラリの抗体スクリーニングは、当該技術分野において周知である。ディスプレイされたペプチド配列の長さは、３～５０００個以上のアミノ酸であり、頻繁には５～１００個のアミノ酸長、多くは約８～２５個のアミノ酸長であり得る。ペプチドライブラリを作成する直接的化学合成方法に加えて、いくつかの組換えＤＮＡ方法も記述されている。１つのタイプには、バクテリオファージ又は細胞の、表面上のペプチド配列のディスプレイが関与している。各バクテリオファージ又は細胞は、特定のディスプレイされたペプチド配列をコード化するヌクレオチド配列を含有する。このような方法は、国際公開第９１／１７２７１号、同第９１／１８９８０号、同第９１／１９８１８号、及び同第９３／０８２７８号に記載されている。ペプチドのライブラリを作成するための他のシステムは、インビトロ化学合成及び組換え方法の両方の局面を有する。国際公開第９２／０５２５８号、同第９２／１４８４３号、及び同第９６／１９２５６号を参照されたい。また、米国特許第５，６５８，７５４号及び同第５，６４３，７６８号も参照されたい。ペプチドディスプレイライブラリ、ベクター、及びスクリーニングキットは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）及びＣａｍｂｒｉｄｇｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ，ＵＫ）のような供給元から市販されている。例えば、Ｅｎｚｏｎに譲渡された米国特許第４７０４６９２号、同第４９３９６６６号、同第４９４６７７８号、同第５２６０２０３号、同第５４５５０３０号、同第５５１８８８９号、同第５５３４６２１号、同第５６５６７３０号、同第５７６３７３３号、同第５７６７２６０号、同第５８５６４５６号、Ｄｙａｘに譲渡された同第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６９８号、同第５８３７５００号、Ａｆｆｙｍａｘに譲渡された同第５４２７９０８号、同第５５８０７１７号、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓに譲渡された同第５８８５７９３号、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈに譲渡された同第５７５０３７３号、Ｘｏｍａに譲渡された同第５６１８９２０号、同第５５９５８９８号、同第５５７６１９５号、同第５６９８４３５号、同第５６９３４９３号、同第５６９８４１７号、Ｃｏｌｌｉｇａｎ（上記）、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、又は上記のＳａｍｂｒｏｏｋを参照されたく、上記特許及び刊行物の各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００５９】

本発明の抗体はまた、かかる抗体を乳中に生成するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどのト

ランスジェニック動物又は哺乳動物を提供するために、核酸をコード化する少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を使用して調製することもできる。かかる動物は、既知の方法を使用して提供することができる。例えば、これらに限定されないが、米国特許第５，８２７，６９０号、同第５，８４９，９９２号、同第４，８７３，３１６号、同第５，８４９，９９２号、同第５，９９４，６１６号、同第５，５６５，３６２号、同第５，３０４，４８９号などを参照されたい（それらの各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【００６０】

本発明の抗体は、植物部分又はそれから培養された細胞において、かかる抗体、特定された部分又は変異体を生成するトランスジェニック植物及び培養された植物細胞（例えば、タバコ及びトウモロコシであるが、これらに限定されない）を提供するために、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体コード核酸を使用して更に調製することができる。非限定的な例として、例えば、誘導プロモータを使用して、組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉をうまく使用して大量の組換えタンパク質が提供されてきた。例えば、Ｃｒａｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４０：９５－１１８（１９９９）及びその中で引用される文献を参照されたい。また、トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系において生成されるか、又は天然源から精製されるタンパク質に等しい生物学的活性を有する、商業生成レベルで哺乳類タンパク質を発現するために使用されてきた。例えば、Ｈｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６４：１２７－１４７（１９９９）及びその中で引用される文献を参照のこと。抗体はまた、タバコ種子及びポテト塊茎を含む、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）などの抗体断片を含むトランスジェニック植物種子からも大量に生成されてきた。例えば、Ｃｏｎｒａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８：１０１－１０９（１９９８）及びその中で引用される文献を参照のこと。したがって、本発明の抗体はまた、既知の方法により、トランスジェニック植物を使用して生成することもできる。例えば、Ｆｉｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０：９９－１０８（Ｏｃｔ．，１９９９），Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１３：５２２－７（１９９５）、Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１０９：３４１－６（１９９５）、Ｗｈｉｔｅｌａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２２：９４０－９４４（１９９４）、及びその中で引用される文献も参照されたい。また、限定されないが、一般に抗体の植物発現についても参照のこと。上記文献の各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００６１】

本発明の抗体は、広範囲にわたる親和性（K_D）でヒトＴＮＦに結合することができる。好ましい実施形態では、本発明の少なくとも１つのヒトｍＡｂは、任意選択的にヒトＴＮＦに高い親和性で結合することができる。例えば、ヒトｍＡｂは、ヒトＴＮＦを約10^{-7}Ｍ以下、例えば０．１～９．９（又はその中の任意の範囲若しくは値）Ｘ10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}又はその中の任意の範囲若しくは値など（ただしこれらに限定されない）のK_Dで結合することができる。

【００６２】

抗原に対する抗体の親和性又は結合活性は、任意の好適な方法を用いて実験的に決定することができる。（例えば、Ｂｅｒｚｏｆｓｋｙ，ｅｔ ａｌ．，「Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ａｎｔｉｇｅｎ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ，」Ｉｎ Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｐａｕｌ，Ｗ．Ｅ．，Ｅｄ．，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（１９８４）；Ｋｕｂｙ，Ｊａｎｉｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（１９９２）；及び本明細書に記述される方法を参照されたい）。特定の抗体抗原相互作用の測定される親和性は、異なる条件（例えば、塩濃度、ｐＨ）下で測定された場合に異なり得る。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメータ（例えば、K_D、K_a、K_d）の測定は、好ましくは、抗体及び抗原の標準化溶液、並びに本明細書で記載される緩衝剤などの標準化緩衝剤を

用いて行われる。
【００６３】
核酸分子。配列番号１、２、３、４、５、６、７、８のうちの少なくとも１つの隣接アミノ酸の少なくとも７０～１００％をコード化するヌクレオチド配列、特定された断片、変異体若しくはそれらのコンセンサス配列、又はこれらの配列のうちの少なくとも１つを含む寄託ベクターなどの本明細書に提供される情報を使用して、配列番号１、２、及び３の重鎖可変ＣＤＲ領域の全て並びに／又は配列番号４、５、及び６の軽鎖可変ＣＤＲ領域の全てを含む少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体をコード化する本発明の核酸分子は、本明細書に記載されるか、又は当該技術分において既知の方法を使用して得ることができる。
【００６４】
本発明の核酸分子は、ｍＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｔＲＮＡ若しくは任意の他の形態のようなＲＮＡの形態、又はクローニングにより得られる若しくは合成的に生成されるｃＤＮＡ及びゲノムＤＮＡが挙げられるがこれらに限定されないＤＮＡの形態、又はこれらの任意の組み合わせであってよい。ＤＮＡは、３本鎖、２本鎖若しくは１本鎖、又はこれらの任意の組み合わせであってよい。ＤＮＡ又はＲＮＡの少なくとも１本の鎖の任意の部分は、センス鎖としても知られるコード鎖であってもよいし、又はアンチセンス鎖と呼ばれる、非コード鎖であってもよい。
【００６５】
本発明の単離された核酸分子は、任意選択的に１つ以上のイントロンを有するオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、例えば、これらに限定されないが、少なくとも１つの重鎖（例えば、配列番号１～３）若しくは軽鎖（例えば、配列番号４～６）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３のような、少なくとも１つのＣＤＲの少なくとも１つの特定された部分を含む核酸分子、抗ＴＮＦ抗体若しくは可変領域のコード配列（例えば、配列番号７、８）を含む核酸分子、並びに上述の核酸分子とは実質的に異なるが、遺伝コードの縮重により、本明細書に記載されかつ／又は当該技術分野において既知である少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を尚もコード化するヌクレオチド配列を含む核酸分子を含み得る。当然のことながら、遺伝コードは、当該技術分野において周知である。したがって、当業者には、本発明の特定の抗ＴＮＦ抗体をコード化する、かかる縮重核酸変異体を生成することは、日常的であろう。例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌらを参照されたく、かかる核酸変異体は、本発明に含まれる。本発明の単離核酸分子の非限定的な例としては、それぞれＨＣ　ＣＤＲ１、ＨＣ　ＣＤＲ２、ＨＣ　ＣＤＲ３、ＬＣ　ＣＤＲ１、ＬＣ　ＣＤＲ２、ＬＣ　ＣＤＲ３、ＨＣ可変領域及びＬＣ可変領域をコード化する核酸の非限定的な例に対応する、配列番号１０、１１、１２、１３、１４、１５が挙げられる。
【００６６】
本明細書に示されるように、抗ＴＮＦ抗体をコード化する核酸を含む本発明の核酸分子は、それ自体で抗体断片のアミノ酸配列をコード化するもの、全抗体若しくはその一部のコード配列、抗体、断片若しくは部分のコード配列、並びに追加の配列、例えば、少なくとも１つのイントロンなど、前述の追加のコード配列を伴って、又は伴わずに、非コード５’及び３’配列、例えば、スプライシング及びポリアデニル化シグナル（例えば、ｍＲＮＡのリボソーム結合及び安定性）を含む、転写、ｍＲＮＡプロセシングにおいて役割を果たす転写された非翻訳配列を含むがこれに限定されない追加の非コード配列と共に、少なくとも１つのシグナルリーダー若しくは融合ペプチドのコード配列、更なるアミノ酸、例えば、更なる機能性を提供するアミノ酸をコード化する追加のコード配列を挙げることができるが、これらに限定されない。したがって、抗体をコード化する配列は、抗体断片又は部分を含む融合された抗体の精製を促進するペプチドをコード化する配列などのマーカー配列に融合させることができる。
【００６７】
本明細書に記載されるポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド。本発明は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドに対して、選択的なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする単離核酸を提供する。したがって、本実施形態の

ポリヌクレオチドは、このようなポリヌクレオチドを含む核酸を単離、検出、及び／又は定量化するために使用することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドを使用して、蓄積されたライブラリにおける部分又は完全長クローンを同定、単離、又は増幅することができる。いくつかの実施形態においては、ポリヌクレオチドは、単離された、又はそうでなければヒト若しくは哺乳類の核酸ライブラリからのｃＤＮＡに相補的な、ゲノム配列又はｃＤＮＡ配列である。

【００６８】

好ましくは、ｃＤＮＡライブラリは、完全長配列の少なくとも８０％、好ましくは完全長配列の少なくとも８５％又は９０％、及びより好ましくは完全長配列の少なくとも９５％を含む。ｃＤＮＡライブラリは、稀な配列の発現量を増大させるために正規化してよい。相補的な配列に対して低減した配列同一性を持つ配列と共に使用される、ストリンジェンシーが低度又は中度のハイブリダイゼーション条件が典型的であるが、排他的ではない。ストリンジェンシーが中度及び高度の条件は、任意選択的に、より高い同一性を持つ配列に対して使用することができる。低ストリンジェンシー条件は、約７０％の配列同一性を持つ配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オーソロガス又はパラロガス配列を同定するために利用できる。

【００６９】

任意選択的に、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されているポリヌクレオチドによってコード化される抗体の少なくとも一部をコード化することになる。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコード化するポリヌクレオチドに対する選択的ハイブリダイゼーションのために利用可能な核酸配列を包含する。例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、上記のＣｏｌｌｉｇａｎを参照されたく、各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００７０】

核酸の構築。本発明の単離核酸は、当技術分野にて周知のように、（ａ）組換え方法、（ｂ）合成技術、（ｃ）精製技術、又はこれらの組み合わせを使用して作製することができる。

【００７１】

核酸は、本発明のポリヌクレオチドに加えて、首尾よく配列を含むことができる。例えば、１つ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位を含むマルチクローニングサイトを核酸に挿入して、ポリヌクレオチドの単離に役立てることができる。また、翻訳可能な配列を挿入して、本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離に役立てることができる。例えば、ヘキサヒスチジンマーカー配列は、本発明のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。本発明の核酸（コード配列を除く）は、任意選択的に、本発明のポリヌクレオチドのクローニング及び／又は発現のためのベクター、アダプター又はリンカーである。

【００７２】

追加の配列をかかるクローニング及び／又は発現配列に付加して、クローニング及び／又は発現におけるそれらの機能を最適化し、ポリヌクレオチドの単離に役立てることができるか、又は細胞へのポリヌクレオチドの導入を改善することができる。クローン化ベクター、発現ベクター、アダプター、及びリンカーの使用は、当該技術分野において周知である。（例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、又は上記のＳａｍｂｒｏｏｋを参照のこと。）

【００７３】

核酸を構築するための組換え方法。ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、又はこれらの任意の組み合わせのような本発明の単離核酸組成物は、当業者に既知の任意の数のクローニング手順を用いて生物源から得ることができる。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドに対して厳しい条件下で選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブが、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡライブラリ内の望ましい配列を同定するために使用される。ＲＮＡの単離、並びにｃＤＮＡ及びゲノムライブラリの構築は、当業者には周知である。（例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、又は上記のＳａｍｂｒｏｏｋを参照のこと。）

【００７４】
核酸のスクリーニング及び単離方法。本明細書で開示されているような、本発明のポリヌクレオチドの配列に基づいたプローブを用いて、ｃＤＮＡ又はゲノムライブラリをスクリーニングすることができる。プローブを使用して、同じ又は異なる生体内の相同遺伝子を単離するため、ゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡ配列にハイブリダイズさせることができる。当業者であれば、アッセイに様々な度合のハイブリダイゼーションストリンジェンシーを用いることができ、ハイブリダイゼーション又は洗浄媒質のいずれかがストリンジェントであり得ることを理解するであろう。ハイブリダイゼーションのための条件が厳しくなるにつれて、二重鎖形成が生じるために、プローブと標的との間の相補性の程度が大きくなるはずである。ストリンジェンシーの程度は、温度、イオン強度、ｐＨ、及びホルムアミドのような部分的に変性する溶媒の存在、のうちの１つ以上によって制御され得る。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば、０％～５０％の範囲内でのホルムアミド濃度の操作により反応溶液の極性を変えることにより首尾よく変更される。検出可能な結合のために必要な相補性（配列同一性）の程度は、ハイブリダイゼーション媒質及び／又は洗浄媒質のストリンジェンシーに従って変化する。相補性の程度は、最適には１００％、又は７０～１００％、又はその中の任意の範囲若しくは値である。しかしながら、プローブ及びプライマー内のわずかな配列変動は、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄媒質のストリンジェンシーを低下させることで補償できるということを理解すべきである。

【００７５】
ＲＮＡ又はＤＮＡの増幅方法は当該技術分野において周知であり、本明細書で紹介する教示及び指針に基づいて、過度の実験なしに、本発明に従って使用可能である。

【００７６】
ＤＮＡ又はＲＮＡ増幅の既知の方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction、ＰＣＲ）及び関連する増幅プロセス（例えば、Ｍｕｌｌｉｓらの米国特許第４，６８３，１９５号、同第４，６８３，２０２号、同第４，８００，１５９号、同第４，９６５，１８８号、Ｔａｂｏｒらの同第４，７９５，６９９号及び同第４，９２１，７９４号、Ｉｎｎｉｓの同第５，１４２，０３３号、Ｗｉｌｓｏｎらの同第５，１２２，４６４号、Ｉｎｎｉｓの同第５，０９１，３１０号、Ｇｙｌｌｅｎｓｔｅｎらの同第５，０６６，５８４号、Ｇｅｌｆａｎｄらの同第４，８８９，８１８号、Ｓｉｌｖｅｒらの同第４，９９４，３７０号、Ｂｉｓｗａｓの同第４，７６６，０６７号、Ｒｉｎｇｏｌｄの同第４，６５６，１３４号を参照されたい）、及び二本鎖ＤＮＡ合成のためのテンプレートとして標的配列に対してアンチセンスＲＮＡを使用するＲＮＡ媒介増幅（Ｍａｌｅｋらの米国特許第５，１３０，２３８号、商標名ＮＡＳＢＡを持つ）が挙げられるが、これらに限定されない（これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。（例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、又は上記のＳａｍｂｒｏｏｋを参照されたい。）

【００７７】
例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術を用いて、ゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡライブラリから直接、本発明のポリヌクレオチド及び関連する遺伝子の配列を増幅することができる。ＰＣＲ及び他のインビトロ増幅方法はまた、例えば、発現すべきタンパク質をコード化する核酸配列をクローニングする、サンプル中の所望のｍＲＮＡの存在を検出するため、核酸の配列決定のため、又は他の目的のためのプローブとして用いるための核酸を作製するのに有用であり得る。インビトロ増幅方法によって当業者を導くのに十分な技術の例は、上記のＢｅｒｇｅｒ、上記のＳａｍｂｒｏｏｋ及び上記のＡｕｓｕｂｅｌ並びにＭｕｌｌｉｓら米国特許第４，６８３，２０２号（１９８７）、及びＩｎｎｉｓ，ｅｔ ａｌ．，ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）に見られる。ゲノムＰＣＲ増幅用の市販キットは当該技術分野において既知である。例えば、Ａｄｖａｎｔａｇｅ－ＧＣ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＰＣＲ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を参照されたい。加えて、例えば、Ｔ４遺伝子３２

タンパク質（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を用いて、長いＰＣＲ産物の収率を改善することができる。

【００７８】

核酸を構築するための合成方法。本発明の単離核酸は、既知の方法による直接化学合成によっても調製可能である（例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌらを参照）。化学合成は、一般に、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、又は１本鎖をテンプレートとして使用するＤＮＡポリメラーゼとの重合によって、２本鎖ＤＮＡに変換可能な１本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。当業者であれば、ＤＮＡの化学合成は約１００以上の塩基の配列に限定され得るものの、より長い配列は、より短い配列の連結反応によって得ることができることを認識するであろう。

【００７９】

組換え発現カセット。本発明は、本発明の核酸を含む組換え発現カセットを更に提供する。本発明の核酸配列、例えば本発明の抗体をコード化するｃＤＮＡ又はゲノム配列を用いて、少なくとも１つの所望の宿主細胞に導入できる組換え発現カセットを構築することができる。組換え発現カセットは、典型的には、意図される宿主細胞においてポリヌクレオチドの転写を導く、転写開始調節配列に機能的に連結される、本発明のポリヌクレオチドを含む。異種及び非異種（すなわち、内因性）プロモータの両方を使用して、本発明の核酸の発現を導くことができる。

【００８０】

いくつかの実施形態では、プロモータ、エンハンサ、又は他の要素として機能する単離核酸を、本発明のポリヌクレオチドの発現を上方又は下方調節するために、本発明のポリヌクレオチドの非異種形の適切な位置（上流、下流、又はイントロン内）に導入することができる。例えば、インビボ又はインビトロで、突然変異、欠失及び／又は置換により、内因性プロモータを変えることができる。

【００８１】

ベクター及び宿主細胞。本発明は、本発明の単離核酸分子を含むベクター、組換えベクターで遺伝子工学処理された宿主細胞、及び当該技術分野において周知である組換え技術による少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の生成にも関する。例えば、上記のＳａｍｂｒｏｏｋら、上記のＡｕｓｕｂｅｌらを参照されたく、各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００８２】

ポリヌクレオチドは、任意選択的に、宿主の増殖についての選択マーカーを含有するベクターに結合することができる。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物のような沈殿物内、又は荷電脂質との複合体内に導入される。ベクターがウイルスである場合は、適切なパッケージング細胞株を用いてインビトロでこれをパッケージングし、その後、宿主細胞内に形質導入することができる。

【００８３】

ＤＮＡ挿入物は、適切なプロモータに機能的に連結されるべきである。発現コンストラクトは、転写開始部位、転写終結部位、及び転写された領域内では翻訳のためのリボソーム結合部位を更に含む。構築により発現する成熟した転写産物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるべきｍＲＮＡの開始時の翻訳開始部位及び終了時に適切に位置付けられた終止コドン（例えば、ＵＡＡ、ＵＧＡ、又はＵＡＧ）を含み、哺乳類又は真核生物細胞の発現では、ＵＡＡ及びＵＡＧが好ましい。

【００８４】

発現ベクターは、好ましくは、しかし任意選択的に、少なくとも１つの選択マーカーを含む。かかるマーカーは、例えば、真核細胞培養のためのメトトレキサート（ＭＴＸ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ、米国特許第４，３９９，２１６号、同第４，６３４，６６５号、同第４，６５６，１３４号、同第４，９５６，２８８号、同第５，１４９，６３６号、同第５，１７９，０１７号、アンピシリン、ネオマイシン（Ｇ４１８）、マイコフェノール酸又はグルタミンシンセターゼ（ＧＳ、米国特許第５，１２２，４６４号

、同第５，７７０，３５９号、同第５，８２７，７３９号）抵抗性遺伝子、並びに大腸菌及び他の細菌又は原核生物における培養のためのテトラサイクリン又はアンピシリン抵抗性遺伝子を含むが、これらに限定されない（上記特許は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。上記の宿主細胞に対して適切な培養培地及び条件は、当該技術分野において既知である。好適なベクターは、当事者にとって容易に明白となるであろう。宿主細胞へのベクターコンストラクトの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染又は他の既知の方法により影響を受け得る。かかる方法については、上記のＳａｍｂｒｏｏｋ、第１～４章及び第１６～１８章、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、第１、９、１３、１５、１６章など、当該技術分野において記載されている。

【００８５】

本発明の少なくとも１つの抗体は、融合タンパク質などの修飾された形態で発現され得、分泌シグナルだけでなく、追加の異種機能領域も含み得る。例えば、追加アミノ酸の領域、特に荷電アミノ酸を抗体のＮ末端に追加して、精製中又は後続の処理及び保存中に、宿主細胞における安定性及び持続性を改善することができる。また、ペプチド部分を本発明の抗体に追加して、精製を促進することもできる。抗体又は少なくとも１つのその断片の最終調製前に、かかる領域を除去することができる。かかる方法は、上記のＳａｍｂｒｏｏｋ、第１７．２９～１７．４２章及び第１８．１～１８．７４章、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、第１６、１７及び１８章など、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

【００８６】

当業者であれば、本発明のタンパク質をコード化する核酸の発現に利用可能な多数の発現系について精通している。

【００８７】

代替的に、本発明の核酸は、本発明の抗体をコード化する内因性ＤＮＡを含む宿主細胞内で、（操作により）オン切換えすることにより、宿主細胞中で発現させることができる。このような方法は、米国特許第５，５８０，７３４号、同第５，６４１，６７０号、同第５，７３３，７４６号、及び同第５，７３３，７６１号に記載されているように、当該技術分野において周知であり、これらは参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００８８】

抗体、その特定された部分又は変異体の産生にとって有用な細胞培養の一例は哺乳動物細胞である。哺乳類細胞系は、単層の細胞の形を取ることが多いが、哺乳類細胞の懸濁液又はバイオリアクターも使用可能である。無傷なグリコシル化タンパク質を発現可能な多くの好適な宿主細胞株が当該技術分野において開発されており、これにはＣＯＳ－１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５０）、ＣＯＳ－７（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５１）、ＨＥＫ２９３、ＢＨＫ２１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１０）、ＣＨＯ（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６１０）、及びＢＳＣ－１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２６）細胞株、Ｃｏｓ－７細胞、ＣＨＯ細胞、ｈｅｐ　Ｇ２細胞、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、２９３細胞、ＨｅＬａ細胞などが挙げられ、これらは例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖａ（ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ）から容易に入手できる。好ましい宿主細胞には、骨髄腫及びリンパ腫細胞などのリンパ系起源の細胞が挙げられる。特に好ましい宿主細胞はＰ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ登録番号ＣＲＬ－１５８０）及びＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ登録番号ＣＲＬ－１８５１）である。特に好ましい実施形態では、組換え細胞は、Ｐ３Ｘ６３Ａｂ８．６５３又はＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である。

【００８９】

これらの細胞の発現ベクターは、複製起点、プロモータ（例えば、後期又は初期ＳＶ４０プロモータ、ＣＭＶプロモータ（米国特許第５，１６８，０６２号、同第５，３８５，８３９号）、ＨＳＶ　ｔｋプロモータ、ｐｇｋ（ホスホグリセレートキナーゼ）プロモー

タ、ＥＦ－１αプロモータ（米国特許第５，２６６，４９１号）、少なくとも１つのヒト免疫グロブリンプロモータ、エンハンサ、及び／又はリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位（例えば、ＳＶ４０ラージＴ　Ａｇポリ付加部位）、並びに転写終結配列などのプロセシング情報部位などであるがこれらに限定されない、発現制御配列のうちの１つ以上を含み得る。例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌら、上記のＳａｍｂｒｏｏｋらを参照されたい。本発明の核酸又はタンパク質の生成に有用な他の細胞は既知であり、並びに／あるいは例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎの細胞株及びハイブリドーマのカタログ（ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ）又は他の既知の若しくは商業的供給源から入手可能である。

【００９０】

真核宿主細胞が利用されるとき、典型的には、ベクター内にポリアデニル化又は転写終結配列が組み込まれる。終結配列の一例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写の正確なスプライシングのための配列も、同様に含むことができる。スプライシング配列の一例は、ＳＶ４０由来のＶＰ１イントロンである（Ｓｐｒａｇｕｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．４５：７７３－７８１（１９８３））。加えて、当該技術分野において既知であるように、宿主細胞内の複製を制御するための遺伝子配列をベクター内に組み込むことができる。

【００９１】

抗体の精製。抗ＴＮＦ抗体は、プロテインＡ精製、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ及びレクチンクロマトグラフィが挙げられるがこれらに限定されない周知の方法により、組換え細胞培養物から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィ（「ＨＰＬＣ」）を精製に利用することもできる。例えば、Ｃｏｌｌｉｇａｎ、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ又はＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ，ＮＹ（１９９７－２００１）の、例えば、第１、４、６、８、９、１０章を参照されたく、それぞれは参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００９２】

本発明の抗体には、天然に精製された生成物、化学合成処置の生成物、並びに例えば、酵母、高等植物、昆虫及び哺乳類細胞を含む、真核宿主から組換え技法により生成された生成物が含まれる。組換え生成処置に用いられる宿主に応じて、本発明の抗体は、グリコシル化されてもグリコシル化されなくてもよいが、グリコシル化されるのが好ましい。かかる方法は、上記のＳａｍｂｒｏｏｋ、セクション１７．３７－１７．４２、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、第１０、１２、１３、１６、１８、及び２０章、上記のＣｏｌｌｉｇａｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、第１２～１４章などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載されており、全てが参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００９３】

抗ＴＮＦ抗体

配列番号１、２、及び３の重鎖可変ＣＤＲ領域の全て並びに／又は配列番号４、５、及び６の軽鎖可変ＣＤＲ領域の全てを含む本発明の単離された抗体は、任意の好適なポリヌクレオチドによってコード化される本明細書で開示される抗体のアミノ酸配列、又は任意の単離又は調製された抗体を含む。好ましくは、ヒト抗体又は抗原結合断片は、ヒトＴＮＦに結合し、それにより、タンパク質の少なくとも１つの生物学的活性を部分的又は実質的に中和する。少なくとも１つのＴＮＦタンパク質又は断片の少なくとも１つの生物学的活性を部分的に又は好ましくは実質的に中和する抗体又はその特定された部分若しくは変異体は、タンパク質又は断片に結合し、それによりＴＮＦのＴＮＦ受容体への結合を通して、又は他のＴＮＦ依存性又は媒介型機序を通して媒介される活性を阻害することができる。本明細書で使用するとき、「中和抗体」という用語は、アッセイに応じて約２０～１

２０％、好ましくは少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００％又はそれ以上、ＴＮＦ依存性活性を阻害することができる抗体を指す。ＴＮＦ依存性活性を阻害する抗ＴＮＦ抗体の能力は、好ましくは、本明細書に記載されかつ／又は当該技術分野において既知の、少なくとも１つの好適なＴＮＦタンパク質又は受容体アッセイによって評価される。本発明のヒト抗体は、任意のクラス（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＤなど）又はアイソタイプのものであってもよく、κ又はλ軽鎖を含み得る。一実施形態において、ヒト抗体は、ＩｇＧ重鎖又は規定された断片、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４のうちの少なくとも１つのアイソタイプを含む。このタイプの抗体は、本明細書に記載され、かつ／又は当該技術分野において既知の、少なくとも１つのヒト軽鎖（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ）及びＩｇＭ（例えば、γ１、γ２、γ３、γ４）導入遺伝子を含む、トランスジェニックマウス又は他のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることによって調製され得る。別の実施形態において、抗ヒトＴＮＦヒト抗体は、ＩｇＧ１重鎖及びＩｇＧ１軽鎖を含む。

【００９４】

本発明の少なくとも１つの抗体は、少なくとも１つのＴＮＦタンパク質、サブユニット、断片、部分、又はそれらの任意の組み合わせに特異的な少なくとも１つの特定のエピトープに結合する。この少なくとも１つのエピトープは、前述のタンパク質の少なくとも一部分を含む少なくとも１つの抗体結合領域を含むことができ、このエピトープは好ましくは、前述のタンパク質の少なくとも１つの細胞外、可溶性、親水性、外部、又は細胞質部分から構成されている。少なくとも１つの特定されたエピトープは、配列番号９の隣接アミノ酸の特定された部分全体に対する少なくとも１～３個のアミノ酸の少なくとも１つのアミノ酸配列の任意の組み合わせを含むことができる。

【００９５】

一般に、本発明のヒト抗体又は抗原結合断片は、少なくとも１つのヒト相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）又は少なくとも１つの重鎖可変領域の変異体、及び少なくとも１つのヒト相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）又は少なくとも１つの軽鎖可変領域の変異体を含む抗原結合領域を含む。非限定的な例として、抗体又は抗原結合部分若しくは変異体は、配列番号３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３及び／又は配列番号６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３のうちの少なくとも１つを含み得る。特定の実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、対応するＣＤＲ１、２、及び／又は３のアミノ酸配列（例えば、配列番号１、２、及び／又は３）を有する少なくとも１つの重鎖ＣＤＲ（即ち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３）の少なくとも一部分を含む抗原結合領域を有することができる。別の特定の実施形態において、抗体又は抗原結合部分若しくは変異体は、対応するＣＤＲ１、２、及び／又は３のアミノ酸配列（例えば、配列番号４、５、及び／又は６）を有する少なくとも１つの軽鎖ＣＤＲ（即ち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３）の少なくとも一部分を含む抗原結合領域を有することができる。好ましい実施形態において、抗体又は抗原結合断片の３つの重鎖ＣＤＲ及び３つの軽鎖ＣＤＲは、本明細書に記載される、ｍＡｂ　ＴＮＶ１４８、ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１９６、ＴＮＶ１１８、ＴＮＶ３２、ＴＮＶ８６のうちの少なくとも１つの対応するＣＤＲのアミノ酸配列を有する。かかる抗体は、組換えＤＮＡ技術の従来技術を使用して抗体をコード化する（すなわち、１つ以上の）核酸分子を調製し発現させることによって、又は任意の他の好適な方法を使用することによって、従来技術を使用して抗体の様々な部分（例えば、ＣＤＲ、フレームワーク）を一緒に化学的に結合させることにより調製できる。

【００９６】

抗ＴＮＦ抗体は、規定されたアミノ酸配列を有する重鎖又は軽鎖可変領域のうちの少なくとも１つを含むことができる。例えば、好ましい実施態様において、抗ＴＮＦ抗体は、任意選択的に配列番号７のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び／又は任意選択的に配列番号８のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの軽鎖可変領域のうちの少なくとも１つ

を含む。ヒトＴＮＦに結合し、規定された重鎖又は軽鎖可変領域を含む抗体は、好適な方法、例えば、当該技術分野において既知でありかつ／又は本明細書に記載される、ファージディスプレイ（Ｋａｔｓｕｂｅ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ，１（５）：８６３－８６８（１９９８））又はトランスジェニック動物を採用する方法など、好適な方法を使用して調製することができる。例えば、機能的に再配列されたヒト免疫グロブリン重鎖導入遺伝子と、機能的な再配列を受けることが可能なヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座からのＤＮＡを含む導入遺伝子と、を含むトランスジェニックマウスを、ヒトＴＮＦ又はその断片で免疫化して抗体の生成を誘発することができる。所望する場合、抗体生成細胞を単離することができ、本明細書に記載されるように、かつ／又は当該技術分野において既知であるように、ハイブリドーマ又は他の不死化抗体生成細胞を調製することができる。代替的に、抗体、特定された部分又は変異体は、好適な宿主細胞内で、コード核酸又はその一部分を使用して発現させることができる。

【００９７】

本発明はまた、本明細書に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じである配列内のアミノ酸を含む抗体、抗原結合断片、免疫グロブリン鎖及びＣＤＲにも関する。好ましくは、かかる抗体又は抗原結合断片及びかかる鎖若しくはＣＤＲを含む抗体は、高い親和性（例えば、K_Dが約10^{-9}Ｍ以下）で、ヒトＴＮＦに結合することができる。本明細書に記載されている配列と実質的に同じであるアミノ酸配列には、保存的アミノ酸置換、並びにアミノ酸欠失及び／又は挿入を含む配列が挙げられる。保存的アミノ酸置換は、第１のアミノ酸のものに類似する化学的及び／又は物理的特性（例えば、電荷、構造、極性、疎水性／親水性）を持つ第２のアミノ酸で、第１のアミノ酸を置換することを指す。保存的置換は、１個のアミノ酸を、以下の群内の別のアミノ酸で置き換えることを含む：リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）及びヒスチジン（Ｈ）；アスパラギン酸塩（Ｄ）及びグルタミン酸塩（Ｅ）；アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）、セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、チロシン（Ｙ）、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｄ、及びＥ；アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、プロリン（Ｐ）、フェニルアラニン（Ｆ）、トリプトファン（Ｗ）、メチオニン（Ｍ）、システイン（Ｃ）、及びグリシン（Ｇ）；Ｆ、Ｗ、及びＹ；Ｃ、Ｓ、及びＴ。

【００９８】

アミノ酸コード。本発明の抗ＴＮＦ抗体を構成するアミノ酸は、略されることが多い。アミノ酸表記は、その１文字コード、その３文字コード、名称、又は３つのヌクレオチドコドン（複数可）によりアミノ酸を表記することにより示すことができ、当該技術分野においてよく理解されている（Ａｌｂｅｒｔｓ，Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｔｈｅ　Ｃｅｌｌ，Ｔｈｉｒｄ　Ｅｄ．，Ｇａｒｌａｎｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９４を参照のこと）。

【００９９】

【表２】

１文字コード	３文字コード	名称	３つのヌクレオチドコドン（複数可）
A	Ala	アラニン	GCA、GCC、GCG、GCU
C	Cys	システイン	UGC、UGU
D	Asp	アスパラギン酸	GAC、GAU
E	Glu	グルタミン酸	GAA、GAG
F	Phe	フェニルアラニン	UUC、UUU
G	Gly	グリシン	GGA、GGC、GGG、GGU
H	His	ヒスチジン	CAC、CAU
I	Ile	イソロイシン	AUA、AUC、AUU
K	Lys	リジン	AAA、AAG
L	Leu	ロイシン	UUA、UUG、CUA、CUC、CUG、CUU
M	Met	メチオニン	AUG
N	Asn	アスパラギン	AAC、AAU
P	Pro	プロリン	CCA、CCC、CCG、CCU
Q	Gln	グルタミン	CAA、CAG
R	Arg	アルギニン	AGA、AGG、CGA、CGC、CGG、CGU
S	Ser	セリン	AGC、AGU、UCA、UCC、UCG、UCU
T	Thr	トレオニン	ACA、ACC、ACG、ACU
V	Val	バリン	GUA、GUC、GUG、GUU
W	Trp	トリプトファン	UGG
Y	Tyr	チロシン	UAC、UAU

【０１００】

本発明の抗ＴＮＦ抗体は、本明細書で特定されるように、自然突然変異又はヒトによる操作のいずれかによる、１つ以上のアミノ酸の置換、欠失、又は付加を含み得る。

【０１０１】

当然のことながら、当業者が行い得るアミノ酸置換の数は、上述のものを含む数多くの要因に依存する。一般的に言えば、任意の所与の抗ＴＮＦ抗体、断片又は変異体についてのアミノ酸置換、挿入、又は欠失の数は、本明細書で特定されるように、４０、３０、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１、例えば、１～３０、又はこの中の任意の範囲若しくは値を超えない。

【０１０２】

機能上不可欠である本発明の抗ＴＮＦ抗体内のアミノ酸は、部位特異的突然変異誘発又はアラニンスキャニング突然変異誘発などの、当該技術分野において既知の方法により特定することができる（例えば、上記のＡｕｓｕｂｅｌ、第８，１５章；Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１０８１－１０８５（１９８９））。後者の手順では、分子内の各残基毎に１つのアラニン置換変異が導入される。次いで、結果として得られた突然変異分子は、例えば、少なくとも１つのＴＮＦ中和活性などがあるがこれに限定されない生物学的活性について試験される。抗体結合にとってきわめて重要である部位もまた、結晶化、核磁気共鳴又は光親和性標識などの構造分析によって特定することができる（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２４：８９９－９０４（１９９２）及びｄｅ Ｖｏｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５５：３０６－３１２（１９９２））。

【０１０３】

本発明の抗ＴＮＦ抗体は、配列番号１、２、３、４、５、６のうちの少なくとも１つの隣接アミノ酸のうちの１個～全てから選択された、少なくとも１つの部分、配列又は組み

合わせを含むことができるが、これらに限定されない。

【０１０４】

抗ＴＮＦ抗体は更に、任意選択的に、配列番号７、８のうちの少なくとも１つの、隣接アミノ酸の７０～１００％の少なくとも１つのポリペプチドを含み得る。

【０１０５】

一実施形態において、免疫グロブリン鎖又はその一部分（例えば、可変領域、ＣＤＲ）のアミノ酸配列は、配列番号７、８のうちの少なくとも１つの対応する鎖のアミノ酸配列と、約７０～１００％の同一性（例えば、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、又はこの中の任意の範囲若しくは値）を有する。例えば、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、配列番号８の配列と比較することができ、又は重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列を配列番号７と比較することができる。好ましくは、７０～１００％のアミノ酸同一性（すなわち、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、又はこの中の任意の範囲若しくは値）は、当該技術分野において既知であるように、好適なコンピュータアルゴリズムを用いて決定される。

【０１０６】

代表的な重鎖及び軽鎖可変領域の配列は、配列番号７、８に示されている。本発明の抗体又はその特定された変異体は、本発明の抗体から任意の数の隣接アミノ酸残基を含み得、その数は、抗ＴＮＦ抗体における隣接残基数の１０～１００％からなる整数の群から選択される。任意選択的に、隣接アミノ酸のこの部分列は、少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、又はそれ以上のアミノ酸長、又はその中の任意の範囲若しくは値である。更に、かかる部分列の数は、少なくとも２、３、４、又は５などの、１～２０からなる群から選択される任意の整数であり得る。

【０１０７】

当業者には理解されるように、本発明には、本発明の少なくとも１つの生物活性抗体が含まれている。生物学的活性抗体は、天然（非合成）、内因性又は関連する及び既知の抗体のものの、少なくとも２０％、３０％又は４０％、及び好ましくは少なくとも５０％、６０％又は７０％、及び最も好ましくは少なくとも８０％、９０％又は９５％～１０００％の比活性を有する。酵素活性及び基質特異性のアッセイ及び定量化測定の方法は、当業者には周知である。

【０１０８】

別の態様では、本発明は、有機部分の共有結合により修飾される、本明細書に記載されるヒト抗体及び抗原結合断片に関する。かかる修飾は、改善された薬物動態特性（例えば、増大した、インビボでの血清半減期）を有する抗体又は抗原結合断片を生成することができる。有機部分は、直鎖又は分枝鎖親水性ポリマー基、脂肪酸基、又は脂肪酸エステル基であることができる。特定の実施形態では、親水性ポリマー基は、分子量が約８００～約１２０，０００ダルトンであって、ポリアルカングリコール（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ））、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマー又はポリビニルピロリドンであり得、また、脂肪酸基又は脂肪酸エステル基は、約８～約４０の炭素原子を含み得る。

【０１０９】

本発明の修飾された抗体及び抗原結合断片は、直接的又は間接的に抗体に共有結合される、１つ以上の有機部分を含み得る。本発明の抗体又は抗原結合断片に結合される各有機部分は、独立して、親水性ポリマー基、脂肪酸基、又は脂肪酸エステル基であり得る。本明細書で使用するとき、「脂肪酸」という用語は、モノカルボン酸及びジカルボン酸を含む。本明細書で使用するとき、「親水性ポリマー基」という用語は、オクタンよりも水に対する溶解度が高い有機ポリマーを意味する。例えば、ポリリシンは、オクタンよりも水

に対する溶解度が高い。よって、ポリリシンの共有結合により修飾された抗体は、本発明に包含される。本発明の抗体を修飾するために好適な親水性ポリマーは、直線状又は分岐状であり得、例えば、ポリアルカングリコール（例えば、ＰＥＧ、モノメトキシ－ポリエチレングリコール（ｍＰＥＧ）、ＰＰＧなど）、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖など）、親水性アミノ酸のポリマー（例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパラギン酸など）、ポリアルカンオキシド（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドなど）、及びポリビニルピロリドンを含む。好ましくは、本発明の抗体を修飾する親水性ポリマーは、個別の分子体として、約８００～約１５０，０００ダルトンの分子量を有する。例えば、PEG_{5000}及び$PEG_{20,000}$を使用することができ、下付き文字は、ポリマーの平均分子量（ダルトン）である。親水性ポリマー基は、１～約６個のアルキル基、脂肪酸基又は脂肪酸エステル基で置換することができる。脂肪酸又は脂肪酸エステル基で置換される親水性ポリマー類は、好適な方法を利用することによって調製することができる。例えば、アミン基を含むポリマーを、脂肪酸又は脂肪酸エステルのカルボン酸塩に連結させることができ、脂肪酸又は脂肪酸エステル上の活性化カルボン酸塩（例えば、Ｎ，Ｎ－カルボニルジイミダゾールで活性化されている）をポリマー上のヒドロキシル基に連結させることができる。

【０１１０】

本発明の抗体を修飾するために好適な脂肪酸及び脂肪酸エステルは、飽和されてもよいし、又は１つ以上の不飽和単位を含有してもよい。本発明の抗体を修飾するのに好適な脂肪酸としては、例えば、ｎ－ドデカン酸塩（C_{12}、ラウリン酸塩）、ｎ－テトラデカン酸塩（C_{14}、ミリスチン酸塩）、ｎ－オクタデカン酸塩（C_{18}、ステアリン酸塩）、ｎ－エイコサン酸塩（C_{20}、アラキジン酸塩）、ｎ－ドコサン酸塩（C_{22}、ベヘン酸）、ｎ－トリアコンタン酸塩（C_{30}）、ｎ－テトラコンタン酸塩（C_{40}）、シス－Δ９－オクタデカン酸塩（C_{18}、オレイン酸塩）、全てのシス－Δ５，８，１１，１４－エイコサテトラエン酸塩（C_{20}、アラキドン酸塩）、オクタンジオン酸、テトラデカンジオン酸、オクタデカンジオン酸、ドコサンジオン酸などが挙げられる。好適な脂肪酸エステルは、直鎖又は分枝鎖の低級アルキル基を含む、ジカルボン酸のモノエステルを含む。低級アルキル基は、１～約１２個、好ましくは１～約６個の炭素原子を含み得る。

【０１１１】

修飾されたヒト抗体及び抗原結合断片は、１つ以上の修飾剤と反応させるなど、好適な方法を使用して調製することができる。本明細書で使用されるとき、「修飾剤」という用語は、活性化基を含む好適な有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）を意味する。「活性化基」とは、適切な条件下で第２の化学基と反応し、これにより修飾剤と第２の化学基との間に共有結合を形成することのできる、化学部分又は官能基である。例えば、アミン反応性活性化基は、トシル酸塩、メシル酸塩、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）などの求電子性基、Ｎ－ヒドロキシスクシニミジルエステル（ＮＨＳ）などを含む。チオール類と反応可能な活性化基としては、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルジスルフィド、５－チオール－２－ニトロ安息香酸チオール（ＴＮＢ－チオール）などが挙げられる。アルデヒド官能基は、アミン－又はヒドラジド－含有分子と連結することができ、また、アジド基は、三価リン基と反応してホスホルアミデート又はホスホルイミド結合を形成することができる。分子中に活性化基を導入するための好適な方法が、当該技術分野において既知である（例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ：Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９６）を参照されたい）。活性化基は、有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）に直接的に、又はリンカー部分、例えば二価のC_1～C_{12}基（ここで、１つ以上の炭素原子が酸素、窒素、又は硫黄などのヘテロ原子で置換され得る）を介して結合され得る。好適なリンカー部分は、例えば、テトラエチレングリコール、－（CH_2）$_3$－、－ＮＨ－（CH_2）$_6$－ＮＨ－、－（CH_2）$_2$－ＮＨ－及び－CH_2－Ｏ－CH_2－CH_2－Ｏ－CH_2－CH_2－Ｏ－ＣＨ－ＮＨ－を含む。リンカー部分を含む修飾剤は、例えば１－エチル－３－（３－ジ

メチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）の存在下で、モノ－Ｂｏｃ－アルキルジアミン（例えば、モノ－Ｂｏｃ－エチレンジアミン、モノ－Ｂｏｃ－ジアミノヘキサン）を脂肪酸と反応させることにより、遊離アミンと脂肪酸カルボキシレートとの間のアミド結合を形成することによって生成可能である。Ｂｏｃ保護基を、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）処理により生成物から除去して、記載されているように別のカルボン酸塩に連結し得る一級アミンを露出させることができ、あるいは、これを無水マレイン酸と反応させ、結果として得られた生成物を環化させて脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成することができる。（例えば、参照により教示の全体が本明細書に組み込まれる、Ｔｈｏｍｐｓｏｎらの国際公開第９２／１６２２１号を参照のこと。）

【０１１２】

本発明の修飾された抗体は、ヒト抗体又は抗原結合断片を修飾剤と反応させることによって生成することができる。例えば、有機部分は、アミン反応性修飾剤、例えば、ＰＥＧのＮＨＳエステルを採用することによって、非部位特異的方法で抗体に結合させることができる。抗体又は抗原結合断片のジスルフィド結合（例えば鎖内ジスルフィド結合）を還元することによって、修飾されたヒト抗体又は抗原結合断片を調製することもできる。このとき、還元された抗体又は抗原結合断片をチオール反応性修飾剤と反応させて、本発明の修飾された抗体を生産することが可能である。本発明の抗体の特定の部位に結合される有機部分を含む修飾されたヒト抗体及び抗原結合断片は、逆タンパク質分解（Ｆｉｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，３：１４７－１５３（１９９２）、Ｗｅｒｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，５：４１１－４１７（１９９４）、Ｋｕｍａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．６（１０）：２２３３－２２４１（１９９７）、Ｉｔｏｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，２４（１）：５９－６８（１９９６）、Ｃａｐｅｌｌａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，５６（４）：４５６－４６３（１９９７））及びＨｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ：Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９６）に記載される方法などの好適な方法を使用して調製することができる。

【０１１３】

抗Ｔｎｆ抗体組成物に対する抗イディオタイプ抗体。モノクローナル又はキメラ抗ＴＮＦ抗体に加えて、本発明は、本発明のかかる抗体に特異的な抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体にも関する。抗Ｉｄ抗体は、一般に別の抗体の抗原結合領域に関連する固有の決定基を認識する抗体である。抗Ｉｄは、Ｉｄ抗体源と同じ種及び遺伝子型の動物（例えばマウス株）を、抗体又はそのＣＤＲ含有領域により免疫化することによって調製することができる。免疫化された動物は、免疫化抗体のイディオタイプ決定基を認識し、かつそれに応答し、抗Ｉｄ抗体を生成する。抗Ｉｄ抗体はまた、更に別の動物で免疫応答を誘導する「免疫原」として使用され得、いわゆる抗－抗Ｉｄ抗体を生成する。

【０１１４】

抗Ｔｎｆ抗体組成物。本発明はまた、本明細書に記載され、かつ／又は当該技術分野において既知であるように、非自然発生組成物、混合物、又は形態で提供される少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、又はそれ以上のその抗ＴＮＦ抗体を含む、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物も提供する。かかる組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８の隣接アミノ酸の７０～１００％、又はその特定される断片、ドメイン若しくは変異体からなる群から選択される抗ＴＮＦ抗体のアミノ酸配列の少なくとも１つ又は２つの完全長、Ｃ及び／若しくはＮ末端欠失変異体、ドメイン、断片、又は特定される変異体を含む非自然発生組成物を含む。好ましい抗ＴＮＦ抗体組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６の７０～１００％の抗ＴＮＦ抗体、又はその特定された断片、ドメイン若しくは変異体の、少なくとも１つのＣＤＲ又はＬＢＲ含有部分として少なくとも１つ又は２つの完全長、断片、ドメイン、又は変異体を含む。更に好ましい組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６の７０～１００％、又は特定された断片、ドメイン若しくはその変異体のうちの少なくとも１つを

４０～９９％含む。このような組成物の百分率は、当該技術分野において既知であるように、又は本明細書に記載されるように、重量、体積、濃度、容量モル濃度、あるいは液体若しくは乾燥溶液、混合物、懸濁液、エマルション、又はコロイドとしての容量モル濃度によるものである。

【０１１５】

本発明の抗ＴＮＦ抗体組成物は更に、かかる調節、処置、又は治療を必要としている細胞、組織、器官、動物、又は患者に対する少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含み、任意選択的に、少なくとも１つのＴＮＦ拮抗薬（例えば、ＴＮＦ抗体若しくは断片、可溶性ＴＮＦ受容体若しくは断片、それらの融合タンパク質、又は小分子ＴＮＦ拮抗薬などであるが、これらに限定されない）、抗リウマチ薬（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン）、筋弛緩剤、麻薬、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛剤、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋遮断剤、抗菌剤（例えば、アミノグリコシド、抗真菌剤、駆虫薬、抗ウイルス剤、カルバペネム、セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗菌剤）、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養薬、甲状腺薬、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉剤、鎮咳剤、制吐剤、抗潰瘍剤、緩下剤、抗凝固薬、エリスロピエチン（例えば、エポエチンα）、フィルグラスチム（例えばＧ－ＣＳＦ、Ｎｅｕｐｏｇｅｎ）、サルグラモスチム（ＧＭ－ＣＳＦ、Ｌｅｕｋｉｎｅ）、免疫化薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体調節薬、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、抗代謝剤、有糸分裂阻害剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁病薬、抗精神病薬、抗不安薬、催眠薬、交感神経作動薬、刺激薬、ドネペジル、タクリン、ぜんそく薬、β作動薬、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害薬、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリン又は類似薬、ドルナーゼα（Ｐｕｌｍｏｚｙｍｅ）、サイトカイン又はサイトカイン拮抗薬から選択される少なくとも１つを更に含む、任意の好適かつ有効量の組成物又は薬学的組成物のうちの少なくとも１つを含み得る。かかるサイトカインの非限定的な例としては、ＩＬ－１～ＩＬ－２３のいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。好適な投与量は、当該技術分野において周知である。例えば、Ｗｅｌｌｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｐｐｌｅｔｏｎ ａｎｄ Ｌａｎｇｅ，Ｓｔａｍｆｏｒｄ，ＣＴ（２０００）、ＰＤＲ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ，Ｔａｒａｓｃｏｎ Ｐｏｃｋｅｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ ２０００，Ｄｅｌｕｘｅ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｔａｒａｓｃｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｌｏｍａ Ｌｉｎｄａ，ＣＡ（２０００）を参照されたく、これらの各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【０１１６】

このような抗癌剤又は抗感染薬はまた、本発明の少なくとも１つの抗体と関連、結合、同時処方、又は併用される毒素分子も含み得る。毒素は、病態細胞又は組織を選択的に死滅させるように、任意選択的に作用することができる。病態細胞は、癌細胞又は他の細胞であり得る。このような毒素は、これらに限定するものではないが、例えば、リシン、ジフテリア毒素、ヘビ毒素、又は細菌毒素の少なくとも１つから選択される、毒素の少なくとも１つの機能的細胞毒性ドメインを含む、精製若しくは組換え毒素又は毒素断片であり得る。毒素という用語はまた、ヒト及び他の哺乳類において、死に至り得る毒素性ショックを含む、任意の病態をもたらし得る任意の自然発生するか、突然変異若しくは組換え細菌又はウイルスによって生成される内毒素及び外毒素の両方を含む。かかる毒素には、腸管毒素原性大腸菌熱不安定性エンテロトキシン（ＬＴ）、熱安定性エンテロトキシン（ＳＴ）、赤痢菌細胞毒素、アエロモナス属エンテロトキシン、毒素性ショック症候群毒素－１（ＴＳＳＴ－１）、ブドウ球菌エンテロトキシンＡ（ＳＥＡ）、Ｂ（ＳＥＢ）、又はＣ（ＳＥＣ）、連鎖球菌エンテロトキシンなどを挙げることができるが、これらに限定され

ない。かかる細菌は、腸管毒素原性大腸菌（ＥＴＥＣ）、腸管出血性大腸菌（例えば血清型０１５７の株：Ｈ７）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ種（例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ種（例えば、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｂｏｙｄｉｉ、及びＳｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ種（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｃｈｏｌｅｒａ－ｓｕｉｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ種（例えば、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｉｃｉｌｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、Ｃａｍｐｈｌｏｂａｃｔｅｒ種（例えば、Ｃａｍｐｈｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ、Ｃａｍｐｈｌｏｂａｃｔｅｒ ｆｅｔｕｓ）、Ｈｅｌｉｏｃｂａｃｔｅｒ種（例えば、Ｈｅｌｉｏｃｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ種（例えば、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｓｏｂｒｉａ、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｈｙｄｒｏｐｈｉｌａ、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｃａｖｉａｅ）、Ｐｌｅｉｓｏｍｏｎａｓ ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ、Ｖｉｂｒｉｏ種（例えば、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ種、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、並びにＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉの種の株が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ｓｔｅｉｎ，ｅｄ．，ＩＮＴＥＲＮＡＬ ＭＥＤＩＣＩＮＥ，３ｒｄ ｅｄ．，ｐｐ１－１３，Ｌｉｔｔｌｅ，Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｂｏｓｔｏｎ，（１９９０）、Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｈｕｍａｎｓ：Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌ，２ｄ．Ｅｄ．，ｐｐ２３９－２５４，Ｐｌｅｎｕｍ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｏｏｋ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９１）、Ｍａｎｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，３ｄ．Ｅｄ．，Ｃｈｕｒｃｈｉｌｌ Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９０）、Ｂｅｒｋｏｗ ｅｔ ａｌ，ｅｄｓ．，Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｍａｎｕａｌ，１６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｒａｈｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，１９９２、Ｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７６：１２１－１３４（１９９１）、Ｍａｒｒａｃｋ ｅｔ ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８：７０５－７１１（１９９０）を参照のこと（これらの文献の内容は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【０１１７】

本発明の抗ＴＮＦ抗体化合物、組成物又は混合物は更に、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなどであるがこれらに限定されない、任意の好適な助剤のうちの少なくとも１つを含み得る。薬学的に許容できる助剤が好ましい。かかる滅菌溶液を調製する非限定的な例及びその方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｅｄ．，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８^{ｔｈ} Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．（Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ），１９９０などであるが、これに限定されない。当該技術分野において周知、又は本明細書に記載されるように、抗ＴＮＦ抗体、断片、又は変異体組成物の投与方法、溶解度、及び／又は安定性に好適な薬学的に許容される担体を、日常的に選択することができる。

【０１１８】

本組成物において有用な薬学的賦形剤及び添加剤は、これらに限定されないが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質及び炭水化物（例えば、単糖類、二糖、三糖、四糖、及びオリゴ糖を含む糖類、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖などの誘導体化糖、並びに多糖類又は糖ポリマー）を含み、これらは、単独で又は組み合わせて存在してよく、単独で又は組み合わせて１～９９．９９重量％又は容量％含まれる。典型的なタンパク質賦形剤には、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）などの血清アルブミン、組換えヒトアルブミ

ン（ｒＨＡ）、ゼラチン、カゼインなどを含む。緩衝能においても機能し得る代表的なアミノ酸／抗体構成要素には、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが挙げられる。好ましいアミノ酸の１つはグリシンである。

【０１１９】

本発明に使用するのに好適な炭水化物賦形剤としては、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、Ｄ－マンノース、ソルボースなどの単糖類、乳糖、ショ糖、トレハロース、セロビオースなどの二糖類、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン類などの多糖類、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトールなどのアルジトールが挙げられる。本発明で使用するのに好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロース、及びラフィノースである。

【０１２０】

抗ＴＮＦ抗体組成物は、緩衝剤又はｐＨ調整剤も含み得、典型的には、緩衝剤は、有機酸又は塩基から調製される塩である。代表的な緩衝剤としては、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、又はフタル酸の塩などの有機酸塩、トリス、トロメタミン塩酸塩、又はリン酸緩衝剤が挙げられる。本組成物における使用に好ましい緩衝剤は、クエン酸塩などの有機酸塩である。

【０１２１】

加えて、本発明の抗ＴＮＦ抗体組成物は、ポリビニルピロリドン、フィコール（ポリマー糖）、デキストレート（例えば、２－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリンなどのシクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、着香剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、帯電防止剤、界面活性剤（例えば、「ＴＷＥＥＮ２０」及び「ＴＷＥＥＮ８０」などのポリソルベート）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、及びキレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）などのポリマー賦形剤／添加剤を含み得る。

【０１２２】

本発明による抗ＴＮＦ抗体、部分又は変異体組成物における使用に好適なこれら及び追加の既知の薬学的賦形剤及び／又は添加剤は、当該技術分野において既知であり、例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ＆Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ」、１９^{ｔｈ} ｅｄ．，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｌｉａｍｓ，（１９９５）、及び「Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ」、５２^{ｎｄ} ｅｄ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ，Ｍｏｎｔｖａｌｅ，ＮＪ（１９９８）に列挙されており、これらの開示は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。好ましい担体又は賦形剤材料は、炭水化物（例えば、単糖類及びアルジトール類）並びに緩衝剤（例えば、クエン酸塩）又は高分子試薬である。

【０１２３】

製剤。上述したとおり、本発明は、好ましくは、生理食塩水又は選択された塩を含むリン酸緩衝剤である安定した製剤、並びに保存剤を含有する保存溶液及び製剤、並びに薬学的に許容される製剤中に少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む薬学的又は獣医学的用途に好適な多用途保存製剤を提供する。保存製剤は、水性希釈剤中に、少なくとも１つの既知の、すなわち少なくとも１つのフェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば、六水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、及びチメロサール、又はそれらの混合物からなる群から任意選択的に選択される保存剤を含有する。当該技術分野において既知であるように、０．００１～５％、又は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、又はその中の任意の範囲若しくは値などであるがこれらに限定されない、その中の任意の範囲若しくは値の、任意の好適な濃度又は混合物が使用され得る。非限定的な例としては、保存剤無添加、０．１～２％ｍ－クレゾール（例えば、０．２、０．３、０．４、０．５、０．９、１．０％）、約０．１～３％のベンジルアルコール（例えば、０．５、０．９、１．１、１．５、１．９、２．０、２．５％）、０．００１～０．５％のチメロサール（例えば、０．００５、０．０１）、０．００１～２．０％フェノール（例えば、０．０５、０．２５、０．２８、０．５、０．９、１．０％）、０．０００５～１．０％のアルキルパラベン（複数可）（例えば、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％）などが挙げられる。

【０１２４】

上述のとおり、本発明は、包装材と、任意選択的に水性希釈剤中に処方された緩衝剤及び／又は保存剤を伴う少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の溶液を含む少なくとも１つのバイアルと、を含む製品を提供し、この包装材は、かかる溶液を１、２、３、４、５、６、９、１２、１８、２０、２４、３０、３６、４０、４８、５４、６０、６６、７２時間以上にわたり保持することができることを記したラベルを含む。本発明は、包装材と、凍結乾燥された少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む第１のバイアルと、処方された緩衝剤又は保存剤の水性希釈剤を含む第２のバイアルと、を含む製品を更に含み、この包装材は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を水性希釈剤において再構成して、２４時間以上にわたって保持することができる溶液を形成するように患者に指示するラベルを含む。

【０１２５】

本発明により使用される少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体は、本明細書に記載されるか、又は当該技術分野において既知の、哺乳類細胞又はトランスジェニック調製物から生成することを含む組換え手段によって生成され得るか、又は他の生物源から精製され得る。

【０１２６】

本発明の製品中に含まれる、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の範囲は、湿式／乾式系の場合、再構成時に約１．０μｇ／ｍＬ～約１０００ｍｇ／ｍＬの範囲の濃度が得られる量で含まれるが、これより低い濃度及び高い濃度でも作業可能であり、これらの濃度は意図される送達ビヒクルによって決まり、例えば溶液製剤では、経皮パッチ、肺、経粘膜、又は浸透圧性若しくはマイクロポンプ方法とは異なる。

【０１２７】

好ましくは、水性希釈剤は任意選択的に、薬学的に許容できる保存剤を更に含む。好ましい保存剤には、フェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム及びチメロサール又はこれらの混合物からなる群から選択されるものが含まれる。製剤中で使用される保存剤の濃度は、抗菌効果を生み出すのに十分な濃度である。このような濃度は選択された保存剤によって異なり、当業者により容易に決定される。

【０１２８】

他の賦形剤、例えば、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、保存剤エンハンサは、任意選択的にかつ好ましくは希釈剤に添加することができる。グリセリンなどの等張剤が、既知の濃度で一般に使用される。好ましくは、生理学的に耐容性の緩衝剤を添加して、改善されたｐＨ制御を提供する。製剤は、約ｐＨ４～約ｐＨ１０、及び好ましくは約ｐＨ５～約ｐＨ９の範囲、及び最も好ましくは約６．０～約８．０の範囲などの、広範囲のｐＨ範囲を対象にすることができる。好ましくは、本発明の製剤は、約６．８～約７．８のｐＨを有する

。好適な緩衝剤には、リン酸塩緩衝剤を含み、最も好ましくは、リン酸ナトリウム、特にリン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含む。

【０１２９】

他の添加剤、例えばＴｗｅｅｎ２０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート）、Ｔｗｅｅｎ４０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノパルミテート）、Ｔｗｅｅｎ８０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノオレエート）、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー）、及びＰＥＧ（ポリエチレングリコール）などの、薬学的に許容される可溶化剤、又はポリソルベート２０若しくは８０又はポロキサマー１８４若しくは１８８、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）ポリオールなどの非イオン性界面活性剤、他のブロックコポリマー、並びにＥＤＴＡ及びＥＧＴＡなどのキレート剤を製剤又は組成物に任意選択的に添加することで、凝集を低減させることができる。これらの添加物は、製剤を投与するためにポンプ又はプラスチック容器が使用される場合に特に有用である。薬学的に許容できる界面活性剤の存在により、タンパク質が凝集する傾向が軽減される。

【０１３０】

本発明の製剤は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体と、フェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、及びチメロサール又はこれらの混合物からなる群から選択される保存剤と、を水性希釈剤中で混合することを含むプロセスにより調製することができる。少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体と保存剤との水性希釈剤中での混合は、従来の溶解及び混合手順を使用して実施される。好適な製剤を調製するために、例えば、緩衝溶液中の一定量の少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を、所望の濃度のタンパク質及び保存剤を提供するのに十分な量の緩衝溶液中で所望の保存剤と組み合わせる。このプロセスの変化形態は、当業者によって認識されるであろう。例えば、構成成分の添加順序、追加の添加剤の使用の有無、製剤調製時の温度及びｐＨは全て、使用する投与濃度及び投与手段に関して最適化することのできる因子である。

【０１３１】

特許請求される製剤は、透明な溶液として、又は水、保存剤及び／若しくは賦形剤、好ましくはリン酸塩緩衝剤及び／若しくは生理食塩水、並びに選択された塩を水性希釈剤中に含有する第２のバイアルで再構成される、凍結乾燥された少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体のバイアルを含む併用バイアル（dual vial）として患者に提供することができる。単一溶液バイアル又は再構成を必要とする併用バイアルはいずれも複数回再利用することができ、単一又は複数の患者治療サイクルを満たすことができ、したがって、現在利用可能なものよりも便利な治療レジメンを提供することができる。

【０１３２】

特許請求される本製品は、即時から２４時間以上の期間にわたる投与に有用である。したがって、本発明により特許請求される製品は、患者に大きな利益を提供する。本発明の製剤は、任意選択的に、約２～約４０℃の温度で安全に保管し、タンパク質の生物学的活性を長期間保持することができ、したがって包装ラベルは、溶液が６、１２、１８、２４、３６、４８、７２、又は９６時間以上の期間にわたって保持及び／又は使用することができることを示すことができる。保存されている希釈剤を使用する場合には、このようなラベルに最高１～１２か月、半年、１年半及び／又は２年までの使用を含むことができる。

【０１３３】

本発明の少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の溶液は、少なくとも１つの抗体を水性希釈剤中で混合することを含むプロセスにより調製することができる。混合は、従来の溶解及び混合手順を使用して実施される。好適な希釈剤を調製するために、例えば、水又は緩衝剤中の一定量の少なくとも１つの抗体を、所望の濃度のタンパク質、及び任意選択的に保存剤又は緩衝剤を提供するのに十分な量で組み合わせる。このプロセスの変化形態は、当業

者によって認識されるであろう。例えば、構成成分の添加順序、追加の添加剤の使用の有無、製剤調製時の温度及びｐＨは全て、使用する投与濃度及び投与手段に関して最適化することのできる因子である。

【０１３４】

特許請求される製品は、透明な溶液として、又は水性希釈剤を含有する第２のバイアルで再構成される、凍結乾燥された少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体のバイアルを含む併用バイアルとして、患者に提供することができる。単一溶液バイアル又は再構成を必要とする併用バイアルは、いずれも複数回再利用することができ、単一又は複数の患者治療サイクルを満たすことができ、したがって、現在使用できるよりも便利な治療レジメンを提供する。

【０１３５】

特許請求される製品は、透明な溶液、又は水性希釈剤を含有する第２のバイアルで再構成される、凍結乾燥された少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体のバイアルを含む併用バイアルを、薬局、診療所、又は他のかかる機関及び施設に提供することによって、患者に対し間接的に提供することができる。この場合の透明溶液は最高１リットル又は更にはそれ以上の容量であってよく、この大きな容器からより少量の少なくとも１つの抗体溶液を１回又は複数回取り出してより小さなバイアルに移し、かつ薬局又は診療所により顧客及び／又は患者に提供できる。

【０１３６】

これらの単一バイアル系を含む承認済みデバイスとしては、ＢＤ　Ｐｅｎｓ、ＢＤ　Ａｕｔｏｊｅｃｔｏｒ（登録商標）、Ｈｕｍａｊｅｃｔ（登録商標）、ＮｏｖｏＰｅｎ（登録商標）、Ｂ－Ｄ（登録商標）Ｐｅｎ、ＡｕｔｏＰｅｎ（登録商標）、及びＯｐｔｉＰｅｎ（登録商標）、ＧｅｎｏｔｒｏｐｉｎＰｅｎ（登録商標）、Ｇｅｎｏｔｒｏｎｏｒｍ　Ｐｅｎ（登録商標）、Ｈｕｍａｔｒｏ　Ｐｅｎ（登録商標）、Ｒｅｃｏ－Ｐｅｎ（登録商標）、Ｒｏｆｅｒｏｎ　Ｐｅｎ（登録商標）、Ｂｉｏｊｅｃｔｏｒ（登録商標）、ｉｊｅｃｔ（登録商標）、Ｊ－ｔｉｐ　Ｎｅｅｄｌｅ－Ｆｒｅｅ　Ｉｎｊｅｃｔｏｒ（登録商標）、Ｉｎｔｒａｊｅｃｔ（登録商標）、Ｍｅｄｉ－Ｊｅｃｔ（登録商標）などの溶液送達用のペン型インジェクタデバイスが挙げられ、例えば、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｅｎ（Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ｗｗｗ．ｂｅｃｔｏｎｄｉｃｋｅｎｓｏｎ．ｃｏｍ）、Ｄｉｓｅｔｒｏｎｉｃ（Ｂｕｒｇｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，ｗｗｗ．ｄｉｓｅｔｒｏｎｉｃ．ｃｏｍ）、Ｂｉｏｊｅｃｔ，Ｐｏｒｔｌａｎｄ，Ｏｒｅｇｏｎ（ｗｗｗ．ｂｉｏｊｅｃｔ．ｃｏｍ）、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｗｅｓｔｏｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ（Ｐｅｔｅｒｂｏｒｏｕｇｈ，ＵＫ，ｗｗｗ．ｗｅｓｔｏｎ－ｍｅｄｉｃａｌ．ｃｏｍ）、Ｍｅｄｉ－Ｊｅｃｔ　Ｃｏｒｐ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，ｗｗｗ．ｍｅｄｉｊｅｃｔ．ｃｏｍ）によって製造又は開発されている。併用バイアル系を含む承認済みデバイスとしては、ＨｕｍａｔｒｏＰｅｎ（登録商標）などの、再構成された溶液を送達するためのカートリッジ内で凍結乾燥された薬物を再構成するためのペン型インジェクタシステムが挙げられる。

【０１３７】

ここで特許請求される製品は、包装材を含む。包装材は、規制当局によって必要とされる情報に加えて、製品を使用することができる条件を提供する。本発明の包装材は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を水性希釈剤において再構成して溶液を形成し、２～２４時間以上の期間にわたって、この溶液を湿式／乾式の２つのバイアル製品に使用する、という指示を患者に提供する。単一バイアルの溶液製品の場合、ラベルは、この溶液が２～２４時間又はそれ以上にわたって使用できることを示す。ここで特許請求される製品は、ヒト用薬学的製品用途に有用である。

【０１３８】

本発明の製剤は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体及び選択された緩衝剤、好ましくは生理食塩水又は選択された塩を含有するリン酸塩緩衝剤を混合することを含むプロセスにより調製することができる。少なくとも１つの抗体と緩衝剤との水性希釈剤中での混合は、

従来の溶解及び混合手順を使用して実施される。好適な製剤を調製するために、例えば、水又は緩衝剤中の一定量の少なくとも１つの抗体を、所望の濃度のタンパク質及び緩衝剤を提供するのに十分な量の水中で所望の緩衝剤と組み合わせる。このプロセスの変化形態は、当業者によって認識されるであろう。例えば、構成成分の添加順序、追加の添加剤の使用の有無、製剤調製時の温度及びｐＨは全て、使用する投与濃度及び投与手段に関して最適化することのできる因子である。

【０１３９】

特許請求される安定又は保存製剤は、透明な溶液として、又は水性希釈剤中に保存剤若しくは緩衝剤及び賦形剤を含有する第２のバイアルで再構成される、凍結乾燥された少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体のバイアルを含む併用バイアルとして、患者に提供することができる。単一溶液バイアル又は再構成を必要とする併用バイアルはいずれも複数回再利用することができ、単一又は複数の患者治療サイクルを満たすことができ、したがって、現在使用できるよりも便利な治療レジメンを提供する。

【０１４０】

本明細書に記載される安定若しくは保存製剤又は溶液のいずれかの少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体は、当該技術分野において周知のように、ＳＣ若しくはＩＭ注射、経皮、経肺、経粘膜、埋め込み、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、又は当該技術分野において周知であり当業者により理解される他の手段などの様々な送達方法を介して、本発明により患者に投与することができる。

【０１４１】

治療用途。本発明はまた、当該技術分野において既知である、又は本明細書に記載されるように、本発明の少なくとも１つの二重インテグリン抗体を使用して、細胞、組織、器官、動物、又は患者における少なくとも１つのＴＮＦ関連疾患を調節又は処置するための方法も提供する。

【０１４２】

本発明はまた、肥満、免疫関連疾患、循環器疾患、感染症、悪性疾患又は神経学的疾患のうち少なくとも１つを含むがこれらに限定されない、細胞、組織、器官、動物又は患者における少なくとも１つのＴＮＦ関連疾患を調節又は処置するための方法も提供する。

【０１４３】

本発明はまた、関節リウマチ、若年性、全身性発症若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、血清反応陰性関節症、変形性関節炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、特発性肺線維症、全身性血管炎／ヴェグナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎／精管切除修復術、アレルギー性／アトピー性疾患、ぜんそく、アレルギー性鼻炎、皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、器官移植拒絶反応、移植片対宿主病、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性菌敗血症、グラム陰性菌敗血症、培養陰性敗血症、真菌敗血症、好中球減少性発熱、尿性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷／出血、熱傷、電離放射線暴露、急性膵炎、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチ、アルコール性肝炎、慢性炎症性病変、サルコイドーシス、クローン病変、鎌状赤血球貧血症、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、過敏性反応、アレルギー性鼻炎、枯草熱、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、ぜんそく、じん麻疹、全身性アナフィラキシー、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少症、任意の器官又は組織の移植片拒絶反応、腎移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、膵臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、骨髄移植（ＢＭＴ）拒絶反応、皮膚同種移植拒絶反応、軟骨移植拒絶反応、骨移植片拒絶反応、小腸移植拒絶反応、胎児胸腺移植拒絶反応、副甲状腺移植拒絶反応、任意の器官又は組織の異種移植拒絶反応、同種移植拒絶反応、抗受容体過剰反応、グレーブス病、レイノー病、Ｂ型インスリン抵抗性糖尿病、ぜんそく、重症筋無力症、抗体媒介性細胞障害、ＩＩＩ型過剰反応、全身性エリテマトーデス、ＰＯＥＭＳ症候群（多発性神経障害、臓器肥大、内分泌障害、単クローン性免疫グロブリン血症、及び皮膚症状症候群）、多発性神経障害、臓器肥大、内分泌障害、単クローン性免疫グロブリン血症、皮膚症状症候

群、抗リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合性結合組織病、特発性アジソン病、真性糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、血管炎、ＭＩ後心臓切開術症候群、ＩＶ型免疫過剰、接触性皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植拒絶反応、細胞内生物による肉芽腫、薬物過敏、代謝性／特発性ウィルソン病、ヘマクロマトーシス、α－１－アンチトリプシン欠乏症、糖尿病性網膜症、橋本甲状腺炎、骨粗鬆症、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、家族性血球貪食性リンパ組織球症、皮膚科学的状態、乾癬、脱毛症、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、ｏｋｔ３療法、抗ｃｄ３療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法（例えば、無力症、貧血、悪液質などが挙げられるがこれらに限定されない）、慢性サリチル酸塩中毒などのうちの少なくとも１つが挙げられるが、これらに限定されない、細胞、組織、器官、動物、又は患者における少なくとも１つの免疫関連疾患を調節又は治療するための方法も提供する。例えば、Ｍｅｒｃｋ　Ｍａｎｕａｌ，１２ｔｈ～１７ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎｓ，Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒａｈｗａｙ，ＮＪ（１９７２，１９７７，１９８２，１９８７，１９９２，１９９９），Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ，Ｗｅｌｌｓ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｐｐｌｅｔｏｎ　ａｎｄ　Ｌａｎｇｅ，Ｓｔａｍｆｏｒｄ，Ｃｏｎｎ．（１９９８，２０００）を参照されたく、それぞれは参照することにより全体が組み込まれる。

【０１４４】

本発明は、心機能不全症候群（cardiac stun syndrome）、心筋梗塞、うっ血性心不全、卒中、虚血発作、出血、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病性動脈硬化性疾患、高血圧、動脈性高血圧、腎血管性高血圧、失神、ショック、心血管系の梅毒、心不全、肺性心、原発性肺高血圧、不整脈、心房異所性拍動、心房粗動、心房細動（持続性又は発作性）、還流後症候群、心肺バイパス炎症応答、無秩序型又は多源性心房頻脈、規則的狭ＱＲＳ頻脈（regular narrow QRS tachycardia）、固有不整脈（specific arrythmias）、心室細動、ヒス束不整脈（His bundle arrythmias）、房室ブロック、脚ブロック、心筋虚血性疾患、冠動脈疾病、狭心症、心筋梗塞、心筋症、拡張型うっ血性心筋症、拘束型心筋症、心臓弁膜症、心内膜炎、心膜疾患、心臓腫瘍、大動脈瘤及び末梢動脈瘤、大動脈切開、大動脈の炎症、腹部大動脈及びその分岐の閉塞、末梢血管障害、閉塞性動脈障害、末梢アテローム性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、機能性末梢動脈障害、レイノー現象及び疾患、先端チアノーゼ、紅痛症、静脈性疾患、静脈血栓症、静脈瘤、動静脈瘻、リンパ浮腫、脂肪性浮腫、不安定狭心症、再灌流傷害、ポンプ後症候群（post pump syndrome）、虚血再灌流傷害などのうちの少なくとも１つを含むがこれらに限定されない、細胞、組織、器官、動物又は患者における循環器疾患の調節又は処置するための方法も提供する。かかる方法は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む有効量の組成物又は薬学的組成物を、かかる調節、処置又は治療を必要としている細胞、組織、器官、動物又は患者に投与することを、任意選択的に含み得る。

【０１４５】

本発明はまた、急性又は慢性細菌感染、細菌、ウイルス及び真菌感染を含む急性及び慢性寄生又は感染プロセス、ＨＩＶ感染／ＨＩＶ神経障害、髄膜炎、肝炎（Ａ、Ｂ又はＣなど）、敗血症性関節炎、腹膜炎、肺炎、喉頭蓋炎、大腸菌０１５７：ｈ７、溶血性尿毒症性症候群／塞栓性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、ハンセン病、中毒性ショック症候群、連鎖球菌筋炎、ガス壊疽、結核菌、マイコバクテリウム－アビウム－イントラセルラーレ、ニューモシスティスカリニ肺炎、骨盤内炎症性疾患、精巣炎／精巣上体炎、レジオネラ、ライム病、ａ型インフルエンザ、エプスタイン－バーウイルス、ウイルス関連血球貪食症候群、ウイルス性脳炎／無菌性髄膜炎などのうちの少なくとも１つを含むがこれらに限定されない、細胞、組織、器官、動物又は患者において少なくとも１つの感染症を調節又は処置するための方法も提供する。

【０１４６】

本発明はまた、白血病、急性白血病、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、Ｂ細胞、Ｔ細

胞又はＦＡＢ　ＡＬＬ、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、有毛細胞白血病、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カポジ肉腫、直腸結腸癌、膵臓癌、鼻咽頭癌、悪性組織球増殖症、悪性の腫瘍随伴症候群／高カルシウム血症、固形腫瘍、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、癌関連骨吸収、癌関連骨痛などのうちの少なくとも１つを含むが、これらに限定されない、細胞、組織、器官、動物、又は患者における少なくとも１つの悪性疾患を調節又は治療するための方法も提供する。

【０１４７】

本発明はまた、神経変性疾患、多発性硬化症、片頭痛、エイズ痴呆症候群、脱髄疾患、例えば、多発性硬化症及び急性横断性脊髄炎、錐体外路及び小脳障害、例えば、皮質脊髄系の病変、大脳基底核の障害若しくは小脳障害、多動性運動障害、例えば、ハンチントン舞踏病及び老年性舞踏病、薬剤誘発性運動障害、例えば、ＣＮＳドーパミン受容体を遮断する薬物により誘発されるもの、運動低下性運動障害、例えば、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、小脳の構造病変、脊髄小脳変性症、例えば、脊髄性運動失調症、フリードライヒ失調症、小脳皮質変性症、多系統変性症（Ｍｅｎｃｅｌ、Ｄｅｊｅｒｉｎｅ－Ｔｈｏｍａｓ，Ｓｈｉ－Ｄｒａｇｅｒ及びＭａｃｈａｄｏ－Ｊｏｓｅｐｈ）、全身性疾患（レフスム病、無βリポタンパク血症、運動失調症、毛細血管拡張症、及びミトコンドリア多系統障害）、脱髄性コア障害（demyelinating core disorder）、例えば、多発性硬化症、急性横断性脊髄炎及び運動単位’の障害、例えば、神経性筋委縮症（前角細胞変性症、例えば、筋萎縮性側索硬化症、乳児脊髄性筋萎縮症及び若年性脊髄性筋萎縮症）、アルツハイマー病、中年層のダウン症候群、びまん性レヴィー小体病、レヴィー小体型の老人性痴呆症、ウェルニッケコルサコフ症候群、慢性アルコール中毒、クロイツフェルト－ヤコブ病、亜急性硬化性全脳炎、ハレルフォルデン－スパッツ病、並びにボクサー認知症などのうちの少なくとも１つを含むがこれらに限定されない、細胞、組織、器官、動物又は患者における少なくとも１つの神経学的疾患を調節又は処置するための方法も提供する。かかる方法は、任意選択的に、少なくとも１つのＴＮＦ抗体又は特定された部分又は変異体を含む有効量の組成物又は薬学的組成物を、かかる調節、処置、又は治療を必要としている細胞、組織、器官、動物、又は患者に対し投与する工程を含むことができる。例えば、Ｍｅｒｃｋ　Ｍａｎｕａｌ，１６^{ｔｈ}　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒａｈｗａｙ，ＮＪ（１９９２）を参照のこと。

【０１４８】

本発明のいずれの方法も、かかる調節、処置、又は治療を必要としている細胞、組織、器官、動物又は患者に、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む有効量の組成物又は薬学的組成物を投与することを含み得る。かかる方法は、任意選択的に、かかる免疫疾患の処置のための同時投与又は併用療法を更に含み得、この少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体、特定された部分又はその変異体の投与は、少なくとも１つのＴＮＦ拮抗薬（例えば、ＴＮＦ抗体若しくは断片、可溶性ＴＮＦ受容体若しくは断片、その融合タンパク質、又は低分子ＴＮＦ拮抗薬などであるが、これらに限定されない）、抗リウマチ薬（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサラジン）、筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌薬（例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペナム、セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗菌薬）、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養薬、甲状腺薬、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳薬、制吐剤、抗潰瘍剤、緩下剤、抗凝固薬、エリスロポエチン（例えば、エポエチンα）、フィルグラスチム（例えば、Ｇ－ＣＳＦ、Ｎｅｕｐｏｇｅｎ）、サルグラモスチム（ＧＭ－ＣＳＦ、Ｌｅｕｋｉｎｅ）、免疫化薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ

）、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体調節薬、散瞳薬、毛様筋麻痺薬、アルキル化剤、抗代謝剤、有糸分裂阻害剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁病薬、抗精神病薬、抗不安薬、催眠薬、交感神経作動薬、刺激薬、ドネペジル、タクリン、ぜんそく薬、β作動薬、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリン若しくは類似体、ドルナーゼα（Ｐｕｌｍｏｚｙｍｅ）、サイトカイン若しくはサイトカイン拮抗薬から選択される少なくとも１つの前に、同時に、及び／又は後に投与することを更に含む。好適な投与量は、当該技術分野において周知である。例えば、Ｗｅｌｌｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｐｐｌｅｔｏｎ ａｎｄ Ｌａｎｇｅ，Ｓｔａｍｆｏｒｄ，ＣＴ（２０００）、ＰＤＲ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ，Ｔａｒａｓｃｏｎ Ｐｏｃｋｅｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ ２０００，Ｄｅｌｕｘｅ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｔａｒａｓｃｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｌｏｍａ Ｌｉｎｄａ，ＣＡ（２０００）を参照されたく、これらの各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４９】

本発明の組成物、併用療法、同時投与、デバイス及び／又は方法（本発明の少なくとも１つの抗体、その特定された部分及び変異体を更に含む）に好適なＴＮＦ拮抗薬は、抗ＴＮＦ抗体、その抗原結合断片、及びＴＮＦに特異的に結合する受容体分子、ＴＮＦ合成、ＴＮＦ放出、若しくは標的細胞に対するその作用を阻止及び／又は阻害する化合物、例えば、サリドマイド、テニダプ、ホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、ペントキシフィリン及びロリプラム）、Ａ２ｂアデノシン受容体作動薬、及びＡ２ｂアデノシン受容体エンハンサ、ＴＮＦ受容体シグナル伝達を阻止及び／又は阻害する化合物、例えば、マイトジェン活性化タンパク質（ＭＡＰ）キナーゼ阻害剤、膜ＴＮＦ切断を遮断及び／又は阻害する化合物、例えば、メタロプロテイナーゼ阻害剤、ＴＮＦ活性を遮断及び／又は阻害する化合物、例えば、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤（例えば、カプトプリル）、並びにＴＮＦ生成及び／又は合成を遮断及び／又は阻害する化合物、例えば、ＭＡＰキナーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない。

【０１５０】

本明細書で使用されるとき、「腫瘍壊死因子抗体」、「ＴＮＦ抗体」、「ＴＮＦα抗体」又は「断片」などは、インビトロ、その場で、及び／又は好ましくはインビボで、ＴＮＦα活性を減少、遮断、阻害、抑止又は干渉する。例えば、本発明の好適なＴＮＦヒト抗体は、ＴＮＦαに結合することができ、抗ＴＮＦ抗体、その抗原結合断片、及びＴＮＦαに特異的に結合する特定された変異体又はそのドメインを含む。好適なＴＮＦ抗体又は断片は、ＴＮＦ ＲＮＡ、ＤＮＡ、又はタンパク質合成、ＴＮＦ放出、ＴＮＦ受容体シグナル伝達、膜ＴＮＦ切断、ＴＮＦ活性、ＴＮＦ生成及び／又は合成を減少、遮断、抑止、干渉、阻止、及び／又は阻害することもできる。

【０１５１】

キメラ抗体ｃＡ２は、Ａ２と呼ばれる高親和性中和マウス抗ヒトＴＮＦαＩｇＧ１抗体の抗原結合可変領域及びヒトＩｇＧ１のκ免疫グロブリンの定常領域からなる。ヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域は、同種の抗体のエフェクター機能を改善し、循環血清半減期を増加させ、抗体の免疫原性を減少させる。キメラ抗体ｃＡ２の結合活性及びエピトープの特異性は、マウス抗体Ａ２の可変領域に由来する。特定の実施形態において、マウス抗体Ａ２の可変領域をコード化する核酸の好ましい供給源は、Ａ２ハイブリドーマ細胞株である。

【０１５２】

キメラＡ２（ｃＡ２）は、天然及び組換え両方のヒトＴＮＦαの細胞傷害性作用を用量依存的に中和する。キメラ抗体ｃＡ２と組換えヒトＴＮＦαとの結合アッセイから、キメラ抗体ｃＡ２の親和性定数は、１．０４×１０^{10}Ｍ$^{-1}$であると計算された。競合阻害によるモノクローナル抗体の特異性及び親和性を決定するための好ましい方法は、Ｈａｒｌｏｗ，ｅｔ ａｌ．，ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８、Ｃｏｌｌｉｇａｎ

ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９９２－２０００）、Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ，４：７２－７９（１９８３）、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８７－２０００）、及びＭｕｌｌｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，９２：５８９－６０１（１９８３）に見ることができ、これらの参照文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【０１５３】

特定の実施形態において、マウスモノクローナル抗体Ａ２は、ｃ１３４Ａと呼ばれる細胞株によって生成される。キメラ抗体ｃＡ２は、ｃ１６８Ａと呼ばれる細胞株によって生成される。

【０１５４】

本発明において使用することができるモノクローナル抗ＴＮＦ抗体の更なる例は、当該技術分野において記載されている（例えば、米国特許第５，２３１，０２４号、Ｍｏｌｌｅｒ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ２（３）：１６２－１６９（１９９０）、米国出願第０７／９４３，８５２号（１９９２年９月１１日出願）、Ｒａｔｈｊｅｎ，ｅｔ ａｌ．、国際公開第９１／０２０７８号（１９９１年２月２１日公開）、Ｒｕｂｉｎ，ｅｔ ａｌ．、ＥＰＯ特許公開第０ ２１８ ８６８号（１９８７年４月２２日公開）、Ｙｏｎｅ，ｅｔ ａｌ．、ＥＰＯ特許公開第０ ２８８ ０８８号（１９８８年１０月２６日）、Ｌｉａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１３７：８４７－８５４（１９８６）、Ｍｅａｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ６：３０５－３１１（１９８７）、Ｆｅｎｄｌｙ ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ６：３５９－３６９（１９８７）、Ｂｒｉｎｇｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ６：４８９－５０７（１９８７）及びＨｉｒａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．９６：５７－６２（１９８７）を参照のこと。これらの参照文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【０１５５】

ＴＮＦ受容体分子。本発明に有用な好ましいＴＮＦ受容体分子は、ＴＮＦαに高い親和性で結合し（例えば、Ｆｅｌｄｍａｎｎら、国際公開第９２／０７０７６号（１９９２年４月３０日公開）、Ｓｃｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ６１：３６１－３７０（１９９０）、及びＬｏｅｔｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ６１：３５１－３５９（１９９０）を参照のこと。これらの参照文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）、任意選択的に低い免疫原性を有するものである。特に、５５ｋＤａ（ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ）及び７５ｋＤａ（ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ）のＴＮＦ細胞表面受容体は、本発明において有用である。受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）又はその機能的部分を含むこれらの受容体の切断型（例えば、Ｃｏｒｃｏｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２３：８３１－８４０（１９９４）を参照のこと）も本発明において有用である。ＥＣＤを含むＴＮＦ受容体の切断型は、尿及び血清中で、３０ｋＤａ及び４０ｋＤａのＴＮＦα阻害結合タンパク質として検出されでいる（Ｅｎｇｅｌｍａｎｎ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１５３１－１５３６（１９９０））。ＴＮＦ受容体多量体分子及びＴＮＦ免疫受容体融合分子、並びにそれらの誘導体及び断片又は部分は、本発明の方法及び組成物において有用であるＴＮＦ受容体分子の更なる例である。本発明に使用することができるＴＮＦ受容体分子は、症状の良好～優れた緩和及び低毒性で患者を長期間処置する能力を特徴とする。低い免疫原性及び／又は高い親和性並びに他の未定義の特性は、得られる治療結果に寄与し得る。

【０１５６】

本発明において有用なＴＮＦ受容体多量体分子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの、１つ以上のポリペプチドリンカー又は他の非ペプチドリンカーを介して連結され

た２つ以上のＴＮＦ受容体のＥＣＤの全て又は機能的部分を含む。多量体分子は、多量体分子の発現をもたらすための分泌タンパク質のシグナルペプチドを更に含むことができる。これらの多量体分子及びそれらの生成方法は、米国出願第０８／４３７，５３３号（１９９５年５月９日出願）に記載されており、その内容は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【０１５７】

本発明の方法及び組成物において有用なＴＮＦ免疫受容体融合分子は、１つ以上の免疫グロブリン分子の少なくとも一つの部分及び１つ以上のＴＮＦ受容体の全て又は機能的部分を含む。これらの免疫受容体融合分子は、モノマー又はヘテロ若しくはホモ多量体として集合させることができる。免疫受容体融合分子はまた、一価であっても多価であってもよい。かかるＴＮＦ免疫受容体融合分子の例は、ＴＮＦ受容体／ＩｇＧ融合タンパク質である。ＴＮＦ免疫受容体融合分子及びそれらの生成方法は、当該技術分野において記載されている（Ｌｅｓｓｌａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：２８８３－２８８６（１９９１）、Ａｓｈｋｅｎａｚｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８：１０５３５－１０５３９（１９９１）、Ｐｅｐｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：１４８３－１４８９（１９９１）、Ｋｏｌｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：２１５－２１９（１９９４）、Ｂｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ６（６）：６１６－６２３（１９９４）、Ｂａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２０４０－２０４８（１９９４）、Ｂｅｕｔｌｅｒら、米国特許第５，４４７，８５１号及び米国出願第０８／４４２，１３３号（１９９５年５月１６日出願）、これらの参照文献の各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。免疫受容体融合分子の生成方法は、Ｃａｐｏｎら、米国特許第５，１１６，９６４号、Ｃａｐｏｎら、米国特許第５，２２５，５３８号及びＣａｐｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３３７：５２５－５３１（１９８９）にも見ることができ、これらの参照文献は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【０１５８】

ＴＮＦ受容体分子の機能的等価物、誘導体、断片、又は領域は、本発明に使用することができるＴＮＦ受容体分子に機能的に類似するのに十分な大きさ及び配列のものである（例えば、ＴＮＦαに高い親和性で結合し、低い免疫原性を有する）、ＴＮＦ受容体分子の部分、又はＴＮＦ受容体分子をコード化するＴＮＦ受容体分子配列の部分を指す。ＴＮＦ受容体分子の機能的等価物はまた、本発明に使用することができるＴＮＦ受容体分子に機能的に類似する（例えば、ＴＮＦαに高い親和性で結合し、低い免疫原性を有する）修飾されたＴＮＦ受容体分子も含む。例えば、ＴＮＦ受容体分子の機能的等価物は「ＳＩＬＥＮＴ」コドン、又は１つ以上のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加（例えば、１個の酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸の代わりに用いるか、又は同じ若しくは異なる疎水性アミノ酸をコード化する１つのコドンを、疎水性アミノ酸をコード化する別のコドンの代わりに用いる）を含有し得る。Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８７－２０００）を参照のこと。

【０１５９】

サイトカインは、いかなる既知のサイトカインも包含する。例えば、Ｃｏｐｅｗｉｔｈ Ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ．ｃｏｍを参照されたい。サイトカイン拮抗薬としては、任意の抗体、断片若しくは模倣薬、任意の可溶性受容体、断片若しくは模倣薬、任意の低分子拮抗薬、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６０】

治療処置。本発明のいずれの方法も、かかる調節、処置、又は治療を必要としている細胞、組織、器官、動物、又は患者に、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む安全かつ有効量の組成物又は薬学的組成物を投与することを含む、ＴＮＦ媒介疾患を治療するための方

法を含み得る。かかる方法は、任意選択的に、かかる免疫疾患の処置のための同時投与又は併用療法を更に含み得、この少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体、特定された部分又はその変異体の投与は、少なくとも１つのＴＮＦ拮抗薬（例えば、ＴＮＦ抗体若しくは断片、可溶性ＴＮＦ受容体若しくは断片、その融合タンパク質、又は低分子ＴＮＦ拮抗薬などであるが、これらに限定されない）、抗リウマチ薬（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサラジン）、筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌薬（例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペナム、セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗菌薬）、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養薬、甲状腺薬、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳薬、制吐剤、抗潰瘍剤、緩下剤、抗凝固薬、エリスロポエチン（例えば、エポエチンα）、フィルグラスチム（例えば、Ｇ－ＣＳＦ、Ｎｅｕｐｏｇｅｎ）、サルグラモスチム（ＧＭ－ＣＳＦ、Ｌｅｕｋｉｎｅ）、免疫化薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体調節薬、散瞳薬、毛様筋麻痺薬、アルキル化剤、抗代謝剤、有糸分裂阻害剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁病薬、抗精神病薬、抗不安薬、催眠薬、交感神経作動薬、刺激薬、ドネペジル、タクリン、ぜんそく薬、β作動薬、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリン若しくは類似体、ドルナーゼα（Ｐｕｌｍｏｚｙｍｅ）、サイトカイン若しくはサイトカイン拮抗薬から選択される少なくとも１つの前に、同時に、及び／又は後に投与することを更に含む。

【０１６１】

本明細書で使用するとき、「安全」という用語は、それが本発明の抗ＴＮＦ抗体（例えば、抗ＴＮＦ抗体ゴリムマブ）を有する組成物、用量、投与レジメン、治療、又は方法に関する場合、標準治療又は他の抗ＴＮＦ剤などの別の比較基準と比較した有害事象（adverse event、ＡＥ）及び重篤有害事象（serious adverse event、ＳＡＥ）の許容可能な頻度及び／又は許容可能な重症度伴う、有利なリスク対効果比を指す。有害事象とは、医薬製品を投与された患者における好ましくない医療上の出来事である。具体的には、安全は、それが本発明の抗ＴＮＦ抗体を有する組成物、用量、投与レジメン、治療、又は方法に関連する場合、例えば、注入反応、検査所見の肝胆汁性異常、ＴＢを含む感染、及び悪性腫瘍を含む有害事象の許容可能な頻度及び／又は許容可能な重症度を指す。

【０１６２】

本明細書で使用するとき、「有効性」及び「有効」という用語は、組成物、用量、投与レジメン、治療、又は方法の文脈において本明細書で使用する場合、本発明の抗ＴＮＦ抗体（例えば、抗ＴＮＦ抗体ゴリムマブ）を有する特定の組成物、用量、投与量、治療、又は方法の有効性を指す。有効性は、本発明の薬剤に応答した、疾患の経過中の変化に基づいて測定され得る。例えば、本発明の抗ＴＮＦ抗体は、治療されている障害の重篤度を反映する少なくとも１つの指標において改善、好ましくは持続的な改善を引き起こすのに十分な量及び時間で、対象に投与される。その治療の量及び時間が十分であるかどうかを判定するために、対象の病気、疾患又は病状の程度を反映する様々な指標が評価され得る。そのような指標には例えば、疾患重篤度、症状、又は対象となっている障害の発現についての、臨床的に認識されている指標が含まれる。改善の程度は、一般に、医師又は他の適切に訓練された個人によって決定され、彼らは、徴候、症状、生検、又は臨床症状の改善を示す他の試験結果、又は疾患活動性の任意の他の尺度に基づき決定することができる。例えば、本発明の抗ＴＮＦ抗体は、乾癬性関節炎（ＰｓＡ）に関連する患者の状態の改善を達成するために投与され得る。ＰｓＡに関する患者の状態の改善は、例えば、健康評価質問表障害指標スコア（ＨＡＱ－ＤＩ）、腱付着部炎評価、指炎評価、３６項目ショートフォーム健康調査身体サマリースコア（ＳＦ－３６ＰＣＳ）、及び／又は３６項目ショー

トフォーム健康調査精神成分サマリースコア（ＳＦ－３６ＭＣＳ）を含む１つ又は２つ以上の基準を使用して評価され得る。ＨＡＱ－ＤＩは、８つの機能領域（身支度、起床、食事、歩行、衛生、伸展、握力、及び日常生活活動）におけるタスクの達成で人が感じる困難の程度を評価する２０問の計器である。腱付着部炎は、例えば、左及び右肘外側上顆、左及び右肘内側上顆、並びに左及び右アキレス腱付着部を含む腱付着部に局所的圧力を加えることによる疼痛の有無を評価することによって評価され得る。指炎は、両手及び両足における存在及び重症度について評価され得る。ＳＦ－３６は、スコアリングされた８つの多項目スケールからなる質問票であり、ＳＦ－３６ＰＳＡ及びＳＦ－３６ＭＣＳは、異なる疾患の相対的な負担と異なる治療の相対的利益との比較を可能にするＳＦ－３６から導かれるサマリースコアである。

【０１６３】

典型的には、病態の治療は、組成物中に含有される比活性に応じて、平均して、合計、１用量あたり患者１ｋｇあたり少なくとも約０．０１～５００ミリグラムの範囲の少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体、好ましくは単回又は複数回投与あたり患者１ｋｇあたり少なくとも約０．１～１００ミリグラムの範囲の抗体の、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物の安全かつ有効な量又は投与量を投与することによって達成される。代替的に、有効な血清濃度は、単回又は複数回投与あたり０．１～５０００μｇ／ｍｌの血清濃度を含み得る。好適な投与量は、医療実践者には既知であり、当然のことながら、具体的な疾患状態、投与される組成物の比活性、及び処置を受けている具体的な患者に依存する。場合によっては、望ましい治療量を得るために、反復投与、即ち、特定の監視された量又は定量の反復個別投与を提供することが必要となる場合があり、この場合、個別投与は、望ましい日用量又は作用が得られるまで繰り返される。

【０１６４】

好ましい用量は、任意選択的に、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、及び／若しくは１００～５００ｍｇ／ｋｇ／投与、又はその任意の範囲、値若しくは分画を含むか、あるいは単回若しくは複数回投与あたり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、及び／若しくは５０００μｇ／ｍｌの血清濃度、又はその任意の範囲、値、若しくは分画を得るように含み得る。

【０１６５】

代替的に、投与される用量は、特定の薬剤の薬物動態特徴並びにその投与方法及び経路、レシピエントの年齢、健康及び体重、症状の性質及び程度、同時処置の種類、処置頻度、並びに所望の作用などの既知の因子により異なり得る。活性成分の投与量は、通常、体重１キログラムあたり約０．１～１００ミリグラムであり得る。通常、投与あたり１キロ

グラムあたり０．１～５０、好ましくは０．１～１０ミリグラム又は徐放性形態が、望ましい結果を得るために有効である。

【０１６６】

非限定的な例として、ヒト又は動物の処置は、単回、注入又は反復投与を使用して、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若しくは４０日目のうちの少なくとも１日に、又は代替的に若しくは追加的に、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、若しくは５２週目のうちの少なくとも１週に、又は代替的に若しくは追加的に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０年目のうちの少なくとも１年に、又はこれらの任意の組み合わせで、１日あたり０．１～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば、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、又は１００ｍｇ／ｋｇの、本発明の少なくとも１つの抗体の１回又は周期的な投与量として提供され得る。

【０１６７】

体内投与に好適な剤形（組成物）は、一般に、１単位又は容器あたり約０．１ミリグラム～約５００ミリグラムの活性成分を含有する。これらの薬学的組成物において、活性成分は、組成物の総重量に基づいて、通常、約０．５～９９．９９９重量％の量で存在する。

【０１６８】

非経口投与には、抗体は、薬学的に許容される非経口ビヒクルと合わせて、又は別途供給される、溶液、懸濁液、エマルション若しくは凍結乾燥粉末として、処方することができる。かかるビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液及び１～１０％ヒト血清アルブミンである。リポソーム及び固定油などの非水性ビヒクルを使用することもできる。ビヒクル又は凍結乾燥粉末は、等張性及び化学安定性を維持する添加剤（例えば、等張性に関しては塩化ナトリウム、マンニトール；化学安定性に関しては緩衝剤及び保存剤）を含有することができる。製剤は、既知の又は好適な技術によって滅菌される。

【０１６９】

好適な薬学的担体は、この分野での標準的参考テキストであるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ａ．Ｏｓｏｌの最新版の中で記載されている。

【０１７０】

代替的投与。薬学的に有効な量の、本発明による少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を投与するために、本発明により、多くの既知の及び開発された投与方法を使用することができる。以下の記述では経肺投与が使用されているが、本発明に従って他の投与方式を使用して、好適な結果を得てもよい。

【０１７１】

本発明のＴＮＦ抗体は、担体中で、溶液、エマルション、コロイド若しくは懸濁液として、又は乾燥粉末として、吸入によるか、又は本明細書に記載される若しくは当該技術分野において既知である他の方法による投与に好適な様々なデバイス及び方法のいずれかを使用して、送達することができる。

【０１７２】

非経口製剤及び投与。非経口投与用製剤は、一般的な賦形剤として滅菌水又は生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物に由来する油、水素

化ナフタレンなどを含有し得る。注射用の水性又は油性懸濁液は、既知の方法に従って、適切な乳化剤又は加湿剤及び懸濁剤を使用することによって調製可能である。注射剤は、水溶液、又は無菌注射液、又は溶媒中懸濁液などの非毒性の非経口投与可能な希釈剤であってもよい。使用可能なビヒクル又は溶媒としては、水、リンゲル液、等張生理食塩水などが可能であり、通常の溶媒又は懸濁溶媒としては、無菌の不揮発性油を使用することができる。これらの目的では、天然又は合成若しくは半合成の、脂肪油又は脂肪酸、天然又は合成若しくは半合成の、モノグリセリド又はジグリセリド又はトリグリセリドを含む、あらゆる種類の不揮発性油及び脂肪酸を使用することができる。非経口投与は当該技術分野において既知であり、従来の注射手段、米国特許第５，８５１，１９８号に記載されているようなガス加圧式無針注入デバイス、及び米国特許第５，８３９，４４６号に記載されているようなレーザー穿孔機デバイスが挙げられるが、これらに限定されず、これらは参照によって全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７３】

代替的送達。本発明は更に、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、包内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頚管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣内、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内又は経皮手段による少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の投与に関する。少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物は、非経口（皮下、筋肉内、又は静脈内）又は任意の他の投与、特に、液体溶液若しくは懸濁液の形態で使用するために、特に、クリーム及び座薬などであるがこれらに限定されない半固体形態で、膣若しくは直腸の投与における使用のために、錠剤若しくはカプセルなどであるがこれらに限定されない形態で、口腔若しくは舌下投与用に、あるいは粉末、点鼻剤若しくはエアロゾル、又はある特定の薬剤などであるがこれらに限定されない形態で、鼻腔内に、あるいは皮膚構造を改変するか、又は経皮パッチ中の薬物濃度を増加させるかのいずれかのために、ジメチルスルホキシドなどの化学的促進剤を用いて（Ｊｕｎｇｉｎｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｎ「Ｄｒｕｇ　Ｐｅｒｍｅａｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ」；Ｈｓｉｅｈ，Ｄ．Ｓ．，Ｅｄｓ．，ｐｐ．５９－９０（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ１９９４、参照により全体が本明細書に組み込まれる）、又はタンパク質及びペプチドを含有する製剤の皮膚への適用（国際公開第９８／５３８４７号）、又はエレクトロポレーションなどの一過性の輸送経路を作り出すための、若しくはイオントフォレシスなどの皮膚を通して荷電薬物の移動度を増加させるための電界の適用、又は超音波導入などの超音波の適用（米国特許第４，３０９，９８９号及び同第４，７６７，４０２号）を可能にする酸化剤を用いて、ゲル、軟膏、ローション、懸濁液若しくはパッチ送達系などであるが、これらに限定されない、経皮的に、調製することができる（上記の刊行物及び特許は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【０１７４】

経肺／鼻腔内投与。経肺投与のためには、好ましくは、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物は、肺の下気道又は洞に達するのに有効な粒径で送達される。本発明により、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体は、吸入により治療薬を投与するための、当該技術分野において既知の様々な吸入又は鼻腔内デバイスのいずれかにより送達することができる。患者の洞腔又は肺胞内にエアロゾル化した製剤を被着させることができるこれらのデバイスとしては、定量吸入器、ネブライザー、乾燥粉末発生器、噴霧器などが挙げられる。抗体の経肺又は鼻腔内投与を目的とするのに好適な他のデバイスも、当該技術分野において既知である。かかるデバイスは全て、エアロゾル中の抗体を分配するための投与に好適な製剤を使用することができる。このようなエアロゾルは、溶液（水性及び非水性の両方）又は固体粒子のいずれかで構成されることができる。Ｖｅｎｔｏｌｉｎ（登録商標）定量吸入器のような定量吸入器は、典型的には噴射ガスを使用し、吸気中の作動を必要とする（例えば、国際公開第９４／１６９７０号、国際公開第９８／３５８８８号を参照のこと）。Ｔｕｒｂｕｈａｌｅｒ（商標）（Ａｓｔｒａ）、Ｒｏｔａｈａｌｅｒ（登録商標）（Ｇｌａ

ｘｏ）、Ｄｉｓｋｕｓ（登録商標）（Ｇｌａｘｏ）、Ｓｐｉｒｏｓ（商標）吸入器（Ｄｕｒａ）、Ｉｎｈａｌｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓにより市販されているデバイス、及びＳｐｉｎｈａｌｅｒ（登録商標）パウダー吸入器（Ｆｉｓｏｎｓ）などの乾燥粉末吸入器は、混合粉末の呼吸作動を使用する（米国特許第４６６８２１８号（Ａｓｔｒａ）、欧州特許第２３７５０７号（Ａｓｔｒａ）、国際公開第９７／２５０８６号（Ｇｌａｘｏ）、国際公開第９４／０８５５２号（Ｄｕｒａ）、米国特許第５４５８１３５号（Ｉｎｈａｌｅ）、国際公開第９４／０６４９８号（Ｆｉｓｏｎｓ）、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。ＡＥＲｘ（商標）（Ａｒａｄｉｇｍ）、Ｕｌｔｒａｖｅｎｔ（登録商標）ネブライザー（Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ）、及びＡｃｏｒｎ　ＩＩ（登録商標）ネブライザー（Ｍａｒｑｕｅｓｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）などのネブライザー（米国特許第５４０４８７１号（Ａｒａｄｉｇｍ）、国際公開第９７／２２３７６号）（上記の参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）は、溶液からエアロゾルを生じさせるのに対し、定量吸入器、乾燥粉末吸入器などは、小粒子エアロゾルを発生させる。市販の吸入デバイスのこれらの具体例は、本発明の実施に好適な特定のデバイスを代表するものとして意図されており、本発明の範囲を制限するものとして意図されているものではない。好ましくは、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を含む組成物は、乾燥粉末吸入器又は噴霧器によって送達される。本発明の少なくとも１つの抗体を投与するための吸入デバイスには、複数の望ましい特徴が存在する。例えば、吸入デバイスによる送達は、有利に信頼性が高く、再現可能であり、かつ正確である。吸入デバイスは任意選択的に、良好な呼吸のために、例えば、約１０μｍ未満、好ましくは約１～５μｍの小さな乾燥粒子を送達することができる。

【０１７５】

スプレーでのＴＮＦ抗体組成物の投与。ＴＮＦ抗体組成物タンパク質を含むスプレーは、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の懸濁液又は溶液に加圧下でノズルを通過させることにより生じさせることができる。ノズルの大きさ及び構成、適用される圧力並びに液体供給速度は、所望の出力及び粒径を達成するように選定することができる。例えば、キャピラリー又はノズルフィードと共に電界により電気スプレーを作製することができる。有利なことに、噴霧器により送達される少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物タンパク質の粒子は、約１０μｍ未満、好ましくは約１μｍ～約５μｍ、最も好ましくは約２μｍ～約３μｍの範囲の粒径を有する。

【０１７６】

噴霧器と共に使用するのに好適な少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物タンパク質の製剤は、典型的には、水溶液中に、例えば、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又は１００ｍｇ／ｍＬ又はｍｇ／ｇｍであるがこれらに限定されない、１ｍＬ若しくはｍｇ／ｇｍの溶液あたり約０．１ｍｇ～約１００ｍｇ、又はその中の任意の範囲若しくは値の少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物タンパク質の濃度で抗体組成物タンパク質を含む。この製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存剤、界面活性剤、及び好ましくは亜鉛などの薬剤を含み得る。この製剤は、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質又は炭水化物などの抗体組成物タンパク質を安定化させるための賦形剤又は薬剤も含み得る。抗体組成物タンパク質の処方において有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミンなどが挙げられる。抗体組成物タンパク質の処方において有用な典型的な炭水化物としては、ショ糖、マンニトール、乳糖、トレハロース、グルコースなどが挙げられる。抗体組成物タンパク質製剤はまた、エアロゾル形成時の溶液の霧化により引き起こされる抗体組成物タンパク質の表面誘発性の凝集を低減又は阻止することができる界面活性剤も含み得る。ポリオキシエチレン脂肪酸エステル及びアルコール、並びにポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルのような様々な従来の界面活性剤を使用することができる。量は一般に、製剤の０．００１～１４重量％の範囲にわたる。本発明の目的上とりわけ好ましい界面活性剤は、

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０などである。ＴＮＦ抗体又は特定された部分若しくは変異体などのタンパク質の製剤には、当該技術分野において既知の更なる薬剤もまた製剤中に含むことができる。

【０１７７】

ネブライザーによるＴＮＦ抗体組成物の投与。抗体組成物タンパク質は、ジェットネブライザー又は超音波ネブライザーなどのネブライザーにより投与することができる。典型的には、ジェットネブライザーでは、オリフィスを通して高速の空気ジェットを作り出すのに圧縮空気供給源を使用する。ガスがノズルを超えて膨張する際に低圧領域が作り出され、それが液体リザーバに接続された毛細管を通して抗体組成物タンパク質の溶液を引き出す。毛細管からの液体流は、それが管を出る際に不安定な糸状体及び液滴に剪断されてエアロゾルを作り出す。ある範囲の構成、流速及びバッフル型を、所定のジェットネブライザーからの所望の性能の特徴を達成するのに使用することができる。超音波ネブライザーにおいては、高周波電気エネルギーを使用して、典型的には圧電変換器を使用して、振動性の機械的エネルギーを作り出す。このエネルギーが、直接又はカップリング液を通じてのいずれかで抗体組成物タンパク質の製剤に伝播されて、抗体組成物タンパク質を含むエアロゾルを作り出す。有利なことに、ネブライザーにより送達される抗体組成物タンパク質の粒子は、約１０μｍ未満、好ましくは約１μｍ～約５μｍ、最も好ましくは約２μｍ～約３μｍの範囲の粒径を有する。

【０１７８】

ジェット又は超音波いずれかのネブライザーでの使用に好適な少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の製剤は、典型的には、溶液１ｍＬあたり約０．１ｍｇ～約１００ｍｇの少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体タンパク質の濃度を含む。この製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存剤、界面活性剤、及び好ましくは亜鉛などの薬剤を含み得る。この製剤は、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質、又は炭水化物などの少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物タンパク質の安定化のための賦形剤又は薬剤も含み得る。少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物タンパク質の処方において有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミンなどが挙げられる。少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の処方において有用な典型的な炭水化物としては、ショ糖、マンニトール、乳糖、トレハロース、グルコースなどが挙げられる。少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体製剤はまた、エアロゾル形成時に溶液の霧化により引き起こされる少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の表面誘発性の凝集を低減又は阻止し得る界面活性剤も含み得る。ポリオキシエチレン脂肪酸エステル及びアルコール、並びにポリオキシエチレンソルビタル脂肪酸エステルのような様々な従来の界面活性剤を使用することができる。量は、一般に製剤の０．００１～４重量％の範囲である。本発明の目的上とりわけ好ましい界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０などである。抗体タンパク質などのタンパク質の製剤には、当該技術分野において既知の更なる薬剤もまた製剤中に含むことができる。

【０１７９】

定量吸入器によるＴＮＦ抗体組成物の投与。定量吸入器（ＭＤＩ）では、噴射剤、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体及び任意の賦形剤又は他の添加剤が、液化圧縮ガスを含む混合物としてキャニスター内に収容される。絞り弁の作動により、好ましくは、約１０μｍ未満、好ましくは約１μｍ～約５μｍ、最も好ましくは約２μｍ～３μｍの範囲のサイズの粒子を含有するエアロゾルとしての混合物が放出される。ジェット粉砕、噴霧乾燥、臨界点凝結などを含む、当業者に既知の様々な方法により生成された抗体組成物タンパク質の製剤を用いることにより、所望のエアロゾル粒径を得ることができる。好ましい定量吸入器としては、３Ｍ又はＧｌａｘｏにより製造されかつヒドロフルオロカーボン噴射剤を使用するものが挙げられる。

【０１８０】

定量吸入器デバイスで使用するための少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体の製剤は、一般に、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を、例えば、界面活性剤の助けを借りて噴射剤中に懸濁した非水性溶媒中の懸濁液として含有する微粉を含む。噴射剤は、トリクロロフルオロメ

タン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール及び１，１，１，２－テトラフルオロエタン、ＨＦＡ－１３４ａ（ヒドロフルオロアルカン－１３４ａ）、ＨＦＡ－２２７（ヒドロフルオロアルカン－２２７）などが挙げられる、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、又は炭化水素のような本目的上使用される任意の従来の物質であることができる。好ましくは、噴射剤はヒドロフルオロカーボンである。界面活性剤は、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を噴射剤中の懸濁液として安定化させる、活性薬剤を化学的分解に対して保護するなどのために選択することができる。好適な界面活性剤には、ソルビタントリオレエート、ダイズレシチン、オレイン酸などが挙げられる。場合によっては、エタノールなどの溶媒を使用する溶液エアロゾルが好ましい。タンパク質の処方のための当該技術分野で既知の更なる薬剤を薬剤中に含んでもよい。

【０１８１】

当業者は、本発明の方法が、本明細書に記載されないデバイスを介する少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体組成物の経肺投与により達成され得ることを認識するであろう。

【０１８２】

経口製剤及び投与。経口のための製剤は、腸壁の浸透性を人工的に増加させるためのアジュバント（例えば、レゾルシノール、並びにポリオキシエチレンオレイルエーテル及びｎ－ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤）の同時投与、並びに酵素的分解を阻害するための酵素阻害剤（例えば、膵トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロリン酸（ＤＦＦ）及びトラシロール）の同時投与による。経口投与のための固体型剤形の活性成分化合物は、ショ糖、乳糖、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、デンプン、寒天、アルギン酸塩、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントガム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成又は半合成ポリマー、及びグリセリドなどの、少なくとも１つの添加物と混合することができる。これらの剤形はまた、他の種類（複数可）の添加剤、例えば、不活性希釈剤、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、パラベンなど）、保存剤（ソルビン酸、アスコルビン酸、α－トコフェロールなど）、抗酸化剤（システインなど）、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味剤、着香剤、香料なども含有し得る。

【０１８３】

錠剤及び丸剤は腸溶コーティング調製物に更に加工することができる。経口投与のための液体調製物には、医学的用途に許容できるエマルション、シロップ、エリキシル剤、懸濁剤及び溶液調製物が挙げられる。これらの調製物は、その分野で通例に使用される不活性希釈剤、例えば水を含有することができる。リポソームはインスリン及びヘパリンの薬物送達系としても記述されている（米国特許第４，２３９，７５４号）。より最近では、混合アミノ酸の人工的ポリマーのミクロスフェア（プロテイノイド）が、医薬品を送達するために使用されている（米国特許第４，９２５，６７３号）。更に、米国特許第５，８７９，６８１号及び米国特許第５，５，８７１，７５３号に記載される担体化合物が、生物学的活性薬剤を経口で送達するのに使用されることは、当該技術分野において既知である。

【０１８４】

粘膜製剤及び投与。粘膜表面を通る吸収のため、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を投与するための組成物及び方法は、複数のサブミクロン粒子と、粘膜付着性巨大分子と、生物活性ペプチドと、エマルション粒子の粘膜付着を達成することにより粘膜表面を通る吸収を促進する水性連続相と、を含む、エマルションを含む（米国特許第５，５１４，６７０号）。本発明のエマルションの適用に好適な粘膜表面には、角膜、結膜、口腔内、舌下、鼻、膣、肺、胃、腸、及び直腸投与経路を挙げることができる。膣又は直腸投与のための製剤、例えば坐薬は、賦形剤として、例えば、ポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオバターなどを含有し得る。鼻内投与のための処方は固体であってよく、賦形剤として、例えば乳糖を含有することができ、又は水性若しくは油性溶液の点鼻薬であることができる。口腔内投与のために、賦形剤として、糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸

マグネシウム、αデンプン（pregelinatined starch）などが挙げられる（米国特許第５，８４９，６９５号）。

【０１８５】

経皮製剤及び投与。経皮投与のために、少なくとも１つの抗ＴＮＦ抗体を、リポソーム若しくはポリマーナノ粒子、微小粒子、マイクロカプセル又はミクロスフェア（特に明示しない限り、集合的に微小粒子と称する）などの送達デバイス中にカプセル化する。ポリ乳酸、ポリグリコール酸及びそれらのコポリマーなどのポリヒドロキシ酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物及びポリホスファゼンなどの合成ポリマー、並びにコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミン及び他のタンパク質などの天然ポリマー、アルギン酸塩及び他の多糖類並びにそれらの組み合わせから作製される微小粒子を含む多くの好適なデバイスが既知である（米国特許第５，８１４，５９９号）。

【０１８６】

長時間投与及び製剤。本発明の化合物を、単回投与により、長期間にわたり、例えば、１週～１年間、被験体に送達することが時折望ましい場合がある。様々な徐放、デポー又は埋め込み剤形を利用することができる。例えば、剤形は、体液において溶解度が低い化合物の薬学的に許容される非毒性塩、例えば、（ａ）リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモ酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノ－又はジスルホン酸、ポリガラクツロン酸などの多塩基酸との酸付加塩、（ｂ）亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウムなどの多価金属カチオン、又は例えば、Ｎ，Ｎ’－ジベンジル－エチレンジアミン若しくはエチレンジアミンから形成された有機カチオンを有する塩、あるいは（ｃ）（ａ）及び（ｂ）の組み合わせ、例えば、タンニン酸亜鉛塩を含有し得る。加えて、本発明の化合物、又は好ましくは前述したものなどの比較的不溶性の塩を、注射に好適な、例えばゴマ油と共に、例えば、モノステアリン酸アルミニウムゲルなどのゲル中に処方することができる。とりわけ好ましい塩は、亜鉛塩、亜鉛タンニン酸塩、パモ酸塩などである。別の種類の注射用徐放デポー製剤は、例えば米国特許第３，７７３，９１９号に記載されるポリ乳酸／ポリグリコール酸ポリマーなどのゆっくりと分解する非毒性の非抗原性ポリマー中にカプセル化されるために分散された化合物又は塩を含有する。化合物、又は好ましくは上述したものなどの比較的不溶性の塩は、特に動物での使用のために、コレステロールマトリックスのシラスティックペレット中に処方することもできる。更なる徐放デポー又は埋め込み製剤、例えば、ガス又は液体リポソームは、文献（米国特許第５，７７０，２２２号、及び「Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ」，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．，１９７８）で既知である。

【０１８７】

本発明を全般的に記述したことから、同様物は、具体的説明として提供されるが制限することを意図していない以下の実施例を参照することにより、より容易に理解されるであろう。

【０１８８】

実施例１：哺乳類細胞におけるＴＮＦ抗体のクローニング及び発現。

典型的な哺乳類発現ベクターは、ｍＲＮＡの転写の開始を媒介する少なくとも１つのプロモータ要素、抗体コード配列、並びに転写の終結及び転写物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。付加的な要素には、エンハンサ、コザック配列並びにＲＮＡスプライシングのためのドナー及びアクセプタ部位に隣接している介在配列が含まれる。高効率の転写は、ＳＶ４０からの初期及び後期プロモータ、レトロウイルス、例えば、ＲＳＶ、ＨＴＬＶＩ、ＨＩＶＩからの長端末反復（long terminal repeats、ＬＴＲＳ）、及びサイトメガロウイルス（cytomegalovirus、ＣＭＶ）の初期プロモータで達成することができる。しかしながら、細胞要素を使用することもできる（例えば、ヒトアクチンプロモータ）。本発明の実施において使用するのに好適な発現ベクターとしては、例えば、ｐＩＲＥＳ１ｎｅｏ、ｐＲｅｔｒｏ－Ｏｆｆ、ｐＲｅｔｒｏ－Ｏｎ、ＰＬＸＳＮ若しくはｐＬＮＣＸ

（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ Ｌａｂｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐｃＤＮＡ／Ｚｅｏ（＋／－）又はｐｃＤＮＡ３．１／Ｈｙｇｒｏ（＋／－）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＰＳＶＬ及びＰＭＳＧ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、ｐＲＳＶｃａｔ（ＡＴＣＣ３７１５２）、ｐＳＶ２ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ３７１４６）並びにｐＢＣ１２ＭＩ（ＡＴＣＣ６７１０９）などのベクターが挙げられる。使用することができる哺乳類の宿主細胞には、ヒトＨｅｌａ２９３、Ｈ９及びＪｕｒｋａｔ細胞、マウスＮＩＨ３Ｔ３及びＣ１２７細胞、Ｃｏｓ１、Ｃｏｓ７及びＣＶ１、ウズラＱＣ１－３細胞、マウスＬ細胞及びチャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary、ＣＨＯ）細胞が含まれる。

【０１８９】

代替的に、遺伝子を、染色体に組み込まれた遺伝子を含有する安定した細胞株において発現させることができる。ｄｈｆｒ、ｇｐｔ、ネオマイシン又はハイグロマイシンなどの選択マーカーとの共トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の特定及び単離を可能にする。

【０１９０】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、大量のコード化された抗体を発現するために増幅され得る。ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、目的の遺伝子の数百又は更には数千のコピーを有する細胞株を開発するのに有用である。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（ＧＳ）である（Ｍｕｒｐｈｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２２７：２７７－２７９（１９９１）、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１０：１６９－１７５（１９９２））。これらのマーカーを使用して、哺乳類細胞を選択的培地中で成長させ、最も高い耐性を有する細胞が選択される。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた増幅遺伝子（複数可）を含有する。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）及びＮＳＯ細胞が抗体の生成に使用されることが多い。

【０１９１】

発現ベクターｐＣ１及びｐＣ４は、ラウス肉腫ウイルスの強いプロモータ（ＬＴＲ）（Ｃｕｌｌｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：４３８－４４７（１９８５））に加え、ＣＭＶエンハンサ（Ｂｏｓｈａｒｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ４１：５２１－５３０（１９８５））の断片を含有する。例えば、制限酵素切断部位ＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ及びＡｓｐ７１８を伴う複数のクローニング部位は、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターは更に、ラットプレプロインスリン遺伝子の３’イントロン、ポリアデニル化及び終結シグナルを含有する。

【０１９２】

ＣＨＯ細胞におけるクローニング及び発現。ベクターｐＣ４は、ＴＮＦ抗体の発現に使用される。プラスミドｐＣ４は、プラスミドｐＳＶ２－ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ受託番号３７１４６）の誘導体である。このプラスミドは、ＳＶ４０初期プロモータの制御下でマウスＤＨＦＲ遺伝子を含有する。これらのプラスミドでトランスフェクトされる、ジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞又は他の細胞は、化学療法剤メトトレキサートを補充した選択的培地（例えば、α－ＭＥＭ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）中で細胞を成長させることによって選択することができる。メトトレキサート（ＭＴＸ）に耐性の細胞におけるＤＨＦＲ遺伝子の増幅は、十分に文書化されている（例えば、Ｆ．Ｗ．Ａｌｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：１３５７－１３７０（１９７８）、Ｊ．Ｌ．Ｈａｍｌｉｎ ａｎｄ ＣＭａ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ１０９７：１０７－１４３（１９９０）及びＭ．Ｊ．Ｐａｇｅ ａｎｄ Ｍ．Ａ．Ｓｙｄｅｎｈａｍ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：６４－６８（１９９１）を参照のこと）。増大したＭＴＸ濃度において成長した細胞は、ＤＨＦＲ遺伝子の増幅の結果として、標的酵素であるＤＨＦＲの過剰生成により、薬物に対する耐性を発達させる。第２の遺伝子がＤＨＦＲ遺伝子に連結されている場合、通常、共増幅され、過剰発現される。このアプローチを使用して、増幅遺伝子（複数

可）の１，０００を超えるコピーを有する細胞株を開発することができることが、当該技術分野において知られている。続いて、メトトレキサートを回収する際、宿主細胞の１つ以上の染色体（複数可）に組み込まれた増幅遺伝子を含有する細胞株が得られる。

【０１９３】

プラスミドｐＣ４は、目的の遺伝子を発現するために、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復（ＬＴＲ）の強いプロモータ（Ｃｕｌｌｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：４３８－４４７（１９８５））に加え、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）の即初期遺伝子のエンハンサ（Ｂｏｓｈａｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ４１：５２１－５３０（１９８５））から単離された断片を含有する。プロモータの下流は、遺伝子の組み込みを可能にするＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ及びＡｓｐ７１８制限酵素切断部位である。これらのクローニング部位の後に、プラスミドは、ラットプレプロインスリン遺伝子の３’イントロン及びポリアデニル化部位を含有する。他の高効率のプロモータ、例えば、ヒトβアクチンプロモータ、ＳＶ４０初期若しくは後期プロモータ、又は他のレトロウイルス、例えばＨＩＶ及びＨＴＬＶＩからの長末端反復も発現のために使用することができる。ＣｌｏｎｔｅｃｈのＴｅｔ－Ｏｆｆ及びＴｅｔ－Ｏｎ遺伝子発現系、並びに類似の系を使用して、哺乳類細胞において調節された方法で、ＴＮＦを発現させることができる（Ｍ．Ｇｏｓｓｅｎ，ａｎｄ　Ｈ．Ｂｕｊａｒｄ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：５５４７－５５５１（１９９２））。ｍＲＮＡのポリアデニル化のために、例えば、ヒト成長ホルモン又はグロビン遺伝子からの他のシグナルも使用することができる。染色体に組み込まれた目的の遺伝子を有する安定した細胞株は、ｇｐｔ、Ｇ４１８又はハイグロマイシンなどの選択マーカーとの共トランスフェクションの際に選択することもできる。最初に１つを超える選択マーカー、例えばＧ４１８、に加えてメトトレキサートを使用するのが有利である。

【０１９４】

このプラスミドｐＣ４を制限酵素で消化した後に、当該技術分野において既知の手順により、子ウシ腸ホスファターゼを使用して脱リン酸化する。次に、ベクターは１％アガロースゲルから単離される。

【０１９５】

次に、単離された可変及び定常領域コードＤＮＡ及び脱リン酸化ベクターをＴ４ＤＮＡリガーゼでライゲートする。次に、大腸菌ＨＢ１０１又はＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞を形質転換し、例えば、制限酵素分析を使用して、プラスミドｐＣ４に挿入された断片を含有する細菌を特定する。

【０１９６】

トランスフェクションには、活性ＤＨＦＲ遺伝子が欠損しているチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が使用される。５μｇの発現プラスミドｐＣ４は、リポフェクチンを使用して、０．５μｇのプラスミドｐＳＶ２－ｎｅｏで共トランスフェクトされる。プラスミドｐＳＶ２－ｎｅｏは、優性の選択マーカーである、Ｇ４１８を含む一群の抗生物質に対して耐性を付与する酵素をコード化するＴｎ５からのｎｅｏ遺伝子を含有する。１μｇ／ｍｌのＧ４１８で補充したαーＭＥＭに細胞を播種する。２日後、細胞をトリプシン処理し、ハイブリドーマクローニングプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中の、１０、２５又は５０ｎｇ／ｍｌのメトトレキサート＋１μｇ／ｍｌのＧ４１８で補充したαーＭＥＭに播種する。約１０～１４日後、単一クローンをトリプシン処理した後、異なる濃度のメトトレキサート（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、４００ｎＭ、８００ｎＭ）を使用して、６ウェルペトリ皿又は１０ｍＬフラスコに播種する。次に、最高濃度のメトトレキサートで成長させているクローンを、更に高い濃度のメトトレキサート（１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ）を含む新しい６ウェルプレートに移す。１００～２００ｍＭの濃度で成長するクローンが得られるまで同じ手順を繰り返す。所望の遺伝子生成物の発現は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びウエスタンブロットによって、又は逆相ＨＰＬＣ分析によって分析される。

【０１９７】

実施例２：トランスジェニックマウスを使用する、ヒトＴＮＦと反応する高親和性ヒトＩｇＧモノクローナル抗体の生成。

要約。ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックマウスを使用して、１つ以上のＴＮＦ媒介性疾患の処置のための、ＴＮＦ作用を阻害するために治療的に使用することができる高親和性の完全ヒトモノクローナル抗体を生成する。重鎖及び軽鎖両方のヒト可変及び定常領域抗体導入遺伝子を含有する（ＣＢＡ／ＪｘＣ５７／ＢＬ６／Ｊ）$Ｆ_2$ハイブリッドマウスをヒト組換えＴＮＦで免疫化する（Ｔａｙｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５７９－５９１（１９９３）、Ｌｏｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３６８：８５６－８５９（１９９４）、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：８２６（１９９６）、Ｆｉｓｈｗｉｌｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１４：８４５－８５１（１９９６））。いくつかの融合物が完全ヒトＴＮＦ反応性ＩｇＧモノクローナル抗体の１つ以上のパネルを生み出した。完全ヒト抗ＴＮＦ抗体を更に特徴付けする。全てはＩｇＧ１κである。かかる抗体は、およそ１×１０^{９}～９×１０^{１２}の親和性定数を有することが分かった。これらの完全ヒトモノクローナル抗体の予期せぬ高親和性により、それらはＴＮＦ関連疾患、病態、又は障害における治療用途のための好適な候補となる。

【０１９８】

略語。ＢＳＡ－ウシ血清アルブミン、$Ｃｏ_2$－二酸化炭素、ＤＭＳＯ－ジメチルスルホキシド、ＥＩＡ－酵素イムノアッセイ、ＦＢＳ－ウシ胎児血清、$Ｈ_2Ｏ_2$－過酸化水素、ＨＲＰ－西洋わさびペルオキシダーゼ、ＩＤ－皮内（interadermal）、Ｉｇ－免疫グロブリン、ＴＮＦ－組織壊死因子α、ＩＰ－腹腔内、ＩＶ－静脈内、Ｍａｂ－モノクローナル抗体、ＯＤ－光学密度、ＯＰＤ－ｏフェニレンジアミン二塩酸塩、ＰＥＧ－ポリエチレングリコール、ＰＳＡ－ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン、ＲＴ－室温、ＳＱ－皮下、ｖ／ｖ－単位容量あたりの容量、ｗ／ｖ－単位容量あたりの重量。

【０１９９】

材料及び方法

動物。ヒト抗体を発現することができるトランスジェニックマウスは、当該技術分野において既知であり、（例えば、ＧｅｎＰｈａｒｍ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ、Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ、及びその他）から市販されており、ヒト免疫グロブリンを発現するが、マウスＩｇＭ又はＩｇκを発現しない。例えば、かかるトランスジェニックマウスは、Ｖ（Ｄ）Ｊ結合、重鎖クラススイッチ及び体細胞突然変異を受けてヒト配列免疫グロブリンのレパートリーを生成する、ヒト配列導入遺伝子を含有する（Ｌｏｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３６８：８５６－８５９（１９９４））。軽鎖導入遺伝子は、例えば、部分的に、生殖系列ヒトＶκ領域のほぼ半分を含む酵母人工染色体クローンに由来し得る。加えて、重鎖導入遺伝子は、ヒトμ及びヒトγ１の両方（Ｆｉｓｈｗｉｌｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１４：８４５－８５１（１９９６））並びに／又はγ３定常領域をコード化することができる。適切な遺伝子型系統由来のマウスを免疫化及び融合プロセスにおいて使用して、ＴＮＦに対する完全ヒトモノクローナル抗体を生成することができる。

【０２００】

免疫化。１つ以上の免疫化スケジュールは、抗ＴＮＦヒトハイブリドーマを生成するために使用することができる。以下の例示的な免疫化プロトコル後に、最初のいくつかの融合を行うことができるが、他の類似の既知のプロトコルを使用することもできる。数匹の１４～２０週齢の雌及び／又は外科的に去勢した雄のトランスジェニックマウスに対して、最終容量１００～４００μｌ（例えば、２００）で等量のＴＩＴＥＲＭＡＸ又は完全フロイントアジュバントで乳化した１～１０００μｇの組換えヒトＴＮＦをＩＰ又はＩＤに接種する。各マウスはまた、任意選択的に、２ＳＱ部位の各々に１００μＬの生理学的生理食塩水中１～１０μｇを受けることもできる。その後、マウスは、１～７、５～１２、１０～１８、１７～２５及び／又は２１～３４日後にＩＰ（１～４００μｇ）及びＳＱ（１～４００μｇｘ２）により等量のＴＩＴＥＲＭＡＸ又は完全フロイントアジュバントで

乳化したＴＮＦで、免疫化され得る。抗凝固薬なしで１２～２５及び２５～４０日後に眼窩後穿刺によってマウスを出血させることができる。次に、血液を室温で１時間凝固させ、血清を回収し、既知の方法によりＴＮＦ　ＥＩＡアッセイを使用して滴定する。反復注射が力価の増加を生じなければ、融合を行う。その際、マウスに、１００μＬの生理学的生理食塩水に希釈した１～４００μｇのＴＮＦの最終ＩＶブースター注射を与えることができる。３日後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を無菌的に除去し、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン及び０．２５μｇ／ｍＬのアンホテリシンＢ（ＰＳＡ）を含有する、１０ｍＬの冷リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中に浸漬することができる。ＰＳＡ－ＰＢＳで脾臓を無菌灌流することにより、脾細胞を採取する。細胞を冷ＰＳＡ－ＰＢＳ中で１回洗浄し、トリパンブルー染料排除を使用して計数し、２５ｍＭヘペスを含有するＲＰＭＩ１６４０培地に再懸濁する。

【０２０１】

細胞融合。既知の方法により、例えば、当該技術分野において既知である、１：１～１：１０のマウス骨髄腫細胞対生脾臓細胞比率で融合を行うことができる。非限定的な例として、脾臓細胞及び骨髄腫細胞は一緒にペレット化することができる。次に、３０秒かけてペレットを３７℃でゆっくり１ｍＬの５０％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ／ＰＢＳ溶液（ＰＥＧ分子量１，４５０、Ｓｉｇｍａ）に再懸濁することができる。次いで、１分かけて２５ｍＭヘペスを含有する１０．５ｍＬのＲＰＭＩ１６４０培地（３７℃）をゆっくり添加することによって、融合を停止させることができる。融合細胞を５分間５００～１５００ｒｐｍで遠心分離する。その後、細胞をＨＡＴ培地（２５ｍＭヘペス、１０％胎児クローンＩ血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、４ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０μｇ／ｍＬのゲンタマイシン、２．５％Ｏｒｉｇｅｎ培養サプリメント（Ｆｉｓｈｅｒ）、１０％６５３調整ＲＰＭＩ１６４０／ヘペス培地、５０μＭ２－メルカプトエタノール、１００μＭヒポキサンチン、０．４μＭアミノプテリン、及び１６μＭチミジンを含有するＲＰＭＩ１６４０培地）に再懸濁した後、１５の９６ウェル平底組織培養プレートに２００μＬ／ウェルで平板培養する。次に、７～１０日間、５％CO_2及び９５％空気を含有する加湿した３７℃のインキュベータにプレートを配置する。

【０２０２】

マウス血清におけるヒトＩｇＧ抗ＴＮＦ抗体の検出。固相ＥＩＡを使用して、ヒトＴＮＦに特異的なヒトＩｇＧ抗体についてマウス血清をスクリーニングすることができる。簡潔に、ＰＢＳ中２μｇ／ｍＬのＴＮＦで一晩プレートをコーティングすることができる。０．０２％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０を含有する０．１５Ｍ生理食塩水で洗浄した後、ウェルをＰＢＳ中１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ、２００μＬ／ウェルで、室温で１時間遮断することができる。プレートを直ちに使用するか、又は後に使用するために－２０℃で凍結する。マウス血清希釈物を、５０μＬ／ウェルでＴＮＦコーティングしたプレート上で、室温で１時間インキュベートする。プレートを洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中に１：３０，０００で希釈したＦｃ特異的の５０μＬ／ウェルＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧで、室温において１時間プローブする。プレートを再度洗浄することができ、１００μＬ／ウェルのクエン酸塩－リン酸塩基質溶液（０．１Ｍクエン酸及び０．２Ｍリン酸ナトリウム、０．０１％H_2O_2及び１ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ）を１５分かけて室温で添加する。次に、２５μＬ／ウェルで反応停止溶液（４Ｎ硫酸）を添加し、自動プレート分光光度計により４９０ｎｍでＯＤを読み取る。

【０２０３】

ハイブリドーマ上清における完全ヒト免疫グロブリンの検出。好適なＥＩＡを使用して、完全ヒト免疫グロブリンを分泌する成長陽性ハイブリドーマを検出することができる。簡潔に、９６ウェルのポップアウトプレート（ＶＷＲ、６１０７４４）を、４℃で一晩、炭酸ナトリウム緩衝剤中１０μｇ／ｍＬのヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃでコーティングすることができる。プレートを洗浄し、３７℃で１時間、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで遮断し、直ちに使用するか、又は－２０℃で凍結する。未希釈ハイブリドーマ上清を、プレート上で、３７℃において１時間インキュベートする。プレートを洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中に１

：１０，０００で希釈したＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトκで、３７℃において１時間プローブする。次に、上述のように、プレートを基質溶液と共にインキュベートする。

【０２０４】

完全ヒト抗ＴＮＦ反応性の決定。上記のハイブリドーマは、好適なＲＩＡ又は他のアッセイを使用してＴＮＦに対する反応性について同時にアッセイすることができる。例えば、上記のように、上清をヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃプレート上でインキュベートし、洗浄した後、室温で１時間、１ウェルあたり適切な計数で、放射線標識されたＴＮＦを用いてプローブする。ウェルをＰＢＳで２回洗浄し、好適な計数器を使用して、結合した放射線標識されたＴＮＦを定量化する。

【０２０５】

ヒトＩｇＧ１κ抗ＴＮＦ分泌ハイブリドーマを細胞培養において拡張し、限定希釈により系列的にサブクローニングすることができる。結果として得られたクローン集団を拡張し、凍結培地（９５％ＦＢＳ、５％ＤＭＳＯ）中で凍結保存し、液体窒素中で保管する。

【０２０６】

アイソタイプ。抗体のアイソタイプの決定は、特定の滴定に対するマウス免疫血清をスクリーニングするために使用されたものと類似の形式のＥＩＡを使用して達成することができる。上述のように９６ウェルプレート上にＴＮＦをコーティングすることができ、２μｇ／ｍＬの精製された抗体を、室温で１時間プレート上でインキュベートすることができる。プレートを洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中に１：４０００で希釈したＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトIgG_1又はＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトIgG_3で、室温で１時間プローブする。プレートを再度洗浄し、上述のように基質溶液と共にインキュベートする。

【０２０７】

ヒトＴＮＦによるヒト抗ヒトＴＮＦ抗体の結合動態。抗体の結合特徴は、例えば、ＴＮＦ捕捉ＥＩＡ及びＢＩＡｃｏｒｅ技術を使用して好適に評価することができる。精製されたヒトＴＮＦ抗体の段階的濃度は、上述のように、アッセイにおいて、２μｇ／ｍＬのＴＮＦでコーティングされたＥＩＡプレートへの結合について評価することができる。その後、相対結合効率を示す片対数プロットとしてＯＤを表すことができる。

【０２０８】

定量的結合定数は、例えば、以下のように、又は任意の他の既知の好適な方法によって得ることができる。ＢＩＡｃｏｒｅ　ＣＭ－５（カルボキシメチル）チップをＢＩＡｃｏｒｅ２０００ユニットに配置する。ＨＢＳ緩衝剤（０．０１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．００５％　ｖ／ｖ　Ｐ２０界面活性剤、ｐＨ７．４）を、安定したベースラインが得られるまで、５μｌ／分でチップのフローセル上に流す。２００μＬの水中１５ｍｇのＥＤＣ（Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチル－アミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩）の溶液（１００μＬ）を、２００μＬの水中２．３ｍｇのＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド）の１００μＬの溶液に添加する。結果として得られた溶液の４０μＬをチップ上に注入する。６μＬのヒトＴＮＦの溶液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム中１５μｇ／ｍＬ、ｐＨ４．８）をチップ上に注入し、約５００ＲＵの増加をもたらす。緩衝剤をＴＢＳ／Ｃａ／Ｍｇ／ＢＳＡ泳動緩衝剤（２０ｍＭトリス、０．１５Ｍ塩化ナトリウム、２ｍＭ塩化カルシウム、２ｍＭ酢酸マグネシウム、０．５％トリトンＸ－１００、２５μｇ／ｍＬ　ＢＳＡ、ｐＨ７．４）に変更し、一晩チップ上に流してそれを平衡化し、全ての未反応のコハク酸エステルを加水分解又はキャップする。

【０２０９】

３３．３３、１６．６７、８．３３、及び４．１７ｎＭで泳動緩衝剤中に抗体を溶解する。流量を３０μＬ／分に調整し、器具の温度を２５℃に調整する。１つはＴＮＦが固定化され（試料）、２つ目は非誘導化フローセル（ブランク）である、２つのフローセルを動態実行に使用する。各抗体濃度を１２０μＬ、フローセル上に３０μＬ／分で注入し（会合相）、続いて３６０秒間連続して緩衝剤を流す（解離相）。各３０μＬの２Ｍチオシアン酸グアニジンを２回順次注入することにより、チップの表面を再生する（組織壊死因子α／抗体複合体の解離）。

【０２１０】
データの分析は、当該技術分野において既知であるＢＩＡ評価３．０又はＣＬＡＭＰ２．０を使用して行われる。各抗体濃度について、ブランクセンソグラムを試料センソグラムから減ずる。解離（k_d，sec^{-1}）及び会合（k_a，$mol^{-1}sec^{-1}$）の両方についてグローバルフィットを行い、解離定数（K_D，ｍｏｌ）を算出する（k_d/k_a）。抗体親和性が十分に高いため、捕捉された抗体のＲＵが１００超である場合、抗体の追加希釈が実行される。
【０２１１】
結果と考察
抗ヒトＴＮＦモノクローナル抗体の生成。いくつかの融合を行い、ヒトＴＮＦに特異的な数十の抗体を生み出す各融合物を１５のプレート（１４４０ウェル／融合物）に播種する。これらのうち、いくつかは、ヒト及びマウスＩｇ鎖の組み合わせからなることがわ分かる。残りのハイブリドーマは、ヒト重鎖及び軽鎖のみからなる抗ＴＮＦ抗体を分泌（secret）する。ヒトハイブリドーマの全てがＩｇＧ１κであることが予想される。
【０２１２】
ヒト抗ヒトＴＮＦ抗体の結合動態。ＥＬＩＳＡ分析は、これらのハイブリドーマのほとんど又は全てからの精製された抗体が、濃度依存的にＴＮＦに結合することを確認する。図１～２は、これらの抗体の相対的結合効率の結果を示す。この場合、抗体のその同族抗原（エピトープ）に対する結合活性度を測定する。ＴＮＦを直接ＥＩＡプレートに結合すると、タンパク質の変性を引き起こし得、見かけ上の結合親和性は、未変性タンパク質への結合を反映することができないことに留意するべきである。５０パーセントの結合が広範な濃度にわたって見られる。
【０２１３】
定量的結合定数はヒト抗体のＢＩＡｃｏｒｅ分析を使用して得られ、ヒトモノクローナル抗体のいくつかが1×10^{-9}～7×10^{-12}の範囲のK_Dを有して非常に高い親和性であることを明らかにする。
【０２１４】
結論。
いくつかの融合は、ヒトＴＮＦで免疫化されるヒト可変及び定常領域抗体導入遺伝子を含有するハイブリッドマウスからの脾細胞を利用して行われる。ＩｇＧ１κアイソタイプのいくつかの完全ヒトＴＮＦ反応性ＩｇＧモノクローナル抗体のセットを生成する。完全ヒト抗ＴＮＦ抗体を更に特徴付けする。生成された抗体のうちのいくつかは、1×10^{9}～9×10^{12}の親和性定数を有する。これらの完全ヒトモノクローナル抗体の予期せぬ高親和性により、それらは、ＴＮＦ依存疾患、病態又は関連状態における治療用途に好適なものとなる。
【０２１５】
実施例３：ヒトＴＮＦαに反応性のヒトＩｇＧモノクローナル抗体の生成。
要約。重鎖及び軽鎖両方のヒト可変及び定常領域抗体導入遺伝子を含有する（ＣＢＡ／ＪｘＣ５７ＢＬ／６Ｊ）F_2ハイブリッドマウス（１～４）を組換えヒトＴＮＦαで免疫化した。ＧｅｎＴＮＶと命名された１つの融合が、固定化された組換えヒトＴＮＦαに結合する完全ヒトＩｇＧ１κモノクローナル抗体を８つ生み出した。特定直後、８つの細胞株は、更に特徴付けするためにＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙに譲渡された。これらＭａｂは配列が完全にヒトであるため、それらはヒトにおけるｃＡ２（Ｒｅｍｉｃａｄｅ）よりも免疫原性が低いと予想される。
【０２１６】
略語。ＢＳＡ－ウシ血清アルブミン、Co_2－二酸化炭素、ＤＭＳＯ－ジメチルスルホキシド、ＥＩＡ－酵素イムノアッセイ、ＦＢＳ－ウシ胎児血清、H_2O_2－過酸化水素、ＨＣ－重鎖、ＨＲＰ－西洋わさびペルオキシダーゼ、ＩＤ－皮内（interadermal）、Ｉｇ－免疫グロブリン、ＴＮＦ－組織壊死因子α、ＩＰ－腹腔内、ＩＶ－静脈内、Ｍａｂ－モノクローナル抗体、ＯＤ－光学密度、ＯＰＤ－ｏフェニレンジアミン二塩酸塩、ＰＥＧ－

ポリエチレングリコール、ＰＳＡ－ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン、ＲＴ－室温、ＳＱ－皮下、ＴＮＦα－腫瘍壊死因子α、ｖ／ｖ－単位容量あたりの容量、ｗ／ｖ－単位容量あたりの重量。

【０２１７】

序論。ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックマウスを利用して、組換えヒトＴＮＦαに特異的な完全ヒトモノクローナル抗体を生成した。ｃＡ２（Ｒｅｍｉｃａｄｅ）は、血清半減期が増加し、免疫原性に関する副作用が減少する利益を有して、ＴＮＦα媒介性疾患に関与する炎症性プロセスを治療的に阻害するために使用されるため、これらの固有の抗体を使用することができると期待される。

【０２１８】

材料及び方法。

動物ヒト免疫グロブリンを発現するが、マウスＩｇＭ又はＩｇκを発現しないトランスジェニックマウスは、ＧｅｎＰｈａｒｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌにより開発されてきた。これらのマウスは、Ｖ（Ｄ）Ｊ結合、重鎖クラススイッチ、及び体細胞突然変異を受けて抗原特異的ヒト免疫グロブリン（１）のレパートリーを生成する、機能性ヒト抗体導入遺伝子を含有する。軽鎖導入遺伝子は、部分的に、生殖系列ヒトＶκ遺伝子座のほぼ半分を含む酵母人工染色体クローンに由来する。いくつかのＶＨ遺伝子に加えて、重鎖（ＨＣ）導入遺伝子は、ヒトμ及びヒトγ１（２）、並びに／又はγ３定常領域の両方をコード化する。本明細書に記載されるモノクローナル抗体を生成するための免疫化及び融合プロセスにおいて、ＨＣｏ１２／ＫＣｏ５遺伝子型系統由来のマウスを使用した。

【０２１９】

ヒトＴＮＦαの精製。セファロース４Ｂ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）に連結されたＴＮＦα受容体－Ｆｃ融合タンパク質（ｐ５５－ｓｆ２）（５）を充填したカラムを使用して、アフィニティクロマトグラフィにより、ヒトＴＮＦαを、Ｃ２３７Ａ細胞からの組織培養上清から精製した。細胞上清を、その容量の９分の１の１０ｘＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ（Ｄ－ＰＢＳ）と混合し、４ｍＬ／分で４℃においてカラムを通過させた。次に、ＰＢＳでカラムを洗浄し、０．１Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ３．５でＴＮＦαを溶出し、２Ｍトリス塩酸、ｐＨ８．５で中和した。精製されたＴＮＦαは、１０ｍＭトリス、０．１２Ｍ塩化ナトリウム、ｐＨ７．５に緩衝剤交換され、０．２ｕｍのシリンジフィルタを通して濾過された。

【０２２０】

免疫化。約１６週齢の雌のＧｅｎＰｈａｒｍマウスを、０、１２及び２８日目に等量のＴｉｔｅｒｍａｘアジュバントで乳化した合計１００μｇのＴＮＦα（ロットＪＧ１０２２９８又はＪＧ１０２０９８）で、ＩＰ（２００μＬ）及びＩＤ（尾の付け根にて１００μＬ）により免疫化した。抗凝固薬なしで２１及び３５日目に眼窩後方穿刺によりマウスを出血させた。血液を室温で１時間凝固させ、血清を回収し、ＴＮＦα固相ＥＩＡアッセイを使用して滴定した。２８日目の注射後、マウスを７週間休ませた後に、ＧｅｎＴＮＶと命名された融合を行った。その後、ＴＮＦαに対して１：１６０の特定のヒトＩｇＧ力価を有するマウスに、１００μＬの生理学的生理食塩水で希釈した５０μｇのＴＮＦαの最終ＩＶブースター注射を与えた。３日後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を無菌的に除去し、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン及び０．２５μｇ／ｍＬのアンホテリシンＢ（ＰＳＡ）を含有する、１０ｍＬの冷リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中に浸漬した。ＰＳＡ－ＰＢＳで脾臓を無菌灌流することにより、脾細胞を採取した。細胞を冷ＰＳＡ－ＰＢＳ中で１回洗浄し、Ｃｏｕｌｔｅｒ計数器を使用して計数し、２５ｍＭヘペスを含有するＲＰＭＩ１６４０培地に再懸濁した。

【０２２１】

細胞株。Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（ＣＢＳ）グループは、９７年５月１４日に、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ’ｓ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔグループから非分泌マウス骨髄腫融合パートナー６５３を受け取った。細胞株を、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ（Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｌａｂｓ）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、０

．１ｍＭ　ＮＥＡＡ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（全てＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから）で補充したＲＰＭＩ培地（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で拡張し、９５％ＦＢＳ及び５％ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ）中で凍結保存した後、ＣＢＳの蒸気相液体窒素冷凍庫に保管した。細胞バンクは無菌であり（Ｑｕａｌｉｔｙ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｃｅｎｔｏｃｏｒ，Ｍａｌｖｅｒｎ）、マイコプラズマ（Ｂｉｏｎｉｑｕｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）がなかった。細胞は融合まで対数増殖期培養物内で維持された。融合前に、それらをＰＢＳ中で洗浄し、計数し、トリパンブルー染料排除により生存率を決定した（９５％超）。

【０２２２】

ヒトＴＮＦαは、組換え細胞株により生成され、Ｃ２３７Ａと命名され、ＣｅｎｔｏｃｏｒのＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙで生成された。細胞株を、５％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ（Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｌａｂｓ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（全てＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから）及び０．５：ｇ／ｍＬのマイコフェノール酸で補充したＩＭＤＭ培地（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で拡張し、９５％ＦＢＳ及び５％ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ）中で凍結保存した後、ＣＢＳ（１３）の蒸気相液体窒素冷凍庫に保管した。細胞バンクは無菌であり（Ｑｕａｌｉｔｙ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｃｅｎｔｏｃｏｒ，Ｍａｌｖｅｒｎ）、マイコプラズマ（Ｂｉｏｎｉｑｕｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）がなかった。

【０２２３】

細胞融合。細胞融合は、１：１の比率の６５３マウス骨髄腫細胞及びマウス生脾臓細胞を使用して行った。簡潔に、脾臓細胞及び骨髄腫細胞を一緒にペレット化した。３０秒間かけてペレットを３７℃でゆっくり１ｍＬの５０％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ／ＰＢＳ溶液（ＰＥＧ分子量１，４５０ｇ／モル、Ｓｉｇｍａ）に再懸濁した。１分かけて１０．５ｍＬのＲＰＭＩ培地（添加剤なし）（ＪＲＨ）（３７℃）をゆっくり添加することにより、融合を停止させた。融合細胞を５分間７５０ｒｐｍで遠心分離した。次いで、細胞をＨＡＴ培地（１０％ウシ胎児血清（ＪＲＨ）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０μｇ／ｍＬゲンタマイシン、２．５％Ｏｒｉｇｅｎ培養サプリメント（Ｆｉｓｈｅｒ）、５０μＭ２－メルカプトエタノール、１％６５３調整ＲＰＭＩ培地、１００μＭヒポキサンチン、０．４μＭアミノプテリン、及び１６μＭチミジンを含有するＲＰＭＩ／ＨＥＰＥＳ培地）に再懸濁した後、５つの９６ウェル平底組織培養プレートにおいて２００μＬ／ウェルで平板培養した。次に、７～１０日間、５％CO_2及び９５％空気を含有する加湿した３７℃のインキュベータにプレートを配置した。

【０２２４】

マウス血清におけるヒトＩｇＧ抗ＴＮＦα抗体の検出。固相ＥＩＡを使用して、ヒトＴＮＦαに特異的なヒトＩｇＧ抗体についてマウス血清をスクリーニングした。簡潔に、ＰＢＳ中１μｇ／ｍＬのＴＮＦαで一晩プレートをコーティングした。０．０２％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０を含有する０．１５Ｍ生理食塩水で洗浄した後、ウェルをＰＢＳ中１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ、２００μＬ／ウェルで、室温で１時間遮断した。プレートは、直ちに使用するか、又は後に使用するために－２０℃で凍結されるかのいずれかであった。マウス血清を、５０μＬ／ウェルで、室温で１時間、２倍階段希釈法で、ヒトＴＮＦαコーティングされたプレート上でインキュベートした。プレートを洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中に１：３０，０００で希釈したＦｃ特異的（Ａｃｃｕｒａｔｅ）の５０μＬ／ウェルのＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧで、室温において１時間プローブした。プレートを再度洗浄し、１００μＬ／ウェルのクエン酸塩－リン酸塩基質溶液（０．１Ｍクエン酸及び０．２Ｍリン酸ナトリウム、０．０１％H_2O_2及び１ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ）を１５分かけて室温で添加した。次いで、２５μＬ／ウェルで反応停止溶液（４Ｎ硫酸）を添加し、自動プレート分光光度計を使用して４９０ｎｍでＯＤを読み取った。

【０２２５】

ハイブリドーマ上清における完全ヒト免疫グロブリンの検出。ＧｅｎＰｈａｒｍマウスは、マウス及びヒト免疫グロブリン鎖の両方を生成することができるため、２つの別個の

ＥＩＡアッセイを使用して、ヒト軽鎖及びヒト重鎖の両方の存在について成長陽性ハイブリドーマクローンを試験した。プレートを上述のようにコーティングし、未希釈のハイブリドーマ上清を３７℃で１時間、プレート上でインキュベートした。プレートを洗浄し、３７℃で１時間、１％ＢＳＡ－ＨＢＳＳ中で１：１０，０００に希釈したＨＲＰ抱合ヤギ抗ヒトκ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）抗体、又は１％ＢＳＡ－ＨＢＳＳ中で１：３０，０００に希釈したＨＲＰ抱合ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体のいずれかでプローブした。次に、上述のように、プレートを基質溶液とともにインキュベートした。抗ヒトκ及び抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ　ＥＩＡ形式の両方で陽性シグナルをもたらさなかったハイブリドーマクローンは廃棄された。

【０２２６】

アイソタイプ。抗体のアイソタイプの決定は、特定の滴定に対するマウス免疫血清をスクリーニングするために使用されたものと類似の形式のＥＩＡを使用して達成した。４ＥＣで一晩、炭酸ナトリウム緩衝剤中１０：ｇ／ｍＬのヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）でＥＩＡプレートをコーティングし、上記のように遮断した。２４ウェル培養物からの純粋な上清を、室温で１時間、プレート上でインキュベートした。プレートを洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中に１：４０００で希釈したＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトIgG_1、IgG_2、IgG_3又はIgG_4（Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｓｉｔｅ）で、室温で１時間プローブした。プレートを再度洗浄し、上述のように基質溶液とともにインキュベートした。

【０２２７】

結果及び考察。完全ヒト抗ヒトＴＮＦαモノクローナル抗体の生成。組換えヒトＴＮＦαタンパク質で免疫化されたＧｅｎＰｈａｒｍマウスから、ＧｅｎＴＮＶと命名された融合を１回行った。この融合から、１９６の成長陽性ハイブリッドがスクリーニングされた。ヒトＴＮＦαと反応性の完全ヒトＩｇＧ抗体を分泌した８つのハイブリドーマ細胞株を特定した。これらの８つの細胞株はそれぞれ、ヒトＩｇＧ１κアイソタイプの免疫グロブリンを分泌し、限界希釈により全てを２回サブクローニングして、安定した細胞株を得た（９０％超均質）。細胞株名及びそれぞれのＣコード表記を表１に列挙する。細胞株の各々は、液体窒素中に保管された１２－バイアル研究細胞バンクにおいて凍結された。

【０２２８】

８つの細胞株のそれぞれの２４ウェル培養皿のウェルから回収した親細胞は、トランスフェクション及び更なる特徴付けのために、１９９９年２月１８日にＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙグループに引き渡された。

【０２２９】

【表３】

表１：ＧｅｎＴＮＶ細胞株表記

名称	Cコード表記
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

【０２３０】

結論。

ＧｅｎＴＮＶ融合は、Ｃｅｎｔｏｃｏｒで調製された組換えヒトＴＮＦαで免疫化されたヒト可変及び定常領域抗体導入遺伝子を含有するハイブリッドマウスからの脾細胞を利用して行われた。ＩｇＧ１κアイソタイプの８つの完全ヒトＴＮＦα反応性ＩｇＧモノクローナル抗体を生成した。更なる特徴付け及び開発のために、親細胞株をＭｏｌｅｃｕｌ

ａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙグループに移した。これらの新しいヒト抗体のうちの１つは、Ｒｅｍｉｃａｄｅと比較して、免疫原性及びアレルギー型合併症が減少する潜在的な利益を有して、抗炎症に有用である可能性がある。

【０２３１】

参考文献

【０２３２】

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

【０２３３】

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

【０２３４】

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

【０２３５】

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

【０２３６】

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

【０２３７】

実施例４：ヒト抗ＴＮＦα抗体を発現する細胞株のクローニング及び調製。

要約。ＴＮＶ表記の８つのヒトモノクローナル抗体（ｍＡｂ）のパネルは、明らかに高結合活性で固定化されたヒトＴＮＦαに結合することが認められた。８つのｍＡｂのうちの７つは、組換えＴＮＦ受容体へのヒトＴＮＦαの結合を効率的に遮断することを示した。７つのｍＡｂをコード化するＤＮＡの配列分析は、全てのｍＡｂがヒトＶ領域を有していることを確認した。ＤＮＡ配列は、３対のｍＡｂが互いに同一であり、そのため８つのｍＡｂの元のパネルがＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１９６で表される４つの別個のｍＡｂのみを含有していることも明らかにした。ｍＡｂの推定アミノ酸配列の分析及びインビトロＴＮＦα中和データの結果に基づいて、ｍＡｂ　ＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１４を更なる研究のために選択した。

【０２３８】

ＴＮＶ１４８重鎖の位置７５（フレームワーク３）のプロリン残基がデータベース検索中同じサブグループの他のヒト抗体のその位置に見られなかったため、それを既知の生殖系列フレームワークｅ配列と一致させるために、部位特異的ＤＮＡ突然変異誘発を行って、その位置にセリン残基をコード化した。セリン修飾ｍＡｂはＴＮＶ１４８Ｂと表記された。ＴＮＶ１４８Ｂ及びＴＮＶ１４の重鎖及び軽鎖可変領域をコード化するＰＣＲ増幅ＤＮＡを、別のヒトｍＡｂ（１２Ｂ７５）の最近クローニングされた重鎖及び軽鎖遺伝子に基づいた（国際公開第０２／１２５００号として公開された、ＩＬ－１２Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅｓと題される、２０００年１０月７日出願の米国特許出願第６０／２３６，８２７号、参照により全体が本明細書に組み込まれる）、新しく調製した発現ベクター内にクローニングした。

【０２３９】

Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３（６５３）細胞又はＳｐ２／０－Ａｇ１４（Ｓｐ２／０）マウス骨髄腫細胞を、それぞれの重鎖及び軽鎖発現プラスミドでトランスフェクトし、高レベルの組換えＴＮＶ１４８Ｂ及びＴＮＶ１４（ｒＴＮＶ１４８Ｂ及びｒＴＮＶ１４）ｍＡｂを生成する細胞株について２回のサブクローニングによりスクリーニングした。経時的なｍＡｂ生成の成長曲線及び安定性の評価は、６５３トランスフェクタントクローンＣ４６６Ｄ及びＣ４６６Ｃが使用済培養物において安定して約１２５：ｇ／ｍｌのｒＴＮＶ１４８Ｂ　ｍＡｂを生成し、一方Ｓｐ２／０トランスフェクタント１．７３－１２－１２２

（Ｃ４６７Ａ）が使用済培養物において安定して約２５：ｇ／ｍｌのｒＴＮＶ１４８ＢｍＡｂを生成したことを示した。同様の分析が、Ｓｐ２／０トランスフェクタントクローンＣ４７６Ａが使用済培養物において１８：ｇ／ｍｌのｒＴＮＶ１４を生成したことを示した。

【０２４０】

序論。ヒトＴＮＦα免疫化ＧｅｎＰｈａｒｍ／Ｍｅｄａｒｅｘマウス（ＨＣｏ１２／ＫＣｏ５遺伝子型）由来の８つのｍＡｂのパネルは、ヒトＴＮＦαに結合しかつ完全ヒトＩｇＧ１κアイソタイプを有することを前に示した。単純な結合アッセイを使用して、ＴＮＦαが組換えＴＮＦ受容体に結合するのを遮断する能力を評価することにより、本発明の例示的なｍＡｂがＴＮＦα中和活性を有する可能性があるかどうかを決定した。これらの結果、ＤＮＡ配列結果、及びｍＡｂのいくつかのインビトロ特徴付けに基づいて、更に特徴付けされるｍＡｂとしてＴＮＶ１４８が選択された。

【０２４１】

ＴＮＶ１４８ｍＡｂをコード化するＤＮＡ配列をクローニングし、好適な定常領域をコード化する遺伝子発現ベクター内に合うように修飾し、十分に特徴付けされた６５３及びＳｐ２／０マウス骨髄腫細胞内に導入し、結果として得られたトランスフェクトされた細胞株を、元のハイブリドーマ細胞株の４０倍のｍＡｂを生成するサブクローンが特定されるまでスクリーニングした。

【０２４２】

材料及び方法。

試薬及び細胞。ＴＲＩＺＯＬ試薬はＧｉｂｃｏ ＢＲＬから購入した。プロテイナーゼＫはＳｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙから得た。逆転写酵素はＬｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．から得た。Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼはＰｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ又はＧｉｂｃｏ ＢＲＬのいずれかから得た。制限酵素はＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓから購入した。ＱＩＡ ｑｕｉｃｋ ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ＫｉｔはＱｉａｇｅｎから得た。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ＫｉｔはＳｔｒａｔａｇｅｎｅから購入した。Ｗｉｚａｒｄプラスミドミニプレップキット及びＲＮａｓｉｎはＰｒｏｍｅｇａからであった。ＯｐｔｉｐｌａｔｅｓはＰａｃｋａｒｄから得た。^{125}ＩｏｄｉｎｅはＡｍｅｒｓｈａｍから購入した。カスタムオリゴヌクレオチドはＫｅｙｓｔｏｎｅ／Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌから購入した。この作業で使用したオリゴヌクレオチドの名称、識別番号、及び配列を表２に示す。

【０２４３】

表２．ＴＮＶ ｍＡｂ遺伝子をクローニング、工学処理、又は配列決定するために使用されたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド５’１４ｓ及びＨｕＨ－Ｊ６によりコード化されるアミノ酸を配列の上に示す。「Ｍ」アミノ酸残基は翻訳開始コドンを表す。オリゴヌクレオチド５’１４ｓ及びＨｕＨ－Ｊ６の下線付き配列は、それぞれ、ＢｓｉＷＩ及びＢｓｔＢＩ制限部位を示す。ＨｕＨ－Ｊ６の斜線はエクソン／イントロン境界に対応する。配列がマイナス鎖に対応するオリゴヌクレオチドは、３’－５’配向で書かれていることに留意する。

【０２４４】

【表４】

名称	I. D.	配列
HG1－4b	119	3’－TTGGTCCAGTCGGACTGG－5’（配列番号10）
HG1－5b	354	3’－CACCTGCACTCGGTGCTT－5’（配列番号11）
HG1hg	360	3’－CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT－5’（配列番号12）
HG1－6	35	3’－GCCGCACGTGTGGAAGGG－5’（配列番号13）
HCK1－3E	117	3’－AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT－5’（配列番号14）
HuK－3’Hd	208	3’－GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT－5’（配列番号15）
HVKRNAseq	34	3’－GGCGGTAGACTACTCGTC－5’（配列番号16）
BsiWI		M D W T W S I（配列番号17）
5’14s	366	5－TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC－3’（配列番号18）
5’46s	367	5’－TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG－3’（配列番号19）
5’47s	368	5’－TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG－3’（配列番号20）
5’63s	369	5’－TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC－3’（配列番号21）
5’73s	370	5’－TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC－3’（配列番号22）
T V T V S S		BstBI（配列番号23）
HuH－J6	388	3’GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT－5’（配列番号24）
SalI		M D M R V（配列番号25）
LK7s	362	5’－TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC（TC）C－3’（配列番号26）
LVgs	363	5’－TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC－3’（配列番号27）
T K V D I K（配列番号28）AfI2		
HuL－J3	380	
3’CTGGTTTCACCTATAGTTTG／CATTCAGAATTCGGCGCCTTT（配列番号29）		
V148－QC1	399	5’－CATCTCCAGAGACAATtCCAAGAACACGCTGTATC－3’（配列番号30）
V148－QC2	400	3’－GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG－5’（配列番号31）

【０２４５】

６５３マウス骨髄腫細胞の凍結バイアルを１つ得た。バイアルをその日に解凍し、Ｔフラスコ中のＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、及び２ｍＭグルタミン（培地）中で拡張させた。これらの細胞は、本明細書に記載される抗ＴＮＦ　ＤＮＡで２～３週間後にトランスフェクトされるまで、連続培養において維持された。解凍した５日後に培養物のいくつかを採取し、遠心分離によりペレット化し、９５％ＦＢＳ、５％ＤＭＳＯに再懸濁し、３０のバイアルに等分し、凍結し、後に使用するために保管した。同様に、Ｓｐ２／０マウス骨髄腫細胞の凍結バイアルを１つ得た。バイアルを解凍し、上述のように新しい凍結物（freeze-down）を調製し、凍結バイアルをＣＢＣの冷凍庫ボックスＡＡ及びＡＢ内で保管した。これらの細胞を解凍し、本明細書に記載される全てのＳｐ２／０トランスフェクションに使用した。

【０２４６】

受容体へのＴＮＦの結合の阻害のためのアッセイ。ＴＮＶ　ｍＡｂを含有するハイブリドーマ細胞上清を使用して、ｍＡｂが組換えＴＮＦ受容体融合タンパク質ｐ５５－ｓｆ２への^{125}Ｉ標識ＴＮＦαの結合を遮断する能力についてアッセイした（Ｓｃａｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｃｙｔｏｋｉｎｅ７：７５９－７７０）。３７℃で１時間イ

ンキュベートする間に、ＰＢＳ中０．５：ｇ／ｍＬで５０：ｌのｐ５５－ｓｆ２をＯｐｔｉｐｌａｔｅに添加してウェルをコーティングした。ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡを希釈剤として使用して、８つのＴＮＶ細胞上清の系列希釈を、９６ウェル丸底プレートにおいて調製した。抗ＩＬ－１８ｍＡｂを含有する細胞上清が陰性対照として含まれ、ｃＡ２（抗ＴＮＦキメラ抗体、Ｒｅｍｉｃａｄｅ、米国特許第５，７７０，１９８号、参照により全体が本明細書に組み込まれる）でスパイクされた同じ抗ＩＬ－１８上清が陽性対照として含まれた。最終ＴＮＦα濃度が５ｎｇ／ｍｌとなるように、^{125}Ｉ標識ＴＮＦα（５８：Ｃｉ／：ｇ，Ｄ．Ｓｈｅａｌｙ）を１００：ｌの細胞上清に添加した。混合物を室温で１時間プレインキュベートした。コーティングされたＯｐｔｉｐｌａｔｅｓを洗浄して未結合のｐ５５－ｓｆ２を除去し、５０：ｌの^{125}Ｉ－ＴＮＦα／細胞上清混合物をＯｐｔｉｐｌａｔｅｓに移した。室温で２時間後、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで３回、Ｏｐｔｉｐｌａｔｅｓを洗浄した。１００：ｌのＭｉｃｒｏｓｃｉｎｔ－２０を添加し、ＴｏｐＣｏｕｎｔ γ計数器を使用して結合したｃｐｍを決定した。

【０２４７】

Ｖ遺伝子の増幅及びＤＮＡ配列分析。ＲＮＡの調製のために、ハイブリドーマ細胞をＰＢＳで１回洗浄した後にＴＲＩＺＯＬ試薬を添加した。7×10^{6}～1.7×10^{7}の細胞を１ｍｌのＴＲＩＺＯＬに再懸濁した。２００μｌのクロロホルムの添加後に管を激しく振った。試料を４℃で１０分間遠心分離した。水相を新しいｍｉｃｒｏｆｕｇｅ管に移し、等量のイソプロパノールを添加した。管を激しく振り、室温で１０分間インキュベートした。次に、試料を４℃で１０分間遠心分離した。ペレットを１ｍｌの７０％エタノールで１回洗浄し、真空乾燥機で短時間乾燥させた。ＲＮＡペレットを４０μｌのＤＥＰＣ処理水で再懸濁した。ＲＮＡ調製物の品質は、１％アガロースゲル中で０．５μｌを分画することによって決定された。使用するまで、ＲＮＡを－８０℃の冷凍庫に保管した。

【０２４８】

重鎖及び軽鎖のｃＤＮＡを調製するために、１１．５μｌの容量に３μｌのＲＮＡ及び１μｇのオリゴヌクレオチド１１９（重鎖）又はオリゴヌクレオチド１１７（軽鎖）のいずれか（表１を参照のこと）を含む混合物を調製した。この混合物を水浴中で７０℃で１０分間インキュベートした後、氷上で１０分間冷却した。２．５μｌの１０×逆転写酵素緩衝剤、１０μｌの２．５ｍＭ ｄＮＴＰ、１μｌの逆転写酵素（２０単位）、及び０．４μｌのリボヌクレアーゼ阻害剤ＲＮａｓｉｎ（１単位）から構成される別個の混合物を調製した。１３．５μｌのこの混合物を、１１．５μｌの冷ＲＮＡ／オリゴヌクレオチド混合物に添加し、反応物を４２℃で４０分間インキュベートした。その後、使用するまでｃＤＮＡ合成反応物を－２０℃の冷凍庫に保管した。

【０２４９】

未精製の重鎖及び軽鎖のｃＤＮＡをテンプレートとして使用して、可変領域コード配列をＰＣＲ増幅した。重鎖ＤＮＡの増幅をプライムする能力について、５つのオリゴヌクレオチド対（３６６／３５４、３６７／３５４、３６８／３５４、３６９／３５４、及び３７０／３５４、表１）を同時に試験した。軽鎖ＤＮＡの増幅をプライムする能力について、２つのオリゴヌクレオチド対（３６２／２０８及び３６３／２０８）を同時に試験した。総容量５０μｌにおいて２単位のＰＬＡＴＩＮＵＭ（商標）高忠実度（ＨＩＦＩ）Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼを使用して、ＰＣＲ反応を行った。各反応物は、２μｌのｃＤＮＡ反応物、１０ピコモルの各オリゴヌクレオチド、０．２ｍＭのｄＮＴＰ、５μｌの１０ＸＨＩＦＩ緩衝剤、及び２ｍＭの硫酸マグネシウムを含んでいた。熱サイクラープログラムは、９５℃で５分間、続いて（９４℃で３０秒間、６２℃で３０秒間、６８℃で１．５分間）を３０サイクルであった。その後、６８℃で１０分間の最終インキュベーションが行われた。

【０２５０】

直接ＤＮＡ配列決定のためのＰＣＲ生成物を調製するために、製造業者のプロトコルに従い、ＱＩＡｑｕｉｃｋ（商標）ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔを使用してそれらを精製した。５０μｌの滅菌水を使用してスピンカラムからＤＮＡを溶出させた後

、真空乾燥機を使用して１０μｌの容量まで乾燥させた。次に、総容量２０μｌの、１μｌの精製されたＰＣＲ生成物、１０μＭオリゴヌクレオチドプライマー、４μｌのＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ｒｅａｄｙ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ｍｉｘ、及び１４μｌの滅菌水でＤＮＡ配列決定反応物を設定した。オリゴヌクレオチド対３６７／３５４で作製された重鎖ＰＣＲ生成物は、オリゴヌクレオチドプライマー１５９及び３６０を用いて配列決定された。オリゴヌクレオチド対３６３／２０８で作製された軽鎖ＰＣＲ生成物は、オリゴヌクレオチド３４及び１６３を用いて配列決定された。配列決定の熱サイクラープログラムは、２５サイクルの（９６℃で３０秒間、５０℃で１５秒間、６０℃で４分間）、続いて４℃で一晩であった。反応生成物は、ポリアクリルアミドゲルを介して分画され、ＡＢＩ３７７ＤＮＡシーケンサを使用して検出された。

【０２５１】

アミノ酸を変更するための部位特異的変異誘発。ＴＮＶ１４８ｍＡｂにおいてＰｒｏ^{75}をセリン残基に置き換えるために、ＴＮＶ１４８重鎖可変領域ＤＮＡ配列の単一ヌクレオチドを変更した。相補的オリゴヌクレオチド３９９及び４００（表１）を設計し、製造業者により説明されるように、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（商標）部位特異的突然変異誘発法を使用して、この変更を起こさせた。１５％ポリアクリルアミドゲルにより２つのオリゴヌクレオチドを最初に分画し、主要バンドを精製した。１０ｎｇ又は５０ｎｇのいずれかのＴＮＶ１４８重鎖プラスミドテンプレート（ｐ１７５３）、５μｌの１０Ｘ反応緩衝剤、１μｌのｄＮＴＰミックス、１２５ｎｇのプライマー３９９、１２５ｎｇのプライマー４００及び１μｌのＰｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼを使用して、突然変異誘発反応物を調製した。滅菌水を添加して、総容量を５０μｌにした。次に、９５℃で３０秒間、その後、９５℃で３０秒間、５５℃で１分間、６４℃で１分間、そして６８℃で７分間のサイクルを１４回繰り返し、続いて３０℃で２分間（１サイクル）インキュベートするようにプログラムされた熱サイクラーにおいて、反応ミックスをインキュベートした。これらの反応物は、変異原性オリゴヌクレオチドを、他の点では同一の新しく合成されたプラスミドに組み込むように設計された。元のＴＮＶ１４８プラスミドを除去するために、元のメチル化プラスミドのみを切断する１μｌのＤｐｎＩエンドヌクレアーゼを添加した後、試料を３７℃で１時間インキュベートした。次に、１μｌの反応物を使用して、標準的な熱ショック方法によりＥｐｉｃｕｒｉａｎ　Ｃｏｌｉ　ＸＬ１－Ｂｌｕｅスーパーコンピテント大腸菌を形質転換し、ＬＢ－アンピシリン寒天プレート上で平板培養した後に形質転換された細菌を特定した。製造業者により説明されるＷｉｚａｒｄ（商標）キットを使用して、プラスミドミニプレップを調製した。Ｗｉｚａｒｄ（商標）カラムから試料を溶出した後、エタノールでプラスミドＤＮＡを沈殿させてプラスミドＤＮＡを更に精製し、その後２０μｌの滅菌水に再懸濁した。次に、ＤＮＡ配列分析を行って、所望の塩基変更を有するプラスミドクローンを特定し、他の塩基変更が不注意にＴＮＶ１４８コード配列内に導入されなかったことを確認した。セクション４．３に記載される同じパラメータを使用して、１μｌのプラスミドを、３μｌのＢｉｇＤｙｅミックス、１μｌのｐＵＣ１９フォワードプライマー、及び１０μｌの滅菌水で調製されたサイクル配列決定反応物に供した。

【０２５２】

１２Ｂ７５遺伝子からの発現ベクターの構築。いくつかの組換えＤＮＡ工程を行って、前にクローニングされた１２Ｂ７５コード重鎖及び軽鎖遺伝子のゲノムコピーから、それぞれ、新しいヒトＩｇＧ１発現ベクター及び新しいヒトκ発現ベクターを調製した（これは、国際公開第０２／１２５００号として公開された、ＩＬ－１２Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅｓと題される、２０００年１０月７日出願の米国特許出願第６０／２３６，８２７号に開示され、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。最終ベクターは、任意の適切に設計されたＰＣＲ増幅可変領域で、既存の可変領域配列の簡単な一工程置換を可能にするように設計された。

【０２５３】

プラスミドｐ１５６０の１２Ｂ７５重鎖遺伝子を修飾するために、プロモータ及び可変領域を含有する６．８５ｋｂのＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ断片をｐ１５６０からｐＵＣ

１９に移してｐ１７４３を作製した。ｐ１５６０と比較してサイズがより小さいこのプラスミドは、製造業者のプロトコルに従い、翻訳開始部位のすぐ上流に固有のＢｓｉＷＩクローニング部位を導入するための、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（商標）突然変異誘発の使用（オリゴヌクレオチドＢｓｉＷＩ－１及びＢｓｉＷＩ－２を使用する）を可能にした。結果として得られたプラスミドはｐ１７４７と呼ばれた。ＢｓｔＢＩ部位を可変領域の３’端に導入するために、５’オリゴヌクレオチドプライマーはＳａｌＩ及びＢｓｔＢＩ部位で設計された。このプライマーをｐＵＣリバースプライマーとともに使用してｐ１７４７から２．７５ｋｂの断片を増幅した。次に、この断片を１２Ｂ７５可変領域の自然に生じるＳａｌＩ部位及びＨｉｎｄＩＩＩ部位にクローニングして戻し、それにより固有のＢｓｔＢ１部位を導入した。ｐ１７５０と表記される結果として得られた中間ベクターは、ＢｓｉＷＩ及びＢｓｔＢＩ端を有する可変領域断片を受容することができた。定常領域も１２Ｂ７５遺伝子に由来する重鎖ベクターのバージョンを調製するために、ｐ１７５０のＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄＩＩＩインサートは、ＨｉｎｄＩＩＩ部位の下流にＥｃｏＲＩ部位を有するためにｐＢＲ３２２に移された。次に、結果として得られたプラスミドｐ１７６８を、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＥｃｏＲＩで消化し、ｐ１５６０からｐＢＣに大きなＢａｍＨＩ－ＢａｍＨＩ断片をクローニングすることによって得られたサブクローンであるｐ１７４４からの５．７ｋｂのＨｉｎｄＩＩＩ　ＥｃｏＲＩ断片にライゲートした。次に、結果として得られたプラスミドｐ１７８４は、ＢｓｉＷＩ及びＢｓｔＢＩ端を有するＴＮＶ　ＡｂｃＤＮＡ断片のベクターとして使用された。追加の作業は、１２Ｂ７５遺伝子からのＩｇＧ１定常領域を含み、１２Ｂ７５重鎖Ｊ－Ｃイントロンをどの程度含有するかによって互いに異なる、発現ベクターｐ１７８８及びｐ１７９８を調製するために行われた。

【０２５４】

プラスミドｐ１５５８の１２Ｂ７５軽鎖遺伝子を修飾するために、１２Ｂ７５プロモータ及び可変領域を含有する５．７ｋｂのＳａｌＩ／ＡｆｌＩＩ断片を、ｐ１５５８からプラスミドＬ２８のＸｈｏＩ／ＡｆｌＩＩ部位に移した。この新しいプラスミドｐ１７４５は、突然変異誘発工程のためのより小さなテンプレートを提供した。オリゴヌクレオチド（Ｃ３４０ｓａｌＩ及びＣ３４０ｓａｌ２）を使用して、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（商標）突然変異誘発により、可変領域の５’端に固有のＳａｌＩ制限部位を導入した。結果として得られた中間ベクターｐ１７４６は、可変領域断片がクローニングされ得る固有のＳａｌＩ及びＡｆｌＩＩ制限部位を有していた。ｐ１７４６にクローニングされた任意の可変領域断片は、軽鎖遺伝子の３’半分と結合されることが好ましいであろう。この目的のために使用され得る１２Ｂ７５軽鎖遺伝子の３’半分からの制限断片を調製するために、オリゴヌクレオチドＢＡＨＮ－１及びＢＡＨＮ－２を互いにアニールして、制限部位ＢｓｉＷ１、ＡｆｌＩＩ、ＨｉｎｄＩＩ、及びＮｏｔＩを含有し、ＫｐｎＩ及びＳａｃＩ部位にライゲートされ得る端部を含有する二本鎖リンカーを形成した。このリンカーをｐＢＣのＫｐｎＩ部位とＳａｃＩ部位との間にクローニングして、プラスミドｐ１７５７を得た。ｐ１５５８をＡｆｌＩＩで消化した後、ＨｉｎｄＩＩＩで部分的に消化することにより生成された、１２Ｂ７５軽鎖定常領域を含有する７．１ｋｂの断片を、ｐ１７５７のＡｆｌＩＩ部位とＨｉｎｄＩＩ部位との間にクローニングしてｐ１７６２を得た。この新しいプラスミドは、遺伝子の２つの半分をつなぐ、プロモータ及び可変領域を含有するＢｓｉＷＩ／ＡｆｌＩＩ断片が移され得るＢｓｉＷＩ及びＡｆｌＩＩの固有の部位を含有していた。

【０２５５】

発現プラスミドのｃＤＮＡクローニング及びアセンブリ。ＤＮＡ端部を更に埋めるために、全てのＲＴ－ＰＣＲ反応物（上記を参照のこと）をＫｌｅｎｏｗ酵素で処理した。重鎖ＰＣＲ断片を制限酵素ＢｓｉＷＩ及びＢｓｔＢＩで消化した後、プラスミドＬ２８（１２Ｂ７５系中間ベクターｐ１７５０はまだ調製されていなかったため、Ｌ２８を使用した）のＢｓｉＷＩ部位とＢｓｔＢＩ部位との間にクローニングした。クローニングされたインサートのＤＮＡ配列分析は、結果として得られたコンストラクトが正しく、ＰＣＲ増幅中に誤差が導入されなかったことを示した。これらのＬ２８プラスミドコンストラクト（

ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、ＴＮＶ１４８Ｂ、及びＴＮＶ１９６）に割り当てられた識別番号を表３に示す。

【０２５６】

ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１４８Ｂ重鎖のＢｓｉＷＩ／ＢｓｔＢＩインサートは、Ｌ２８ベクターから新しく調製された中間ベクターｐ１７５０に移された。これらの中間プラスミドに割り当てられた識別番号を表２に示す。このクローニング工程及び後続の工程は、ＴＮＶ１５及びＴＮＶ１９６には行われなかった。次に、可変領域は、２つの異なるヒトＩｇＧ１発現ベクター内に移された。制限酵素ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄＩＩＩを使用して、可変領域を、Ｃｅｎｔｏｃｏｒの以前使用されたＩｇＧ１ベクターｐ１０４内に移した。Ｇｍ（ｆ＋）アロタイプのＩｇＧ１をコード化する、結果として得られた発現プラスミドは、ｐ１７８１（ＴＮＶ１４）、ｐ１７８２（ＴＮＶ１４８）、及びｐ１７８３（ＴＮＶ１４８Ｂ）と表記された（表２を参照のこと）。可変領域はまた、１２Ｂ７５（ＧｅｎＰｈａｒｍ）遺伝子に由来するＩｇＧ１定常領域の上流にもクローニングされた。Ｇ１ｍ（ｚ）アロタイプのＩｇＧ１をコード化するこれらの発現プラスミドも表３に列記される。

【０２５７】

表３．様々な重鎖及び軽鎖プラスミドのプラスミド識別番号。

Ｌ２８ベクター又はｐＢＣベクターは、初期のＡｂ　ｃＤＮＡクローンを表す。これらのプラスミドのインサートは、中間プラスミドを作製するために不完全な１２Ｂ７５系ベクターに移された。１つの追加の移動工程により、線形化された後に細胞に導入されたか、又は細胞のトランスフェクション前にｍＡｂ遺伝子インサートを精製するために使用されたかのいずれかであった最終発現プラスミドがもたらされた。ＮＤ＝実施せず。

【０２５８】

【表５】

Gm(f+)		G1m(z)			
128ベクター		中	発現	発現	
Mab		プラスミドID	プラスミドID	プラスミドID	プラスミドID
重鎖					
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ベクター		中	発現		
プラスミドID		プラスミドID	プラスミドID		
軽鎖					
TNV14		p1748		p1755	p1775
TNV15		p1748		p1755	p1775
TNV148		p1749		p1756	p1776
TNV196		p1749		p1756	p1776

【０２５９】

軽鎖ＰＣＲ生成物を制限酵素ＳａｌＩ及びＳａｃＩＩで消化した後、プラスミドｐＢＣのＳａｌＩ部位とＳａｃＩＩ部位との間にクローニングした。１つのアミノ酸で異なる２つの異なる軽鎖バージョンは、ｐ１７４８及びｐ１７４９と表記された（表２）。ＤＮＡ配列分析により、これらのコンストラクトが正しい配列を有することが確認された。次に、ｐ１７４８及びｐ１７４９のＳａｌＩ／ＡｆｌＩＩ断片を、中間ベクターｐ１７４６のＳａｌＩ部位とＡｆｌＩＩ部位との間にクローニングして、それぞれｐ１７５５及びｐ１

７５６を作製した。次に、軽鎖遺伝子のこれらの５’等分を、ＢｓｉＷＩ／ＡｆｌＩＩ断片をｐ１７５５及びｐ１７５６から新しく調製されたコンストラクトｐ１７６２に移すことにより遺伝子の３’等分に結合し、それぞれ最終発現プラスミドｐ１７７５及びｐ１７７６を作製した（表２）。

【０２６０】

細胞のトランスフェクション、スクリーニング及びサブクローニング。合計１５のマウス骨髄腫細胞のトランスフェクションを様々なＴＮＶ発現プラスミドで行った（結果及び考察セクションの表３を参照のこと）。これらのトランスフェクションは、（１）宿主細胞がＳｐ２／０又は６５３であるか、（２）重鎖定常領域がＣｅｎｔｏｃｏｒの以前のＩｇＧ１ベクター又は１２Ｂ７５重鎖定常領域でコード化されたか、（３）ｍＡｂがＴＮＶ１４８Ｂ、ＴＮＶ１４８、ＴＮＶ１４、又は新しいＨＣ／ＬＣの組み合わせであったか、（４）ＤＮＡが、線形化プラスミド又は精製されたＡｂ遺伝子インサートであるかどうか、及び（５）重鎖遺伝子における完全なＪ－Ｃイントロン配列が存在又は不在であるかどうかにより区別された。加えて、トランスフェクションのいくつかは、多数のクローンをスクリーニングすることができる可能性を増大させるために繰り返された。

【０２６１】

Ｓｐ２／０細胞及び６５３細胞は各々、前に記載された標準条件下で（Ｋｎｉｇｈｔ ＤＭ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３０：１４４３－１４５３）、エレクトロポレーションにより重鎖及び軽鎖ＤＮＡ（それぞれ８～１２：ｇ）の混合物でトランスフェクトされた。トランスフェクション番号１、２、３、及び１６に関して、トランスフェクション前に制限酵素で消化することにより、適切な発現プラスミドが線形化された。例えば、ＳａｌＩ及びＮｏｔＩ制限酵素は、それぞれＴＮＶ１４８Ｂ重鎖プラスミドｐ１７８３及び軽鎖プラスミドｐ１７７６を線形化するために使用された。残りのトランスフェクションに関して、ＢａｍＨＩで重鎖プラスミドを、そしてＢｓｉＷＩ及びＮｏｔＩで軽鎖プラスミドを消化することにより、ｍＡｂ遺伝子のみを含有するＤＮＡインサートをプラスミドベクターから分離した。次に、アガロースゲル電気泳動及びＱｉｅｘ精製樹脂により、ｍＡｂ遺伝子インサートを精製した。精製された遺伝子インサートでトランスフェクトされた細胞は、選択マーカー源として、３～５：ｇのＰｓｔＩ線形化ｐＳＶ２ｇｐｔプラスミド（ｐ１３）で同時にトランスフェクトされた。エレクトロポレーション後に、９６ウェル組織培養皿中のＩＭＤＭ、１５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン中に細胞を播種し、５％CO_2のインキュベータにおいて３７℃でインキュベートした。２日後、等量のＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン、２Ｘ ＭＨＸ選択物（１Ｘ ＭＨＸ＝０．５：ｇ／ｍｌのマイコフェノール酸、２．５：ｇ／ｍｌのヒポキサンチン、５０：ｇ／ｍｌのキサンチン）を添加し、コロニーが形成される間、更に２～３週間プレートをインキュベートした。

【０２６２】

コロニーを有するウェルから回収された細胞上清を、記載されるようにＥＬＩＳＡによりヒトＩｇＧについてアッセイした。簡潔に言うと、ポリクローナルヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ断片でコーティングされた９６ウェルＥＩＡプレート内で、様々な希釈の細胞上清をインキュベートした後、アルカリホスファターゼ抱合ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）及び適切な色基質を使用して結合ヒトＩｇＧを検出した。細胞上清において測定された同じ精製されたｍＡｂを標準として使用した標準曲線は、上清中のヒトＩｇＧの定量化を可能にするために各ＥＩＡプレートに含まれた。最もヒトＩｇＧを生成しているように見えたそれらのコロニー中の細胞を、使用済培養物における更なる生成判断のために２４ウェルプレート内に継代し、生成が最も高い親クローンを特定した。

【０２６３】

生成が最も高い親クローンをサブクローニングして、生成がより高いサブクローンを特定し、より均質な細胞株を調製した。９６ウェル組織培養プレートに、ＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン、１Ｘ ＭＨＸの、ウェルあたり１つの細胞又はウェルあたり４つの細胞を播種し、コロニーが現れるまで、１２～２０日間、５％CO_2インキュベータ

において３７℃でインキュベートした。ウェルあたり１つのコロニーを含有するウェルから細胞上清を回収し、上述のようにＥＬＩＳＡにより分析した。選択したコロニーを２４ウェルプレートに継代し、培養物を消耗させた後、それらの上清におけるヒトＩｇＧレベルを定量化することにより、生成が最も高いサブクローンを特定した。このプロセスは、選択された初回のサブクローンを２回目のサブクローニングに供したときに繰り返された。２回目の最良のサブクローンを開発の細胞株として選択した。

【０２６４】

細胞サブクローンの特徴付け。２回目の最良のサブクローンを選択し、成長曲線を行って、ｍＡｂの生成レベル及び細胞成長特徴を評価した。Ｔ７５フラスコに、３０ｍｌのＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン、及び１Ｘ　ＭＨＸ（又は無血清培地）中１×１０^{5}細胞／ｍｌで播種した。３００μｌのアリコートを２４時間間隔で取り出し、生細胞密度を測定した。生細胞数が１×１０^{5}細胞／ｍｌ未満になるまで分析を継続した。回収された細胞上清のアリコートは、存在する抗体の濃度についてアッセイされた。標準としてｒＴＮＶ１４８Ｂ又はｒＴＮＶ１４ＪＧ９２３９９を使用して、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。ポリクローナルヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃでコーティングされ　ＥＬＩＳＡプレート上で試料を１時間インキュベートし、結合ｍＡｂを、１：１０００希釈のアルカリホスファターゼ抱合ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）で検出した。

【０２６５】

様々な量のＭＨＸ選択物の存在下での成長速度を比較する目的のため、２つの細胞株について異なる成長曲線分析も行われた。細胞株Ｃ４６６Ａ及びＣ４６６Ｂを、無ＭＨＸ培地（ＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン）に解凍し、更に２日間培養した。その後、両細胞培養物を、ＭＨＸなし、０．２Ｘ　ＭＨＸ、又は１Ｘ　ＭＨＸ（１Ｘ　ＭＨＸ＝０．５：ｇ／ｍｌのマイコフェノール酸、２．５：ｇ／ｍｌのヒポキサンチン、５０：ｇ／ｍｌのキサンチン）のいずれかを含有する３つの培養物に分けた。１日後、新しいＴ７５フラスコに、１×１０^{5}細胞／ｍｌの開始密度で培養物を播種し、細胞を１週間、２４時間間隔で計数した。ｍＡｂ生成のためのアリコートは回収されなかった。ＳＯＰ　ＰＤ３２．０２５に提供される式を使用して、これらの試料についての倍加時間を算出した。

【０２６６】

経時的なｍＡｂ生成の安定性を評価するために、追加の研究が行われた。ＭＨＸ選択物を有する、又は有さないのいずれかで、２４ウェルプレート中のＩＭＤＭ、５％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン中で培養物を成長させた。培養物がコンフルエントになったら、新しい培養物に分割し、その後、古い培養物は消耗させた。この時に、上清のアリコートを取り出し、４℃で保管した。５５～７８日の期間にわたって、アリコートを取り出した。この期間の終了時に、上に概説するように、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ　ＥＬＩＳＡにより、存在する抗体の量について上清を試験した。

【０２６７】

結果及び考察。

組換え受容体へのＴＮＦ結合の阻害。

ハイブリドーマ細胞上清に含有される８つのＴＮＶ　ｍＡｂが、受容体へのＴＮＦα結合を阻害することができるかどうかを決定するために、簡単な結合アッセイが行われた。ヒトＩｇＧの標準ＥＬＩＳＡ分析により、それぞれの細胞上清におけるＴＮＶ　ｍＡｂの濃度を最初に決定した。次に、組換えｐ５５ＴＮＦ受容体／ＩｇＧ融合タンパク質ｐ５５－ｓｆ２をＥＩＡプレート上にコーティングし、様々な量のＴＮＶ　ｍＡｂの存在下で、^{125}Ｉ標識ＴＮＦαをｐ５５受容体に結合させた。図１に示すように、８つのＴＮＶ　ｍＡｂのうちの１つ（ＴＮＶ１２２）を除く全てが、ｐ５５受容体へのＴＮＦαの結合を効率的に遮断した。実際、ＴＮＶ　ｍＡｂは、陰性対照ハイブリドーマ上清にスパイクされたｃＡ２陽性対照ｍＡｂよりもＴＮＦα結合を阻害するのにより有効であるように見えた。これらの結果は、ＴＮＶ　ｍＡｂが細胞系アッセイ及びインビボでＴＮＦαの生物活性を遮断するであろう可能性が高く、したがって、追加の分析が必要であることを示すと解釈された。

【０２６８】
ＤＮＡ配列の分析。
ＲＮＡがヒトｍＡｂをコード化することの確認。
受容体結合アッセイにおいてＴＮＦα遮断活性を示した７つのＴＮＶ　ｍＡｂ（ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ３２、ＴＮＶ８６、ＴＮＶ１１８、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１９６）を特徴付ける際の最初の工程として、これらのｍＡｂを生成する７つのハイブリドーマ細胞株から全ＲＮＡを単離した。次に、各ＲＮＡ試料を使用して、各ｍＡｂの完全なシグナル配列、完全な可変領域配列、及び定常領域配列の一部を含むヒト抗体重鎖又は軽鎖ｃＤＮＡを調製した。次に、これらのｃＤＮＡ生成物をＰＣＲ反応で増幅させ、最初に断片をクローニングすることなくＰＣＲ増幅ＤＮＡを直接配列決定した。配列決定した重鎖ｃＤＮＡは、マウスに存在する５つのヒト生殖系列遺伝子のうちの１つであるＤＰ－４６と＞９０％同一であった（図２）。同様に、配列決定した軽鎖ｃＤＮＡは、マウスに存在するヒト生殖系列遺伝子のうちの１つと１００％又は９８％のいずれかと同一であった（図３）。これらの配列結果は、ｃＤＮＡに転写され配列決定されたＲＮＡ分子がヒト抗体重鎖及びヒト抗体軽鎖をコード化したことを確認した。可変領域がシグナル配列コード配列の５’端にマッピングされるオリゴヌクレオチドを使用してＰＣＲ増幅されたため、シグナル配列の最初の数個のアミノ酸は元のＴＮＶ翻訳生成物の実際の配列ではない可能性があるが、組換えＴＮＶ　ｍＡｂの実際の配列を表すことに留意するべきである。
【０２６９】
固有の中和ｍＡｂ。
各ｍＡｂの重鎖及び軽鎖両方の可変領域全体のｃＤＮＡ配列の分析は、ＴＮＶ３２がＴＮＶ１５と同一であり、ＴＮＶ１１８がＴＮＶ１４と同一であり、ＴＮＶ８６がＴＮＶ１４８と同一であることを明らかにした。受容体結合アッセイの結果は、ＤＮＡ配列分析と一致していた、即ち、ＴＮＶ８６及びＴＮＶ１４８の両方が、ＴＮＦ結合の遮断においてＴＮＶ１１８及びＴＮＶ１４の両方よりも約４倍良好であった。したがって、後続の作業は、４つの固有のＴＮＶ　ｍＡｂである、ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１４８、及びＴＮＶ１９６にのみ焦点を当てた。
【０２７０】
４つのｍＡｂの関連性
ＤＮＡ配列結果は、４つのＴＮＶ　ｍＡｂの重鎖をコード化する遺伝子が全て互いに高度に相同であり、全てが同じ生殖系列遺伝子ＤＰ－４６に由来するように見えることを明らかにした（図２）。加えて、重鎖ＣＤＲ３配列の各々は非常に類似し、同じ長さのものであるため、そしてそれらが全てＪ６エクソンを使用するため、それらは明らかに、単一のＶＤＪ遺伝子再配列事象から生じ、この後に各ｍＡｂを固有のものにする体細胞変化が続いた。ＤＮＡ配列分析は、４つのｍＡｂにおいて２つの別個の軽鎖遺伝子のみが存在したことを明らかにした（図３）。ＴＮＶ１４及びＴＮＶ１５における軽鎖可変領域コード配列は、互いに同一であり、ヒトκ鎖のＶｇ／３８Ｋファミリーの代表的な生殖系列配列と同一である。ＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１９６軽鎖コード配列は、互いに同一であるが、２つのヌクレオチド位置での生殖系列配列が異なる（図３）。
【０２７１】
４つのｍＡｂの推定アミノ酸配列は、実際のｍＡｂの関連性を明らかにした。４つのｍＡｂは、４つの別個の重鎖（図４）を含有するが、別個の軽鎖は２つのみである（図５）。ＴＮＶ　ｍＡｂ配列と生殖系列配列との間の差異は、大半はＣＤＲドメインに限定されていたが、ｍＡｂ重鎖のうちの３つもフレームワーク領域において生殖系列配列とは異なっていた（図４）。ＤＰ－４６生殖系列コードＡｂフレームワーク領域と比較して、ＴＮＶ１４は同一であり、ＴＮＶ１５は１つのアミノ酸が異なり、ＴＮＶ１４８は２つのアミノ酸が異なり、ＴＮＶ１９６は３つのアミノ酸が異なっていた。
【０２７２】
ｃＤＮＡのクローニング、部位特異的変異誘発、及び最終発現プラスミドのアセンブリ。ｃＤＮＡのクローニング。ＰＣＲ増幅可変領域のＤＮＡ配列に基づいて、クローニング

されるコード配列を発現ベクター内に適応させる目的のため、新しいオリゴヌクレオチドは別のＰＣＲ増幅を行うように命じられた。重鎖の場合、この２回目のＰＣＲの生成物は制限酵素ＢｓｉＷＩ及びＢｓｔＢＩで消化され、プラスミドベクターＬ２８（表２に示されるプラスミド識別番号）にクローニングされた。軽鎖の場合、２回目のＰＣＲ生成物はＳａｌＩ及びＡｆｌＩＩで消化され、プラスミドベクターｐＢＣにクローニングされた。次に、個々のクローンを配列決定して、それらの配列が、潜在的に異種の分子集団の各位置での最も豊富なヌクレオチドを明らかにするＰＣＲ生成物の直接配列決定から得られた前回の配列と同一であることを確認した。

【０２７３】

ＴＮＶ１４８を変更するための部位特異的変異誘発。ｍＡｂ　ＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１９６は、ＴＮＦα生理活性の中和において、次に最良のｍＡｂ（ＴＮＶ１４）よりも４倍強力であることが一貫して観察された。しかしながら、上述のように、ＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１９６重鎖フレームワーク配列は、生殖系列フレームワーク配列とは異なる。ＴＮＶ１４８重鎖配列と他のヒト抗体との比較は、多くの他のヒトｍＡｂがフレームワーク１の位置２８でＩｌｅ残基を含有し（成熟配列のみ計数）、一方でフレームワーク３の位置７５でのＰｒｏ残基は、その位置では稀なアミノ酸であったことを示した。

【０２７４】

ＴＮＶ１９６重鎖の類似の比較は、フレームワーク３で生殖系列配列とは異なる３つのアミノ酸がヒトｍＡｂにおいて希であり得ることを示唆した。これらの差異は、ヒトに投与された場合、ＴＮＶ１４８及びＴＮＶ１９６を免疫原性にする可能性があった。ＴＮＶ１４８は、関心のアミノ酸残基を１個しか有しておらず、この残基はＴＮＦα結合に重要ではないと考えられているため、部位特異的変異誘発技術を使用して、生殖系列Ｓｅｒ残基が位置７５でＰｒｏ残基の代わりにコード化されるように、ＴＮＶ１４８重鎖コード配列（プラスミドｐ１７５３の）の単一のヌクレオチドを変更した。結果として得られたプラスミドはｐ１７６０と呼ばれた（表２を参照のこと）。結果として得られた遺伝子及びｍＡｂは、それを元のＴＮＶ１４８遺伝子及びｍＡｂと区別するためにＴＮＶ１４８Ｂと呼ばれた（図５を参照のこと）。

【０２７５】

最終発現プラスミドのアセンブリ。ゲノム断片として前にクローニングされた１２Ｂ７５重鎖及び軽鎖遺伝子に基づいた新しい抗体発現ベクターを調製した。異なるＴＮＶ発現プラスミドが調製されたが（表２を参照のこと）、それぞれの場合において、５’フランキング配列、プロモータ、及びイントロンエンハンサは、それぞれの１２Ｂ７５遺伝子に由来した。軽鎖発現プラスミドに関して、完全なＪ－Ｃイントロン、定常領域コード配列、及び３’フランキング配列も１２Ｂ７５の軽鎖遺伝子に由来した。最終生成細胞株（ｐ１７８１及びｐ１７８３、以下を参照のこと）をもたらした重鎖発現プラスミドに関して、ヒトＩｇＧ１定常領域コード配列は、Ｃｅｎｔｏｃｏｒの前に使用された発現ベクター（ｐ１０４）に由来した。重要なことには、ここで報告される最終生成細胞株は、元のハイブリドーマ由来ＴＮＶ　ｍＡｂ（Ｇ１ｍ（ｚ））とは異なるアロタイプ（Ｇｍ（ｆ＋））のＴＮＶ　ｍＡｂを発現する。これは、ＧｅｎＰｈａｒｍマウスに由来する１２Ｂ７５重鎖遺伝子はＣＨ１ドメインのＣ末端部でＡｒｇ残基をコード化するが、ＣｅｎｔｏｃｏｒのＩｇＧ１発現ベクターｐ１０４はその位置でＬｙｓ残基をコード化するためである。Ｊ－Ｃイントロン、完全定常領域コード配列、及び３’フラランキング配列が１２Ｂ７５重鎖遺伝子に由来する他の重鎖発現プラスミド（例えば、ｐ１７８６及びｐ１７８８）を調製したが、これらの遺伝子でトランスフェクトされた細胞株を生成細胞株として選択しなかった。ベクターは、最終発現プラスミドをもたらすであろう後のＰＣＲ増幅Ｖ領域の一工程クローニングを可能にするように慎重に設計された。

【０２７６】

ＰＣＲ増幅可変領域ｃＤＮＡは、Ｌ２８又はｐＢＣベクターから、プロモータ領域及びＪ－Ｃイントロンの一部を提供する中間段階の１２Ｂ７５系ベクターに移された（プラスミド識別番号に関しては表２を参照のこと）。次に、抗体遺伝子の５’半分を含有する制

限断片を、これらの中間段階のベクターから、それぞれの遺伝子の３’半分を提供する最終発現ベクターに移して、最終発現プラスミド（プラスミド識別番号に関しては表２を参照のこと）を形成した。

【０２７７】

細胞のトランスフェクション及びサブクローニング。発現プラスミドは、制限消化によって線形化されたか、又は各プラスミド中の抗体遺伝子インサートがプラスミド骨格鎖から精製されたかのいずれかであった。Ｓｐ２／０及び６５３マウス骨髄腫細胞は、エレクトロポレーションにより重鎖ＤＮＡ及び軽鎖ＤＮＡでトランスフェクトされた。１５の異なるトランスフェクションを行い、そのほとんどは、Ａｂによって規定されるように固有であり、遺伝子が線形化された全プラスミド又は精製された遺伝子インサート上にあるかどうかにかかわらずＡｂ遺伝子の特定の特徴であり、宿主細胞株であった（表４に要約される）。マイコフェノール酸に耐性のクローンからの細胞上清を、ヒトＩｇＧの存在についてＥＬＩＳＡによりアッセイし、精製されたｒＴＮＶ１４８Ｂを参照標準曲線として使用して定量化した。

【０２７８】

生成が最も高いｒＴＮＶ１４８Ｂ細胞株

ｒＴＮＶ１４８Ｂトランスフェクション２からの、生成が最高の６５３親株のうちの１０（使用済２４ウェル培養物において５～１０：ｇ／ｍｌを生成）をサブクローニングして、生成がより高い細胞株についてスクリーニングし、より均質な細胞集団を調製した。親株２．３２０、２．３２０－１７、及び２．３２０－２０のサブクローンのうちの２つは、使用済２４ウェル培養物において約５０：ｇ／ｍｌを生成し、これは、それらの親株に対して５倍の増加であった。サブクローニングした株２．３２０－１７及び２．３２０－２０の２回目のサブクローニングがもたらした。

【０２７９】

各ｍＡｂをコード化する重鎖及び軽鎖プラスミドの識別番号を示す。精製されたｍＡｂ遺伝子インサートで行われたトランスフェクションの場合、ｇｐｔ選択マーカーの供給源としてプラスミドｐ１３（ｐＳＶ２ｇｐｔ）が含まれた。重鎖定常領域は、Ｒｅｍｉｃａｄｅをコード化するために使用された同じヒトＩｇＧ１発現ベクター（「旧」）又は１２Ｂ７５（ＧｅｎＰｈａｒｍ／Ｍｅｄａｒｅｘ）重鎖遺伝子内に含有される定常領域（「新規」）のいずれかによりコード化された。Ｈ１／Ｌ２は、ＴＮＶ１４重鎖及びＴＮＶ１４８軽鎖で構成される「新規」ｍＡｂを指す。プラスミドｐ１７８３及びｐ１８０１は、それらの重鎖遺伝子がＪ－Ｃイントロンをどの程度含有するかによってのみ異なる。細胞クローンの遺伝子名の最初の数字を定義するトランスフェクション番号は、右側に示される。本明細書に記載されるｒＴＮＶ１４８Ｂ生成細胞株Ｃ４６６（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ）及びＣ４６７Ａは、それぞれトランスフェクション番号２及び１に由来した。ｒＴＮＶ１４生成細胞株Ｃ４７６Ａはトランスフェクション番号３に由来した。

【０２８０】

【表６】

表４．細胞トランスフェクションの要約。

プラスミド	HC	DNA			
トランスフェクション番号					
mAb	HC／LC／gpt	ベクター	形式	Sp2／0	653
rTNV148B	1783／1776	旧型	線形	1	2
rTNV14	1781／1775	旧型	線形	3	－
rTNV148B	1788／1776／13	新規型	インサート	4，6	5，7
rTNV14	1786／1775／13	新規型	インサート	8，10	9，11
rTNV148	1787／1776／13	新規型	インサート	12	17
rH1／L2	1786／1776／13	新規型	インサート	13	14
rTNV148B	1801／1776	旧型	線形	16	

【０２８１】

使用済の２４ウェル培養上清でのＥＬＩＳＡアッセイは、これらの２回目のサブクローンが全て９８～１２４：ｇ／ｍｌを生成したことを示し、これは初回のサブクローンに対して少なくとも２倍の増加であった。これらの６５３細胞株は、表５に示されるように、Ｃコード表記が割り当てられた。

【０２８２】

ｒＴＮＶ１４８Ｂトランスフェクション１からの生成が最高のＳｐ２／０親株のうちの３つをサブクローニングした。親株１．７３の２回のサブクローニングは、使用済２４ウェル培養物において２５：ｇ／ｍｌを生成したクローンの特定につながった。このＳｐ２／０細胞株は、Ｃ４６７Ａと表記された（表５）。

【０２８３】

生成が最も高いｒＴＮＶ１４細胞株

ｒＴＮＶ１４トランスフェクション３からの生成が最高のＳｐ２／０親株のうちの３つを１回サブクローニングした。サブクローン３．２７－１は、生成が１９：ｇ／ｍｌであり、使用済の２４ウェル培養物において最も高い生産体であることが分かった。この細胞株は、Ｃ４７６Ａと表記された（表５）。

【０２８４】

表５．選択された生成細胞株及びそれらのＣコードの要約。

元のクローン名の最初の１桁は、細胞株がどのトランスフェクションに由来するかを示す。本明細書に報告されるＣコード細胞株の全てが制限酵素で線形化された重鎖及び軽鎖全プラスミドでのトランスフェクションに由来した。

【０２８５】

【表７】

元	使用済24ウェル			
mAb	クローン名	Cコード	宿主細胞	生成
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

【０２８６】

サブクローニングされた細胞株の特徴付け

細胞株成長特徴をより慎重に特徴付けし、大規模でｍＡｂ生成レベルを決定するために、Ｔ７５培養物を使用して成長曲線分析を行った。結果は、細胞株の４つのＣ４６６シリーズの各々が１．０×１０^{6}～１．２５×１０^{6}細胞／ｍｌのピーク細胞密度及び１１０～１４０：ｇ／ｍｌの最大ｍＡｂ蓄積レベルに達したことを示した（図７）。対照的に、生成が最高のＳｐ２／０サブクローンＣ４６７Ａは、２．０×１０^{6}細胞／ｍｌのピーク細胞密度及び２５：ｇ／ｍｌの最大ｍＡｂ蓄積レベルに達した（図７）。成長曲線分析は、ｒＴＮＶ１４生成細胞株Ｃ４７６Ａに対して行われなかった。

【０２８７】

更なる成長曲線分析を行って、異なる濃度のＭＨＸ選択物における成長速度を比較した。この比較は、ＭＨＸの不在下で培養されたＣ４６６細胞が、通常量のＭＨＸ（１Ｘ）で培養された同じ細胞よりも速く成長しているように思われる近年の観測によって促された。マイコフェノール酸などの化合物の細胞傷害性濃度は桁違いで測定される傾向にあるため、より低い濃度のＭＨＸを使用することにより、ｍＡｂ生成の安定性を犠牲にすることなく細胞の倍加時間を大幅に速くし得ることが可能であると考えられた。細胞株Ｃ４６６Ａ及びＣ４６６Ｂは、ＭＨＸなし、０．２Ｘ　ＭＨＸ、又は１Ｘ　ＭＨＸのいずれかで培養された。生細胞の計数は、７日間、２４時間間隔で行われた。結果により、ＭＨＸ濃度依存性細胞成長率が明らかになった（図８）。細胞株Ｃ４６６Ａは、１Ｘ　ＭＨＸにおいて２５．０時間の倍加時間を示したが、ＭＨＸなしではわずか２０．７時間の倍加時間を示した。同様に、細胞株Ｃ４６６Ｂは、１Ｘ　ＭＨＸにおいて３２．４時間の倍加時間を示したが、ＭＨＸなしではわずか２２．９時間の倍加時間を示した。重要なことには、０．２Ｘ　ＭＨＸにおける両細胞株の倍加時間は、１Ｘ　ＭＨＸよりもＭＨＸなしで観測されたものとより類似していた（図８）。この観測は、倍加時間が重要なパラメータであるバイオリアクターにおいて、増強された細胞性能がより少ないＭＨＸを使用することにより実現され得る可能性を示す。しかしながら、安定性試験結果（以下を参照のこと）は、細胞株Ｃ４６６ＤがＭＨＸの不在下でも少なくとも６０日間、ｒＴＮＶ１４８Ｂを安定して生成することが可能であることを示唆するが、安定性試験はまた、ＭＨＸの不在と比較して、細胞がＭＨＸの存在下で培養されたとき、より高いｍＡｂ生成レベルも示した。

【０２８８】

約６０日の期間にわたって様々な細胞株からのｍＡｂの生成を評価するために、ＭＨＸ選択物を含有する又は含有しない、いずれかの培養物で安定性試験を行った。細胞株の全てが高ｍＡｂ生成を維持したわけではなかった。培養のちょうど２週間後、クローンＣ４６６Ａの生成は研究開始時よりも約４５％少なかった。クローンＣ４６６Ｂからの生成も大幅に低下したように思われた。しかしながら、クローンＣ４６６Ｃ及びＣ４６６Ｄは、かなり安定した生成を維持し、Ｃ４６６Ｄは最も高い絶対生成レベルを示した（図９）。

【０２８９】

結論

ヒトＴＮＦαに対する８つのヒトｍＡｂの初期パネルから、タンパク質配列及びＴＮＦ中和効力を含むいくつかの基準に基づいて、ＴＮＶ１４８Ｂ並びにＴＮＶ１４が好ましいものとして選ばれた。１００：ｇ／ｍｌ超のｒＴＮＶ１４８Ｂ及び１９：ｇ／ｍｌ超のｒＴＮＶ１４を生成する細胞株を調製した。

【０２９０】

実施例５：単回ボーラス注射を使用した抗ＴＮＦ抗体及び対照を使用した関節炎マウスの研究

約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき９つの処置群のうちの１つに割り当て、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ（Ｄ－ＰＢＳ）、又は１ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇのいずれかの本発明の抗ＴＮＦ抗体（ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１４８、若しくはＴＮＶ１９６）の単回腹腔内ボーラス用量で処置した。

【０２９１】

結果：体重を投与前からの変化として分析したとき、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究を通してＤ－ＰＢＳ処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この

体重増加は、３～７週目で有意であった。１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物も、研究の７週目に有意な体重増加を達成した。（図１０を参照のこと）。

【０２９２】

図１１Ａ～Ｃは、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、３週目から始まり、残りの研究全体を通して（７週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目以降のＡＩにおいて有意な減少を示すことができなかった。各々を類似の用量の他のものと比較したとき（１０ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４、１４８及び１９６と比較した１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２）、１０ｍｇ／ｋｇの処置群の間に有意差はなかった。１ｍｇ／ｋｇの処置群を比較したとき、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２よりも３、４及び７週で有意に低いＡＩを示した。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８も、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４処置群よりも３及び４週目で有意に低かった。ＴＮＶ１９６は研究の６週目までＡＩにおいて有意な減少を示したが（Ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき）、ＴＮＶ１４８はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の１ｍｇ／ｋｇ処置群であった。

【０２９３】

実施例６：複数ボーラス投与として抗ＴＮＦ抗体及び対照を使用した関節炎マウスの研究

約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを体重に基づき８つの処置群のうちの１つに割り当て、対照品（Ｄ－ＰＢＳ）、又は３ｍｇ／ｋｇの抗体（ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１４８）（０週目）の腹腔内ボーラス投与で処置した。注射は１、２、３及び４週目に全ての動物において繰り返された。群１～６は、試験品の有効性に関して評価された。群７及び８の動物から得られた血清試料は、２、３及び４週目のＴＮＶ１４又はＴＮＶ１４８の免疫応答誘導及び薬物動態クリアランスに関して評価された。

【０２９４】

結果：体重を投与前からの変化として分析したとき、有意差は認められなかった。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究を通してＤ－ＰＢＳ処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。（図１２を参照のこと）。

【０２９５】

図１３Ａ～Ｃは、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、２週目から始まり、残りの研究全体を通して（５週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも有意に低かった。１ｍｇ／ｋｇ又は３ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物及び３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点でＡＩにおいて任意の有意な減少を達成することができなかった。３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物は、ｄ－ＰＢＳ処置群と比較したとき、３週目から始まり、５週目まで継続する有意な減少を示した。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究の４及び５週目でより低い用量の両ｃＡ２（１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇ）と比較したとき、ＡＩにおいて有意な減少を示し、また３～５週目でＴＮＶ１４で処置した動物よりも有意に低かった。３ｍｇ／ｋｇの処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４で処置した動物に関するＡＩは、ある時点で１０ｍｇ／ｋｇよりも有意に高く、一方ＴＮＶ１４８で処置した動物は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物と有意に異ならなかった。

【０２９６】

実施例７：単回腹腔内ボーラス投与として抗ＴＮＦ抗体及び対照を使用した関節炎マウスの研究

約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき６つの処置群のうちの１つに割り当て、３ｍｇ／ｋｇ又は５ｍｇ／ｋｇのいずれかの抗体（ｃＡ２又はＴＮＶ１４８）の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。この研究は、Ｄ－ＰＢＳ及び１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２対照群を利用した。

【０２９７】

体重を投与前からの変化として分析したとき、全ての処置は似たような体重増加を達成した。３又は５ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８又は５ｍｇ／ｋｇのｃＡ２のいずれかで処置した動物は、研究の早期（２及び３週目）に体重量が有意に増加した。ＴＮＶ１４８で処置した動物のみが後の時点において有意な体重増加を維持した。３及び５ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物はどちらも、７週目で有意を示し、３ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物は注射の８週間後に尚も有意に上昇した。（図１４を参照のこと）。

【０２９８】

図１５は、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。全ての処置群が初期の時点で多少の保護を示し、５ｍｇ／ｋｇのｃＡ２及び５ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８は、１～３週目にＡＩにおいて有意な減少を示し、全ての処置群が２週目で有意な減少を示した。実験の後期に、５ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は多少の保護を示し、４、６及び７週目で有意に減少した。低用量（３ｍｇ／ｋｇ）のｃＡ２及びＴＮＶ１４８は両方とも、６週目で有意な減少を示し、全ての処置群が７週目で有意な減少を示した。研究の終わりで（８週目）有意な減少を維持することができた処置群はなかった。任意の時点で処置群のいずれかの間（食塩水対照群は除く）に有意差はなかった。

【０２９９】

実施例８：抗ＴＮＦ抗体と修飾された抗ＴＮＦ抗体との間の単回腹腔内ボーラス投与として抗ＴＮＦ抗体及び対照を使用した関節炎マウスの研究

ＴＮＶ１４８（ハイブリドーマ細胞に由来する）及びｒＴＮＶ１４８Ｂ（トランスフェクトした細胞に由来する）の単回腹腔内投与の有効性を比較するために。約４週齢のＴｇ１９７研究マウスを性別及び体重に基づき９つの処置群のうちの１つに割り当て、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ＝のＰＢＳ（Ｄ－ＰＢＳ）又は１ｍｇ／ｋｇの抗体（ＴＮＶ１４８、ｒＴＮＶ１４８Ｂ）の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。

【０３００】

体重を投与前からの変化として分析したとき、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した動物は、研究を通してＤ－ＰＢＳ処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この体重増加は、１週目及び３～８週目で有意であった。１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８で処置した動物も、研究の５、６、及び８週目に有意な体重増加を達成した。（図１６を参照のこと）。

【０３０１】

図１７は、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群の関節炎指数は、４週目から始まり、残りの研究全体を通して（８週目）Ｄ－ＰＢＳ対照群よりも低かった。ＴＮＶ１４８で処置した群及び１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群は両方とも、４週目でＡＩにおける有意な減少を示した。以前の研究（Ｐ－０９９－０１７）は、ＴＮＶ１４８が単回の１ｍｇ／ｋｇの腹腔内ボーラス後の関節炎指数の減少にわずかにより効果的であることを示したが、この研究では、両バージョンのＴＮＶ抗体で処置した群からのＡＩがわずかに高いことを示した。１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２で処置した群（６週目を除く）は、１０ｍｇ／ｋｇのｃＡ２群と比較したとき、有意に増加せず、ＴＮＶ１４８で処置した群は、７及び８週目で有意に高かったが、１ｍｇ／ｋｇのｃＡ２、１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８及び１ｍｇ／ｋｇのＴＮＶ１４８Ｂの間には研究の任意の時点でＡＩにおいて有意差はなかった。

【０３０２】

実施例９：活動性乾癬性関節炎の治療のための抗ＴＮＦ抗体

梗概

活動性乾癬性関節炎（ＰｓＡ）を有する対象における、静脈内投与された抗ＴＮＦαモノクローナル抗体、ゴリムマブの多施設共同、無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験

【０３０３】

ＳＩＭＰＯＮＩ（登録商標）（ゴリムマブ）は、免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）重鎖アイソタイプ（Ｇ１ｍ［ｚ］アロタイプ）及びκ軽鎖アイソタイプを有する完全ヒトモノクローナル抗体である。ゴリムマブは、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３

７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する。ゴリムマブの分子量は、１４９，８０２～１５１，０６４ダルトンの範囲である。ゴリムマブは、高い親和性及び特異性を有するヒト腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）に結合し、ＴＮＦα生物活性を中和する。

【０３０４】

目的及び仮説

主目的

この研究の主目的は、ＰｓＡの徴候及び症状の低減を評価することによって、活動性乾癬性関節炎（ＰｓＡ）を有する対象におけるゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇのＩＶ投与の有効性を評価することである。

【０３０５】

副次的目的

副次的目的は、ＩＶゴリムマブについて以下を評価することである。

・乾癬皮膚病変、身体機能、健康関連の生活の質、及び他の健康結果の改善に関連する有効性

・構造損傷の進行の阻害

・安全性

・薬物動態（ＰＫ）、薬力学（ＰＤ）、及び免疫原性

【０３０６】

仮説

研究の主目的に対処するために、統計的仮説（代替仮説）は、ゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇが、主要有効性エンドポイントに基づき、活動性ＰｓＡを有する対象の徴候及び症状を低減する際に、プラセボよりも統計的に優れていることである。

【０３０７】

この研究の一次エンドポイントは、１４週目に米国リウマチ学会基準（ＡＣＲ２０と呼ばれる）におけるベースラインからの２０％の改善を達成する対象の割合である。このエンドポイントは、規制当局及び臨床的ＰｓＡコミュニティによって十分に受け入れられているために選択された。

【０３０８】

研究デザインの概要

これは、活動性ＰｓＡを有する対象におけるプラセボと比較したＩＶゴリムマブの有効性及び安全性の３相多施設共同、無作為化、二重盲検、プラセボ対象研究である。約４４０人の対象が、約９０の治験実施機関で無作為化される。対象は、０、４、１２、及び２０週目にゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ又はプラセボＩＶ注入を受けるように無作為に割り当てられる。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる。それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、メトトレキサート（ＭＴＸ）用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。２４週目に、プラセボ注入を受けた全ての対象は、交差し、ゴリムマブＩＶ注入を受け始める。

【０３０９】

ゴリムマブＩＶ処置群の対象は、ゴリムマブＩＶ注入を受け続ける。データベースロック（Database lock、ＤＢＬ）は、２４及び６０週目に予定されている。対象は、最後の研究処置投与後に少なくとも８週間、有害事象（ＡＥ）及び重篤有害事象（ＳＡＥ）に関して調査される。研究の終了は、最後の対象が６０週目の訪問を完了する時として定義される。

【０３１０】

対象集団

研究に適格な対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも６か月間、ＰｓＡを有する１８歳以上の男性又は女性であり、スクリーニング時にＣＡＳＰＡＲ基準を満たす。対象は、スクリーニング及びベースラインにおいて活動性疾患の症状（５つ以上の腫脹関節及び５つ以上の圧痛関節）を有し、０．６ｍｇ／ｄＬ以上のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）レベルを有しなければならない。対象は、生物製剤で処置されていてはならない。対象は、研究中にＭＴＸ処置を継続してもよい。

【０３１１】

適格対象のためのスクリーニングは、研究薬剤の投与前６週間以内に実施される。

【０３１２】

対象はまた、組み入れ及び除外基準を満たさなければならない。

【０３１３】

投与量及び投与

初回スクリーニング訪問では、研究に適格である可能性があると考えられる全ての対象から、研究に登録するために、プロトコル指定の組み入れ及び除外基準に従って、インフォームドコンセントが得られる。無作為化訪問では、対象は再評価され、全ての指定された組み入れ及び除外基準が満たされた場合、対象は、ゴリムマブＩＶ注入又はプラセボＩＶ注入のいずれかを受けるように無作為化される。無作為化は、地理的領域及びベースラインのメトトレキサート（ＭＴＸ）使用（はい又はいいえ）によって階層化される。

【０３１４】

研究薬剤の第１の注入前に、対象は、以下の２つの処置群のうちの１つに１：１の比で無作為に割り当てられる。

【０３１５】

群１（ｎ＝２２０）：対象は、０、４、１２、及び２０週目にＩＶプラセボ注入を受ける。対象は、２４週目にＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇに切り替え、２４、２８週目、及びその後ｑ８ｗに投与を受ける。

【０３１６】

群２（ｎ＝２２０）：対象は、０、４週目、及びその後ｑ８ｗにＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇを受ける。対象は、盲検を維持するために、２４週目にＩＶプラセボ注入を受ける。

【０３１７】

１６週目に、腫脹関節数及び圧痛関節数の両方におけるベースラインからの５％未満の改善を有する群Ｉ及びＩＩにおける全ての対象が、早期離脱（early escape、ＥＥ）に入る。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる：それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。

【０３１８】

全ての注入は、３０±１０分間かけて完了する。

【０３１９】

有効性評価／エンドポイント

この研究のために選択された有効性評価は、ＰｓＡの治療のための治療用生物学的薬剤の以前の試験において確立された。本研究のために選択された患者報告アウトカム（patient reported outcome、ＰＲＯ）は、ＰｓＡにおける他の研究に関する医療文献及び適用可能なＵＳ／ＥＵ規制ガイダンス文書で受け入れられている臨床的に関連する測定値と一致する。

【０３２０】

乾癬性関節炎及び乾癬応答評価は、以下を含む。
・対象の疼痛評価
・対象の疾患の包括的評価
・医師の疾患の包括的評価
・関節評価
・健康評価質問表の障害指標（ＨＡＱ－ＤＩ）
・乾癬の面積及び重症度指標（Psoriasis Area and Severity Index、ＰＡＳＩ）
・手及び足のＸ線評価
・３６項目ショートフォーム健康調査（ＳＦ－３６）
・指炎評価
・腱付着部炎評価
・Ｂａｔｈ強直性脊椎炎疾患活動性指標（ＢＡＳＤＡＩ）
・修正されたＮＡＰＳＩ
・皮膚科学的生活の質指標（ＤＬＱＩ）
・慢性疾患療法の機能評価（ＦＡＣＩＴ）－疲労
・労働生産性に関する質問票（ＷＬＱ）
・生産性ＶＡＳ
・ＥｕｒｏＱｏｌ－５Ｄ（ＥＱ－５Ｄ）質問票

【０３２１】
主エンドポイント
この研究の主エンドポイントは、１４週目にＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合である。

【０３２２】
研究は、１４週目のＡＣＲ２０を有する対象の割合が、プラセボ群と比較してゴリムマブ群において有意により大きいことが実証された場合、陽性であると考えられる。

【０３２３】
主要セカンダリーエンドポイント
以下の主要な二次分析エンドポイントは、以下に指定されるような重要度順で列挙される。
・１４週目のＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化。
・１４週目にＡＣＲ５０応答を有する患者の割合。
・１４週目にＰＡＳＩ７５応答を達成する対象の割合（ベースラインの３％以上のＢＳＡ乾癬関与を有する）。
・２４週目の修正総ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｈｅｉｊｄｅシャープスコア（ｖｄＨ－Ｓ）スコアにおけるベースラインからの変化。

【０３２４】
薬物動態評価
血液試料を選択された訪問で収集して、ＰｓＡを有する成人対象におけるＩＶゴリムマブのＰＫを評価する。研究薬剤がその訪問で投与される場合、薬物動態試料は、ＩＶ注入ラインとは異なる腕から採取されるべきである。０、４、１２、２０、３６、及び５２週目に、血清ゴリムマブ濃度のための２つの試料が収集され、一方の試料は、注入直前に収集され、他方は、注入の終了の１時間後に収集される。残りの訪問の各々について、血清ゴリムマブ濃度のための１つの試料のみが収集され、これは、研究薬剤の注入がその訪問で投与される場合、注入直前に収集されるべきである。無作為ＰＫ試料は、１４週目と２０週目の訪問の間の集団ＰＫ分析のために採取され（１４週目又は２０週目の訪問時以外）、この無作為試料は、研究薬剤注入の少なくとも２４時間前又は後に収集されなければならない。

【０３２５】
適用可能な時点で、ゴリムマブ濃度及びゴリムマブに対する抗体の両方の測定のための血清が、同じ採血から得られる。

【０３２６】
免疫原性評価
ＰｓＡを有する成人対象におけるゴリムマブの免疫原性を評価するために、ゴリムマブに対する抗体の検出のための血清試料が、時間及びイベントスケジュールに従って収集される。
【０３２７】
バイオマーカー評価
バイオマーカー試料は、臨床転帰における個人間変動の分子的理解を得るために収集され、これは、薬物に異なる応答を示す集団サブグループを同定するのに役立ち得る。バイオマーカー試料はまた、新たな問題に対処するのに役立つために、かつ将来のより安全な、より効果的な、かつ最終的に個別化された療法の開発を可能にするために使用されてもよい。
【０３２８】
薬理ゲノム学的（ＤＮＡ）評価
ゲノム試験は、疾患又は薬剤に対する反応と特定の遺伝子との関連に関して調査するために行われる。ゴリムマブ又はこの薬物が開発された疾患に関連するＤＮＡ研究のみが行われる。ゲノムの幅広い薬理ゲノム学的及び／又はエピジェネティクス試験は、同意が得られた対象において本研究で行われる。この研究のこの部分に参加している対象は、別個のインフォームドコンセントに署名しなければならない。更に、対象は、試験の他の側面への参加、又は試験への今後の参加に影響を与えることなく、随時、そのような同意を撤回することができる。
【０３２９】
薬理ゲノム学的血液試料は、必要に応じて（地方規制が許可する場合）、薬理ゲノム学的研究を可能にするために収集される。薬理ゲノム学的研究への対象の参加は、任意選択的である。
【０３３０】
安全性評価
他の抗ＴＮＦα剤の安全プロファイル、並びにこれまでのゴリムマブ安全データに基づき、対象となるいくつかのＡＥが特定され、この研究において監視及び評価される。これらには、注入反応、検査所見の肝胆汁性異常、ＴＢを含む感染、及び悪性腫瘍が挙げられる。
【０３３１】
統計的方法
対象ベースライン、人口統計、及びベースラインの比較可能性を評価するために、疾患特性データは、処置群によって要約される。
【０３３２】
２値分類データ（例えば、ＡＣＲ２０応答を有する対象の割合）は、階層化が用いられるとき、カイ二乗検定又はコクラン・マンテル・ヘンツェル（Cochran Mantel Haenszel、ＣＭＨ）検定を使用して分析される。分散分析（ＡＮＯＶＡ）を使用して、連続データが分析される。エンドポイントが非ガウスであると見なされる場合、ファン・デル・ヴェルデン正規スコアが利用される。全ての有効性分析は、治療企図原理に基づく。したがって、対象は、彼らが実際に受ける処置に関係なく無作為化された処置に従って分析される。
【０３３３】
全ての統計的検定は、０．０５（両側）のアルファレベルで実施される。データの表及びグラフ要約の両方が利用される。
【０３３４】
集団セット
有効性及び対象ベースライン分析は、特に明記しない限り、治療企図集団（即ち、無作為化された全ての対象）を利用する。有効性分析に含まれる対象は、割り当てられた処置

を受けるかどうかにかかわらず、彼らの割り当てられた処置群に従って要約される。
【０３３５】
安全性及びＰＫ分析は、試験処置の少なくとも１回の投与を受けた全ての対象を含む。
【０３３６】
エンドポイント分析
主エンドポイント分析
主エンドポイントは、１４週目にＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合である。
【０３３７】
関節炎の徴候及び症状の低減は、処置群間の１４週目のＡＣＲ２０応答を有する対象の割合を比較することによって評価される。ベースラインＭＴＸ使用によって階層化されたＣＭＨ検定（はい又はいいえ）は、この分析のために０．０５の有意水準で実施される。
【０３３８】
対象が１４週目に少なくとも１つのＡＣＲ成分のデータを有する場合に、欠測ＡＣＲ成分を帰属させるために、欠測を直前の値で補完する（last observation carried forward、ＬＯＣＦ）手順が使用される。対象が１４週目に全てのＡＣＲ成分のデータを有しない場合、対象は、非応答者と見なされる。加えて、治療失敗規則が適用される。
【０３３９】
主要セカンダリーエンドポイント（複数可）分析
以下の主要二次分析は、以下に指定されるような重要度順で実施される。
１．１４週目のＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
２．１４週目にＡＣＲ５０応答を有する対象の割合が要約され、処置群間で比較される。
３．１４週目にＰＡＳＩ７５応答を達成する対象の割合（ベースラインの３％以上の体表面積の乾癬関与を伴う）が要約され、処置群間で比較される。
４．２４週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
【０３４０】
主エンドポイントと主要セカンダリーエンドポイントとの間のタイプＩのエラーを維持するために、エンドポイントは、順次試験される。主エンドポイントが分析される。それが統計的に有意である場合、以前の主要セカンダリーエンドポイントが統計的に有意である場合、主要セカンダリーエンドポイントは、上記の順序で比較される。以前の主要セカンダリーエンドポイントが統計的に有意でない場合、更なる比較が行われることはない。公称Ｐ値が提供される。
【０３４１】
安全性分析の概要
日常的な安全性評価が実施される。注入反応及びＴＢを含む感染を含む、ＡＥ、ＳＡＥ、及び適度に関連するＡＥの発生及びタイプが、処置群によって要約される。ＮＣＩ　ＣＴＣＡＥ毒性等級に基づく異常な検査室パラメータ（血液学及び化学）を有する対象の数が、要約される。加えて、ＡＮＡ及び抗ｄｓＤＮＡ抗体を有する対象の数、並びにゴリムマブに対する抗体との注入反応の関係が、要約される。
【０３４２】
全ての安全性分析は、研究薬剤の少なくとも１回の投与を受けた全ての対象の集団を使用して実施される。分析は、対象が実際に受けた処置を使用して実施される。
【０３４３】
加えて、データを要約／提示するために、グラフデータ表示（例えば、線プロット）及び対象リストも使用され得る。
【０３４４】

【表８－１】

略語

ACR	米国リウマチ学会基準
AE	有害事象
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANOVA	分散分析
AS	強直性脊椎炎
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BASDAI	Bath強直性脊椎炎疾患活動性指標
BCG	Bacille Calmette－Guerin
BSA	体表面積
CASPAR	乾癬性関節炎の分類基準
CHF	うっ血性心不全
CRP	C反応性タンパク質
DAS	疾患活動性指標スコア
DBL	データベースロック
DIP	遠位指節間
DLQI	皮膚科学的生活の質指標
DMARD	疾患修飾性抗リウマチ薬
DMC	データモニタリング委員会
DNA	デオキシリボ核酸
EC	倫理委員会
ECG	心電図
eCRF	電子症例報告書
eDC	電子データ収集
EQ－5D	EuroQol－5D
EQ－VAS	EQビジュアルアナログスケール
EU	欧州連合
FACIT－F	慢性疾患療法の機能評価－疲労
GCP	医薬品の臨床試験の実施の基準
GLM	ゴリムマブ
HAQ	健康評価質問票
HBV	B型肝炎ウイルス
HCQ	ヒドロキシクロロキン
HCV	C型肝炎ウイルス
HIV	ヒト免疫不全ウイルス
IB	治験薬概要書
ICH	医薬品規制調和国際会議
IgG1	免疫グロブリンG1
IJA	独立した関節評価者
IL	インターロイキン
IMPACT	インフリキシマブ多国間乾癬性関節炎比較試験
IRB	施設内審査委員会
IRC	イメージングリサーチセンター
IV	静脈内

【０３４５】

【表８－２】
（上記表の続き）

IWRS	自動ウェブ応答システム
JSN	関節裂隙狭小化
mAb	モノクローナル抗体
MCP	中手指節関節
MCS	精神成分サマリー
MDA	最小疾患活動性
MMP－１	マトリックスメタロプロテイナーゼ－１
MMP－３	マトリックスメタロプロテイナーゼ－３
MTX	メトトレキサート
NAPSI	爪乾癬の重症度指標
NCI－CTCAE	国立がん研究所－有害事象共通用語規準
NSAID	非ステロイド性抗炎症薬
PASI	乾癬の面積及び重症度指標
PBO	プラセボ
PCS	身体成分サマリー
PD	薬力学（複数可）
PIP	近位指節間関節
PK	薬物動態（複数可）、
PRO	患者報告アウトカム
PsA	乾癬性関節炎
pts	患者
q8w	8週間毎
q12w	12週間毎
RA	関節リウマチ
RBC	赤血球
RF	リウマチ因子
SAE	重篤な有害事象
SAP	統計分析計画
SC	皮下
SDC	最小検出可能変化
SF－36	36項目ショートフォーム健康調査
SI	国際単位系
SSZ	スルファサラジン
TB	結核
TNF	腫瘍壊死因子
TST	ツベルクリン皮膚検査
VAS	ビジュアルアナログスケール
vdH－S	van der Heijdeシャープ
WBC	白血球
WLQ	労働生産性に関する質問票

【０３４６】
序論
化学名及び構造
ＳＩＭＰＯＮＩ（登録商標）（ゴリムマブ）は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）１重鎖アイソタイプ（Ｇ１ｍ［ｚ］アロタイプ）及びκ軽鎖アイソタイプを有するヒトモノクローナル抗体（ｍＡｂ）である。ゴリムマブは、配列番号３６を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３７を含む軽鎖（ＬＣ）を有する。ゴリムマブの分子量は、１４９，８０２～１５１，０６４ダルトンの範囲である。ゴリムマブは、解剖治療化学（Anatomical Therapeutic Chemical）（ＡＴＣ）分類法に従い、ＴＮＦα阻害剤に分類される（ＡＴＣコード：Ｌ０４ＡＢ０６）。ゴリムマブは、可溶性及び膜貫通形態の両方の腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）に高い親和性で結合し、ＴＮＦα生理活性を阻害する。他のＴＮＦスーパーファミリー

リガンドに対する結合は観察されなかった。特に、ゴリムマブは、ヒトリンホトキシンに結合しないか、又はそれを中和しない。ＴＮＦαは、自己会合して生物活性ホモトリマーを形成し、タンパク質分解によって細胞表面から急速に放出される膜貫通タンパク質として、主に活性化単球、マクロファージ、及びＴ細胞によって合成される。ＴＮＦαのｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体のいずれかへの結合は、受容体細胞質ドメインのクラスター化をもたらし、シグナル伝達を開始する。腫瘍壊死因子は、様々な刺激に応答して産生され、続いて、カスケード依存性アポトーシス経路並びに転写因子核因子（ＮＦ）－κＢ及び活性化因子タンパク質－１（ＡＰ－１）の活性化による炎症応答を促進する、主要なセンチネルサイトカインとして同定されている。腫瘍壊死因子はまた、胚中心における免疫細胞の組織におけるその役割を通して免疫応答を調節する。ＴＮＦの発現の上昇は、関節リウマチ（ＲＡ）などの慢性炎症性疾患、並びに乾癬性関節炎（ＰｓＡ）及び強直性脊椎炎（ＡＳ）などの脊椎関節症に関連しており、これらの疾患に特徴的である関節性炎症及び構造損傷の重要なメディエーターである。

【０３４７】

乾癬性関節炎

乾癬性関節炎は、乾癬に関連する慢性炎症性、通常はリウマチ因子（ＲＦ）陰性関節炎である。一般白人集団における乾癬の有病率は、約２％である。約６％～３９％の乾癬患者がＰｓＡを発症する。

【０３４８】

乾癬性関節炎は、３０～５５歳の年齢の間がピークであり、男性及び女性に等しく影響を及ぼす。乾癬性関節炎は、末梢関節、中軸骨格、仙腸関節、爪、及び腱付着部を含み、乾癬皮膚病変に関連する。半数を超えるＰｓＡ患者が、Ｘ線でびらんの兆候があり得、患者の最大４０％が重度のびらん性関節症を発症する。乾癬性関節炎は、機能障害、生活の質の低下、及び死亡率の増加をもたらす。

【０３４９】

炎症性サイトカインの主要な供給源である、Ｔ細胞と単球／マクロファージとの間の相互作用は、ＰｓＡの病因における役割を果たす。ＴＮＦαのレベルの増加は、関節流体及び組織において、及びＰｓＡ患者における乾癬皮膚病変において検出されている。

【０３５０】

乾癬性関節炎におけるＴＮＦαの役割

ＴＮＦαは、幅広い機能活性を呈する主要な炎症メディエーターと見なされる。[2]ＴＮＦαの過剰産生は、ＲＡ及びクローン病患者において実証されるように、炎症に関連する疾患プロセスをもたらす。炎症性サイトカインの主要な供給源である、Ｔ細胞と単球／マクロファージとの間の相互作用は、ＰｓＡの病因における役割を果たす。[7,22]ＴＮＦαのレベルの増加は、関節流体及び組織において、及びＰｓＡ患者における乾癬皮膚病変において検出されている。[24,26]抗ＴＮＦαモノクローナル抗体であるインフリキシマブによる処置は、４８時間以内の、活動性ＰｓＡ患者における乾癬表皮におけるＴ細胞数並びに滑膜組織におけるＴ細胞数及びマクロファージ数の有意な低減をもたらすことが報告されている。[17]インフリキシマブ処置はまた、劇的な臨床的皮膚及び関節応答と並行してＰｓＡ患者における滑膜組織における血管新生成長因子も有意に低減した。[32]

【０３５１】

インフリキシマブ、ＳＣゴリムマブ、アダリムマブ、及びセルトリズマブペゴルを含む、ＴＮＦを標的とする生物学的治療は、許容可能な安全性プロファイルを維持しながら、活動性ＰｓＡを有する対象における関節炎及び乾癬の迅速かつ有意な改善を誘発することが示されている。エタネルセプト、アダリムマブ、及びセルトリズマブペゴルは、ＳＣ注射によって週２回、週１回、又は２～４週間毎に投与される。ゴリムマブは、ＳＣ注射によって毎月投与される。インフリキシマブは、０、２、６週目、及びその後８週間毎に、診療所環境でＩＶ注入として投与される。

【０３５２】

ＰｓＡにおけるＳＣゴリムマブの第３相研究（Ｃ０５２４Ｔ０８）では、現在又は以前

のＤＭＡＲＤ又はＮＳＡＩＤ療法にもかかわらずＰｓＡを有する４０５人の対象を、ＳＣプラセボ、ゴリムマブ５０ｍｇ　ｑ４ｗ、又は１００ｍｇ　ｑ４ｗを受けるように無作為化した。ゴリムマブによる処置は、９％（プラセボ）と比較して５１％（ゴリムマブ５０ｍｇ）という１４週目にＡＣＲ２０応答を達成する患者の割合によって実証されるように、徴候及び症状の改善をもたらした。２４週目に、ゴリムマブ５０ｍｇ群は、ＰｓＡについての修正された総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの平均変化によって測定されるように、プラセボよりも有意に少ない放射線損傷を有した。ゴリムマブ１００ｍｇ群は、２４週目のプラセボと比較してより少ない放射線損傷を示したが、差は、統計的有意性に達しなかった。２４週目に以前に見られたＰｓＡ対象における臨床的改善は、２５６週目まで維持された。２４週目まで、全てのゴリムマブ処置及びプラセボ処置患者のそれぞれの６５％及び５９％が、有害事象を有した。ゴリムマブ群で最も頻繁に報告された有害事象は、鼻咽頭炎及び上気道感染であった。重篤有害事象（ＳＡＥ）が、プラセボ処置患者の６％と比べて全てのゴリムマブ処置患者の２％に対して報告された。

【０３５３】

ＰｓＡの病態生理学におけるＴＮＦαの正確な役割は未だ不明確であるが、ＴＮＦα阻害がこの疾患において主要な治療効果を有するという大きく、かつ増加する一連の証拠が既に存在する。

【０３５４】

研究の全体的な根拠

この研究は、活動性ＰｓＡの治療において、０及び４週目で、次いで８週間毎（ｑ８ｗ、ＭＴＸあり又はなし）に、３０分間にわたってＩＶ注入を介して投与された２ｍｇ／ｋｇゴリムマブの安全性及び有効性を評価する。

【０３５５】

ＳＣゴリムマブの安全性及び有効性を考慮して、ＩＶゴリムマブが、他の抗ＴＮＦα剤と一致する許容可能な安全性プロファイルを有して有効であることを証明することができたと仮定された。静脈内（ＩＶ）ゴリムマブは、ＲＡの治療に対するゴリムマブＩＶの承認における第３相研究の治療のためのゴリムマブＩＶの承認の基礎を形成したＲＡにおける第３相研究（ＣＮＴＯ１４８ＡＲＴ３００１）で明確に研究されている。ＣＮＴＯ１４８ＡＲＴ３００１研究は、同時ＭＴＸ療法にもかかわらず活動性ＲＡを有する患者において０、４週目、及びそのｑ８ｗに、３０±１０分にわたって投与されたゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ注入のＩＶ投与の有効性及び安全性の無作為化、二重盲検、プラセボ対照、多施設共同、２群研究であった。ＭＴＸにもかかわらず活動性ＲＡを有する対象を０、４週目、及びｑ８ｗ（ＭＴＸあり）で２４週目まで２ｍｇ／ｋｇが投与されたプラセボ注入（ＭＴＸあり）又はＩＶゴリムマブのいずれかを受けるように無作為化した。２４週目から始まり、全ての対象に１００週目までＩＶゴリムマブを投与した。ＩＶゴリムマブは、ＲＡ徴候及び症状、身体機能、及び健康関連の生活の質の改善、並びに構造損傷の進行の阻害に実質的な利益を提供したことが実証された。

【０３５６】

ＲＡの治療において静脈内投与されたゴリムマブ（ＣＮＴＯ１４８ＡＲＴ３００１）は、強固な有効性、及び注入反応の発生率が低い許容可能な安全性プロファイルを実証した。この提案された第３相研究は、活動性ＰｓＡ対象の治療におけるＩＶゴリムマブの有効性及び安全性を実証するように設計されている。

【０３５７】

現在入手可能なＩＶ抗ＴＮＦα剤は、免疫原性及び注入反応に対する制限を有し、ＩＶゴリムマブを用いた提案されている３０±１０分間の注入と比較して、より長い注入時間（６０～１２０分）を有するため、ＰｓＡ対象におけるＩＶ投与経路が評価されている。

【０３５８】

患者はまた、より頻繁なＳＣ投与ではなく、ｑ８ｗ　ＩＶゴリムマブの維持投与スケジュールを好む場合がある。したがって、ＩＶゴリムマブは、ＰＳＡ患者にとって現在利用可能な治療選択肢への重要な追加であり得る。

【０３５９】
この研究の投与レジメンは、０及び４週目、次いでｑ８ｗ（ＭＴＸあり又はなし）に、３０±１０分間にわたってＩＶ注入を介して投与された２ｍｇ／ｋｇのゴリムマブである。
【０３６０】
目的及び仮説
目的
主目的
この研究の主目的は、ＰｓＡの徴候及び症状の低減を評価することによって、活動性ＰｓＡを有する対象におけるゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇのＩＶ投与の有効性を評価することである。
【０３６１】
副次的目的
副次的目的は、ＩＶゴリムマブについて以下を評価することである。
・乾癬皮膚病変、身体機能、健康関連の生活の質、及び他の健康結果の改善に関連する有効性
・構造損傷の進行の阻害
・安全性
・薬物動態（ＰＫ）、薬力学（ＰＤ）、及び免疫原性
【０３６２】
仮説
研究の主目的に対処するために、統計的仮説（代替仮説）は、ゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇが、主要有効性エンドポイントに基づき、活動性ＰｓＡを有する対象の徴候及び症状を低減する際に、プラセボよりも統計的に優れていることである。この研究の一次エンドポイントは、１４週目に米国リウマチ学会基準（ＡＣＲ２０と呼ばれる）におけるベースラインからの２０％の改善を達成する対象の割合である。このエンドポイントは、規制当局及び臨床的ＰｓＡコミュニティによって十分に受け入れられているために選択された。
【０３６３】
研究デザイン及び根拠
試験デザインの概要
これは、活動性ＰｓＡを有する対象におけるプラセボと比較したＩＶゴリムマブの有効性及び安全性の３相多施設共同、無作為化、二重盲検、プラセボ対象研究である。約４４０人の対象が、約９０の治験実施機関で無作為化される。対象は、０、４、１２、及び２０週目にゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ又はプラセボＩＶ注入を受けるように無作為に割り当てられる。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる。それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。
【０３６４】
２４週目に、プラセボ注入を受けた全ての対象は、交差し、２４、２８週目、及びその後ｑ８ｗで５２週目までゴリムマブＩＶ注入を受け始める。ゴリムマブＩＶ処置群の対象は、２４週目にプラセボ注入を受けて、盲検を維持し、２８週目、及びその後ｑ８ｗで５２週目までゴリムマブＩＶ注入を受け続ける。データベースロック（Database lock、ＤＢＬ）は、２４及び６０週目に予定されている。
【０３６５】
対象は、最後の研究処置投与後に少なくとも８週間、ＡＥ及びＳＡＥに関して調査され

る。研究の終了は、最後の対象が６０週目の訪問を完了する時として定義される。
【０３６６】
図１８に、研究デザインの図が示される。
【０３６７】
研究デザインの根拠
試験母集団
標的研究集団は、スクリーニング時に乾癬性関節炎に関する分類基準（ＣＡＳＰＡＲ）[27]を満たす、少なくとも６か月間活動性ＰｓＡを有する、生物製剤を摂取していない対象である。
【０３６８】
処置群、投与量、及び用量投与間隔
対象は、以下のような２つの処置群のうちの１つに、０週目に無作為化される。
・群１（ｎ＝２２０）：ＩＶプラセボ注入
・群２（ｎ＝２２０）：ＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ
【０３６９】
対象は、０、４、１２、及び２０週目にゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ又はプラセボＩＶ注入を受けるように無作為に割り当てられる。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる。それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。２４週目に、プラセボ注入を受けた全ての対象は、交差し、２４、２８週目、及びその後ｑ８ｗで５２週目までゴリムマブＩＶ注入を受け始める。ゴリムマブＩＶ処置群の対象は、２４週目にプラセボ注入を受けて、盲検を維持し、２８週目、及びその後ｑ８ｗで５２週目までゴリムマブＩＶ注入を受け続ける。
【０３７０】
研究フェーズ及び治療期間
この研究では、スクリーニング、二重盲検プラセボ対照、積極的治療、及び安全性フォローアップの４つのフェーズがある。最大６週間のスクリーニングフェーズは、スクリーニング研究評価を実施し、研究適格性を判断するのに十分な時間を可能にする。研究の第２のフェーズは、０週目から２４週目までの二重盲検プラセボ対照フェーズである。研究の第３のフェーズは、２４週目から５２週目までの積極的治療フェーズである。研究の第４のフェーズは、安全性フォローアップフェーズであり、研究薬剤の最後の投与から８週間である。安全性フォローアップは、ゴリムマブの半減期の約５倍に相当する期間にわたって対象を監視することを可能にする。各対象の最初の処置割り当ては、６０週間の試験全体にわたって施設及び対象に対して盲検化されている。この期間は、ＰｓＡに対する維持療法としてのＩＶゴリムマブの有効性及び安全性を実証するのに十分な時間を提供する。
【０３７１】
この研究は、最後の対象が最後の予定された訪問（６０週目の訪問）を完了すると終了する。
【０３７２】
研究対照、無作為化、及び盲検
無作為化は、処置群に対する対象の評価における偏りを最小限に抑え、既知及び未知の対象属性（例えば、人口統計学的及びベースライン特性）が処置群にわたって均等にバランスがとれるようにする可能性を高め、かつ処置群にわたる統計的比較の妥当性を高めるために使用される。加えて、この研究の２つの群は、地理的領域及びベースラインＭＴＸ

使用（はい又はいいえ）に基づき階層化される。

【０３７３】

個々の対象及び治験責任医師は、研究期間にわたって盲検化されたままである。盲検処置は、データ収集中及び臨床的エンドポイントの評価中の潜在的な偏りを低減するために使用される。２つのＤＢＬは、２４及び６０週目の研究のために計画されている。第１のＤＢＬは、全ての対象が２４週目の訪問を完了した後、又は彼らの研究への参加を終了した後に行われる。第２のＤＢＬは、全ての対象が６０週目の訪問を完了した後、又は彼らの研究への参加を終了した後のいずれかに行われる。データベースは、２４週目にロックされ、その後、サマリーレベルデータは、選択された治験依頼者関係者に対して非盲検化される。限定された治験依頼者関係者は、データ分析及びデータレビューのために、このＤＢＬで非盲検化される。２４週目のＤＢＬに対する非盲検対象レベルデータへのアクセスを有する治験依頼者関係者の識別は、非盲検化前に文書化される。全ての施設関係者及び対象は、６０週目のＤＢＬが行われるまで、非盲検薬剤師を除いて、処置割り当てに対して盲検化されたままである。

【０３７４】

有効性評価

この研究のために選択された有効性評価は、ＰｓＡの治療のための治療用生物学的薬剤の以前の試験において確立された。このために選択された患者報告アウトカム（ＰＲＯ）は、ＰｓＡにおける他の研究に関する医療文献及び適用可能なＵＳ／ＥＵ規制ガイダンス文書で受け入れられている臨床的に関連する測定値と一致する。

【０３７５】

乾癬性関節炎及び乾癬応答評価は、以下を含む。

・対象の疼痛評価
・対象の疾患の包括的評価
・医師の疾患の包括的評価
・関節評価（腫脹関節数及び圧痛関節数）
・健康評価質問表の障害指標（ＨＡＱ－ＤＩ）
・乾癬の面積及び重症度指標（Psoriasis Area and Severity Index、ＰＡＳＩ）
・手及び足のＸ線写真
・３６項目ショートフォーム健康調査（ＳＦ－３６）
・指炎評価
・腱付着部炎評価
・Ｂａｔｈ強直性脊椎炎疾患活動性指標（ＢＡＳＤＡＩ）
・修正されたＮＡＰＳＩ
・皮膚科学的生活の質指標（ＤＬＱＩ）
・慢性疾患療法の機能評価（ＦＡＣＩＴ）－疲労
・労働生産性に関する質問票（ＷＬＱ）
・生産性ＶＡＳ
・ＥｕｒｏＱｏｌ－５Ｄ（ＥＱ－５Ｄ）質問票

【０３７６】

対象集団

研究に適格な対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも６か月間、ＰｓＡと診断された１８歳以上の男性又は女性であり、スクリーニング時にＣＡＳＰＡＲ基準を満たす。適格名対象のためのスクリーニングは、試験薬の投与前６週間以内に実施される。この研究に対象を登録するための組み入れ及び除外基準は、以下の２つのサブセクションに記載される。以下の組み入れ又は除外基準について疑問がある場合、治験責任医師は、この研究に対象を登録する前に適切な治験依頼者担当者に相談しなければならない。

【０３７７】

組み入れ基準

可能性のある対象はそれぞれ、この研究に登録されるために以下の基準の全てを満たさ

なければならない。
１．対象は、１８歳以上の男性又は女性でなければならない。
２．対象は、スクリーニングで実施される身体検査、病歴、バイタルサイン、及び１２誘導心電図（ＥＣＧ）に基づき、医学的に安定でなければならない。この判定は、対象のソースドキュメントに記録され、治験責任医師によって頭文字で略式署名されなければならない。
３．対象は、スクリーニングで実施される臨床検査室試験に基づき、医学的に安定でなければならない。肝臓酵素又は血液学を含む血清化学パネルの結果が正常な基準範囲外である場合、対象は、治験責任医師が異常又は正常からの逸脱が臨床的に有意ではないか、又は研究中の集団に対して適切かつ妥当であると判断した場合にのみ含まれ得る。この判定は、対象のソースドキュメントに記録され、治験責任医師によって頭文字で略式署名されなければならない。組み入れ基準番号５ｂ及び番号１８に記載される試験について、結果は、組み入れ基準番号５ｂ及び番号１８において許容される適格性範囲内でなければならない。
４．研究薬剤の初回投与の少なくとも６か月前にＰｓＡを有しており、スクリーニング時にＣＡＳＰＡＲ基準を満たしていること。
５．以下によって定義されるように、活動性ＰｓＡと診断されていること。
ａ．スクリーニング及びベースラインにおいて５つ以上の腫脹関節及び５つ以上の圧痛関節
及び
ｂ．スクリーニング時のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）≧０．６ｍｇ／ｄＬ。
６．ＰｓＡサブセット：ＤＩＰ関節障害、リウマチ結節が存在しない多発性関節炎、離断性関節炎、非対称性末梢関節炎、又は末梢関節炎を伴う脊椎炎のうちの少なくとも１つを有すること。
７．活動性尋常性乾癬を有するか、又は尋常性乾癬の文書化された履歴を有すること。
８．現在又は以前のＤＭＡＲＤ及び／又はＮＳＡＩＤ療法にもかかわらず、活動性ＰｓＡを有すること。ＤＭＡＲＤ療法は、ＤＭＡＲＤを少なくとも３か月間服用すること、又はＤＭＡＲＤ不耐性の証拠として定義される。ＮＳＡＩＤ療法は、ＮＳＡＩＤを少なくとも４週間服用すること、又はＮＳＡＩＤ不耐性の証拠として定義される。
９．無作為化の前に、女性は、以下のいずれかでなければならない。
・妊娠する可能性がないこと；初経前ではないこと；閉経後（少なくとも１２か月の無月経を有する４５歳超）ではないこと；永久的に不妊ではないこと（例えば、卵管閉塞、子宮摘出、両側卵管切除）；又はそうでなければ妊娠不能ではないこと。
・妊娠する可能性があり、かつ臨床研究に参加している対象に対する受胎調節方法の使用に関する地方条例に従う受胎調節の非常に効果的な方法：例えば、避妊の経口、注射、又は埋め込み式ホルモン方法の確立された使用を実施していること；子宮内避妊用具（ＩＵＤ）又は子宮内システムの配置；バリア法：殺精子フォーム／ゲル／フィルム／クリーム／坐剤付きのコンドーム、又は殺精子フォーム／ゲル／フィルム／クリーム／坐剤付きの閉塞キャップ（ペッサリー若しくは子宮頚部／円蓋キャップ）；男性パートナーの断種（精管切除したパートナーは、その対象の唯一のパートナーであるべきである）；真の禁欲（これが対象の好ましく、かつ通常の生活習慣と一致する場合）。
１０．妊娠する可能性のある女性は、スクリーニング時に陰性血清妊娠試験（β－ヒト絨毛性ゴナドトロピン［β－ＨＣＧ］）、及び無作為化前の０週目に陰性尿妊娠試験を受けなければならない。
１１．女性は、研究中、及び研究薬物の最後の投与を受けた後４か月間、妊娠しないか、又は生殖補助の目的で卵子（卵子、卵母細胞）を提供しないと同意しなければならない。
１２．妊娠する可能性のある女性との性行為に積極的であり、精管切除を受けていない男性は、研究中、及び研究薬剤の最後の投与を受けた後４か月間、受胎調節のバリア法、例えば、殺精子フォーム／ジェル／フィルム／クリーム／坐剤付きのコンドーム、又は殺

精子フォーム／ジェル／フィルム／クリーム／座薬付きの閉塞キャップ（ペッサリー若しくは子宮頚部／円蓋キャップ）を有するパートナーのいずれかを使用することに同意しなければならない。また、男性は全員、研究中及び研究薬剤の最後の投与を受けた後４か月間、精液を提供してはならない。

１３．以下の結核（tuberculosis、ＴＢ）スクリーニング基準に従って適格であると考えられること：

ａ．スクリーニング前に、潜在性又は活動性ＴＢの履歴がないこと。潜在性ＴＢの履歴を有し、潜在性ＴＢの治療を現在受けている対象については例外が認められ、研究薬剤の初回投与前に潜在性ＴＢのための治療を開始するか、又は研究薬剤の初回投与前５年以内に潜在性ＴＢのための適切な治療を完了したという文書を有すること。

ｂ．医療履歴及び／又は身体的検査の際に活動性ＴＢを示唆する徴候又は症状を有しないこと。

ｃ．活動性ＴＢを有する人と最近密接な接触がなかったこと、又はそのような接触があった場合は、ＴＢ専門医師に紹介して追加評価を受け、保証された場合は、研究薬剤の初回投与前に、潜在性ＴＢのための適切な治療を受けること。

ｄ．研究薬剤の初回投与前６週間以内に、陰性のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果を有するか、又は活動性ＴＢが除外され、潜在性ＴＢのための適切な治療が研究薬剤の初回投与前に開始されている、新たに同定された陽性のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果を有すること。ＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験がその国において承認／登録されていないか、又はツベルクリン皮膚検査（ＴＳＴ）が現地の保健機関によって命じられている場合、研究薬剤の初回投与前６週間以内に、陰性ＴＳＴ、又は活動性ＴＢが除外され、潜在性ＴＢのための適切な治療が研究薬剤の初回投与前に開始されている、新たに同定された陽性ＴＳＴが更に必要とされる。

ｉ．持続的に不確定なＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果を有する対象は、潜在的ＴＢが除外され、彼らの胸部Ｘ線写真がＴＢ（活動性又は陳旧性、非活動性ＴＢ）を示唆する異常を示さず、対象が治験責任医師によって判断されるようなＴＢの更なる危険因子を有しない場合、潜在性ＴＢのための治療なしに登録され得る。

ｉｉ．ＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験及びＴＳＴは、潜在性ＴＢの履歴及び潜在性ＴＢのための進行中の治療、又は上記のように十分な治療を完了したという文書を有する対象に対しては、スクリーニング時に必要とされない。上記のように十分な治療を完了したという文書を有する対象は、潜在性ＴＢのための更なる治療を開始する必要はない。

ｅ．研究薬剤の初回投与前３か月以内に撮影され、適格な有資格放射線科医によって読み取られた胸部Ｘ線写真（後－前像）を有し、現在の活動性ＴＢ又は陳旧性、非活動性ＴＢの兆候がないこと。

１４．ＭＴＸを使用する場合、対象は、研究薬剤の初回投与の少なくとも３か月前に２５ｍｇ／週を超えない用量で治療を開始しなければならず、ＭＴＸに起因する重大な毒性副作用を有してはいけない。メトトレキサートの投与経路及び用量は、研究薬剤の初回投与前少なくとも４週間、安定であるべきである。ＭＴＸを現在使用していない場合、研究薬剤の初回投与前少なくとも４週間、ＭＴＸを受けていてはならない。

１５．ＮＳＡＩＤ又はＰｓＡのための他の鎮痛剤を使用する場合、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、安定な用量でなければならない。ＮＳＡＩＤ又はＰｓＡのための他の鎮痛剤を使用していない場合、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間前、ＮＳＡＩＤ又はＰｓＡのための他の鎮痛剤を受けていてはならない。

１６．経口コルチコステロイドを使用する場合、対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、≦１０ｍｇのプレドニゾン／日に相当する安定用量でなければならない。現在、経口コルチコステロイドを使用していない場合、対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、経口コルチコステロイドを受けていてはならない。

１７．研究中に長時間の日光曝露を回避しなければならず、日焼け室又は他の紫外線源を使用してはならない。
１８．以下のパラメータ内のスクリーニング検査結果を有すること：
ａ．ヘモグロビン≧８．５ｇ／ｄＬ
ｂ．白血球≧３．５×１０^{3}／μＬ
ｃ．好中球≧１．５×１０^{3}／μＬ
ｄ．血小板≧１００×１０^{3}／μＬ
ｅ．血清クレアチニン≦１．５ｍｇ／ｄＬ
ｆ．ＡＳＴ、ＡＬＴ、及びアルカリホスファターゼのレベルは、試験を実施する実験室のＵＬＮ範囲の１．５倍以内でなければならない。
１９．対象は、このプロトコルに指定された禁止事項及び制限事項を守る意思があり、それが可能でなければならない。
２０．それぞれの対象は、各自が研究の目的とそれに必要な手順を理解し、研究に参加する意思があることを示す、インフォームドコンセントフォーム（ＩＣＦ）に署名する必要がある。
２１．各対象は、研究のために任意選択的なＤＮＡ試料を提供することに合意する場合（地域の規制により認められている場合）、別個のインフォームドコンセントフォームに署名しなければならない。任意選択的なＤＮＡ研究試料に対して承諾を拒否しても、この研究のへの参加から対象を除外することはない。
２２．初回の研究薬剤投与前２週間以内、及び研究期間全体にわたって、アーユルヴェーダ療法医学、漢方薬（複数可）、及び鍼治療を含む補完医療の使用を控える意思があること。

【０３７８】

除外基準

以下の基準のうちのいずれかを満たす任意の潜在的な対象は、この研究の参加から除外される：
１．ＲＡ、ＡＳ、全身性エリテマトーデス、又はライム病が挙げられるがこれらに限定されない、ゴリムマブ療法の利益の評価を混乱させる可能性がある他の炎症性疾患を有する場合。
２．研究に登録されている間、又は研究薬剤の最後の投与を受けた後４か月以内に、妊娠、授乳、又は妊娠若しくは父親になることを計画している場合。
３．インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、ゴリムマブ、及びセルトリズマブペゴルが挙げられるがこれらに限定されない、ＴＮＦαを低減するために標的とされる任意の生物学的薬剤を使用していた場合。
４．トシリズマブをこれまでに受けていた場合。
５．クロラムブシル、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、又は他のアルキル化剤を含む、細胞毒性薬物をこれまでに使用していた場合。
６．ナタリズマブ、エファリズマブ、又はＢ若しくはＴ細胞を枯渇させる薬剤（例えば、リツキシマブ、アレムツズマブ、若しくはビシリズマブ）をこれまでに受けていた場合。
７．アレファセプトをこれまでに受けていた場合。
８．アバタセプトをこれまでに受けていた場合。
９．トファシチニブ又は任意の他のヤヌスキナーゼ阻害剤（Janus kinase inhibitor、ＪＡＫ）の阻害剤をこれまでに受けていた場合。
１０．ウステキヌマブをこれまでに受けていた場合。
１１．抗ＩＬ１７療法（例えば、ブロダルマブ、イキセキズマブ、及びセクキヌマブ）をこれまでに受けていた場合。
１２．ヒト免疫グロブリン又はゴリムマブ若しくはその賦形剤に対する既知のアレルギー、過敏症、又は不耐性。
１３．研究薬剤の初回投与前４週間以内に、ＭＴＸ以外の任意の全身性免疫抑制薬又は

ＤＭＡＲＤを受けていた場合。これらの分類の薬剤としては、スルファサラジン（ＳＳＺ）、ヒドロキシクロロキン（ＨＣＱ）、アザチオプリン、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、金、及びペニシラミンが挙げられるが、これらに限定されない。

１４．研究薬剤の初回投与前４週間以内にレフルノミドを受けているか（薬物消失手順を受けることに関係なく）、又は研究薬剤の初回投与前３か月以内にレフルノミドを受けており、薬物排除手順を受けていない場合。

１５．研究薬剤の初回投与前４週間以内に、乾癬又は皮膚評価に影響を及ぼし得る任意の全身性薬剤／治療（注射可能なコルチコステロイド、レチノイド、１，２５ジヒドロキシビタミンＤ３及び類似体、プソラレン、スルファタラジン、ヒドロキシ尿素、フマル酸誘導体、又は光線療法が挙げられるが、これらに限定されない）を受けていた場合。

１６．任意の研究薬剤の初回投与前２週間以内に、乾癬又は皮膚評価に影響を及ぼし得る局所用薬剤／治療（コルチコステロイド、アントラリン、カルシポトリエン、局所用ビタミンＤ誘導体、レチノイド、タザロテン、メトキサレン、トリメチルプソラレン、ピメクロリムス、及びタクロリムスが挙げられるが、これらに限定されない）を使用していた場合。

１７．研究薬剤の初回投与前４週間の間に、副腎皮質ホルモンを含む、硬膜外、関節内、ＩＭ、又はＩＶコルチコステロイドを受けていた場合。

１８．現在リチウムを受けているか、又は研究薬剤の初回投与前４週間以内にリチウムを受けていた場合。

１９．研究薬剤の初回投与前３か月以内、研究中、又は研究薬剤の最後の投与後３か月以内に、任意の生ウイルス又は細菌ワクチン接種を受けていたか、又は受けることが予想される場合。

２０．慢性腎感染症、慢性胸部感染症（例えば、気管支拡張症）、副鼻腔炎、再発性尿路感染症（例えば、再発性腎盂腎炎）、開放、排膿、若しくは感染した皮膚創傷、又は潰瘍が挙げられるがこれらに限定されない、慢性又は再発性の感染症の履歴があるか又は進行中である場合。

２１．感染した関節プロテーゼの履歴を有するか、又はそのプロテーゼが除去若しくは置き換えされていない場合、関節プロテーゼの疑いのある感染のための抗生物質をこれまでに受けていた場合。

２２．研究薬剤の初回投与前２か月以内に、深刻な感染症（肝炎、肺炎、敗血症、若しくは腎盂腎炎が挙げられるが、これらに限定されない）を有していたか、又は感染のために入院していたか、又は感染のためのＩＶ抗生物質で治療されていた場合。

２３．スクリーニング前に、ヒストプラスマ症又はコクチジオイデス真菌症を含む、活動性肉芽腫性感染症の履歴を有する場合。潜在性ＴＢの履歴を有する適格性に関する情報については組み入れ基準を参照のこと。

２４．１２か月間のスクリーニングのうちに、Ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）ワクチン接種を有していた場合。

２５．悪性腫瘍又はＴＢを含む現在の活動性感染症を示唆する異常を示す、研究薬剤の初回投与前３か月以内の胸部Ｘ線写真を有する場合。

２６．スクリーニング前６か月以内に、非結核性抗酸菌症又は日和見感染症（例えば、サイトメガロウイルス、ニューモシスティス症、アスペルギロシス症）を有していた場合。

２７．研究薬剤の初回投与前２か月以内に、帯状ヘルペス感染症を有するか、又は有していた場合。

２８．対象は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）抗体陽性の履歴を有するか、又はスクリーニング時にＨＩＶ検査結果が陽性である。

２９．Ｂ型肝炎感染症を有する場合。対象は、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のスクリーニングを受けなければならない。少なくとも、これには、ＨＢｓＡｇ（ＨＢＶ表面抗原）、抗ＨＢｓ（ＨＢＶ表面抗体）、及び抗ＨＢＣ合計（ＨＢＶコア抗体合計）のための試験が含まれる。

３０．スクリーニング前に６か月の差で、２つの陰性ＨＣＶ　ＲＮＡ試験結果を有し、かつスクリーニング時に第３の陰性ＨＣＶ　ＲＮＡ試験結果を有しない限り、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）に対する抗体に対して血清陽性である対象。

３１．重度、進行性、又は制御されていない腎臓、肝臓、血液、胃腸、内分泌、肺、心臓、神経系、脳、又は精神疾患の現在の徴候又は症状を有する場合。

３２．医学的に制御された無症候性ＣＨＦを含む、同時のうっ血性心不全（ＣＨＦ）の履歴を有する場合。

３３．移植器官を有する場合（研究薬剤の初回投与前３か月を超えた角膜移植を除く）。

３４．リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患の既知の履歴、あるいは異常な大きさ若しくは位置のリンパ節腫脹、臨床的に有意な脾腫、又は意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症などの可能性のあるリンパ増殖性疾患を示唆する徴候及び症状既知を有する場合。

３５．多発性硬化症又は視神経炎などの既知の脱髄疾患の履歴を有する場合。

３６．対象は、スクリーニング前５年以内に悪性腫瘍の履歴を有する場合（例外は、最初の研究薬剤投与前少なくとも３か月間、再発の兆候なしで治療された皮膚の扁平上皮及び基底細胞癌、並びに外科的に治療された子宮頸部の上皮内癌である）。

３７．対象は、計画された研究薬剤の初回投与前に、任意の許可されない療法、併用療法を受けていた。

３８．対象は、５半減期又は３か月のどちらかより長い方のうちに治験薬（治験ワクチンを含む）を受けているか、又は計画された研究薬剤の初回投与前３か月以内に侵襲的治験医療デバイスを使用していたか、又は治験研究に現在登録されている。

３９．対象は、治験責任医師の意見によって、参加が対象の利益を最優先にしていない（例えば、健康状態を損なう）か、又はプロトコル指定の評価を妨げる、制限する、若しくは混乱させ得るような任意の状況を有する。

４０．対象は、スクリーニング前１か月以内に大手術（例えば、全身麻酔を必要とする）を受けていたか、又は手術から完全に回復していないか、又は対象が研究に参加することが予想される期間中、若しくは研究薬剤投与の最後の投与後１か月以内に手術を予定している。

４１．不十分な忍容性、又は静脈への容易なアクセスが欠いているため、複数の静脈穿刺を受けることができないこと、又は受ける意思がない場合。

４２．過去３か月以内に、薬物乱用（薬物又はアルコール）の問題があったことが既知である場合。

４３．対象は、治験責任医師又は研究施設の指示に従って提案された研究又は他の研究に直接関与している、治験責任医師又は研究施設の雇用者、並びにこの雇用者又は治験責任医師の家族である。

【０３７９】

禁止及び制限

潜在的な対象は、参加に適格であるために、研究の間に以下の禁止及び制限を順守する意思があり、かつそれが可能でなければならない。

１．妊娠する可能性がある異性との性行為に積極的な女性、及び子供の父親になることが可能な男性の両方が、非常に効果的な避妊方法を使用し、研究期間中、及び研究薬剤の最後の投与後４か月間、避妊の使用を継続することに同意しなければならない。

２．以下の薬物の使用は、ＩＶ研究薬剤投与と同時に許可されない。

・ＴＮＦαの低減を標的とした生物学的薬剤（インフリキシマブ、ＳＣゴリムマブ、セルトリズマブペゴル、エタネルセプト、ｙｉｓａｉｐｕ、ＣＴ－Ｐ１３［Ｒｅｍｓｉｍａ（登録商標）］、及びアダリムマブが挙げられるが、これらに限定されない）。

・ＩＬ－１ｒａ（アナキンラ）

・トシリズマブ、又はＩＬ－６若しくはＩＬ－６受容体を標的とする任意の他の生物製剤

・トファシチニブ又は任意の他のＪＡＫ阻害剤

・Ｂ細胞枯渇剤（例えば、リツキシマブ）
・シクロホスファミド、クロラムブシル、ナイトロジェンマスタードなどの細胞毒性薬物、又は
・他のアルキル化剤
・アバタセプト
・ウステキヌマブ
・抗ＩＬ－１７剤（例えば、ブロダルマブ、セクキヌマブ、及びイキセキズマブ）
・治験薬

３．以下の薬物の使用は許可されない：ＳＳＺ、ＨＣＱ、アザチオプリン、経口シクロスポリンＡ、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、経口又は非経口金を含む、全身性免疫抑制薬又はＤＭＡＲＤ（ＭＴＸ以外）。唯一の例外は、１６週目の早期離脱に適格な対象に対するＳＳＺ、ＨＣＱ、又はレフルノミドの使用である。

４．研究中に生ウイルス又は生細菌ワクチン接種を受けないことに同意しなければならない。対象はまた、研究薬剤の最後の投与を受けた後３か月間、生ワクチンを受けないことにも同意しなければならない。１２か月間のスクリーニングのうちに、Ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）ワクチン接種を有していてはならない。

５．この研究のための研究薬剤以外の治験医療デバイス又は治験薬を受けないことに同意しなければならない。

６．アスピリン及び選択的シクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）－２阻害剤を含むＮＳＡＩＤ、並びに他の鎮痛剤で治療された対象は、研究が行われている国で承認された通常の市販用量を受けるべきである。ＮＳＡＩＤ及び他の鎮痛剤の処方は、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、及び２４週目まで調節されるべきではなく、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ変更され得る。２４週目の後から５２週目まで、単回用量の減少が許可される。そうでなければ、ＮＳＡＩＤ及び他の鎮痛剤の処方は、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ変更され得る。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、ＮＳＡＩＤの単回開始、又は彼らのＮＳＡＩＤ用量の増加を有し得る。

カプサイシン及びジクロフェナクを含む局所鎮痛剤の使用が許可される。

７．経口コルチコステロイドで治療された対象は、彼らの研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、１日あたり１０ｍｇ以下のプレドニゾンに相当する安定用量を受け、この用量を２４週目まで受け続けるべきである。２４週目の後及び５２週目まで、経口コルチコステロイドの単回用量の減少が許可される。そうでなければ、経口コルチコステロイドの用量及び種類は、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ、治験責任医師の裁量で変更され得る。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、彼らの経口コルチコステロイド用量の単回開始又は増加を有し得る（１０ｍｇ／日のプレドニゾンの最大総用量又は同等）。

コルチコステロイドの硬膜外、ＩＭ、又はＩＶ投与は、研究薬剤の初回投与前４週間以内には許可されず、研究全体を通してＰｓＡの治療のために許可されない。ＰｓＡ以外の兆候のための研究中の硬膜外、ＩＭ、及びＩＶコルチコステロイドの使用を避けるために、あらゆる試みが行われるべきである。ＰｓＡ以外の兆候のための長期（２週間超）の経口又はＩＶコルチコステロイドは、研究全体を通して許可されない。ＰｓＡ以外の兆候に使用される短期（≦２週間）の経口、ＩＶ、ＩＭ、又は硬膜外コルチコステロイドは、治療医師の意見によって適切な代替物がない状況に限定されるべきである。

関節内ステロイドは、研究薬剤の初回投与前４週間以内に投与されるべきではない。特に研究の最初の２４週間の間、関節内コルチコステロイド注射を避ける試みが行われなければならない。しかしながら、必要であれば、対象は、６０週間の研究の間、２つ以下の影響を受けた部位に最大２つの関節内、腱鞘、又は嚢のコルチコステロイド注射を受けてもよい。

８．伝統的な医学（例えば、漢方、鍼治療、アーユルヴェーダ療法医学）が挙げられるがこれらに限定されない、ＰｓＡ疾患活動性又は評価に影響を及ぼし得る補完療法の使用は、６０週目まで禁止されている。

【０３８０】
処置割り付け及び盲検化
適格な対象は、盲検様式で、０週目に一定用量のゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ又はプラセボを受けるために、自動ウェブ応答システム（ＩＷＲＳ）を使用して無作為に割り当てられる。処置群への対象割り当ては、２つの処置群のうちの１つに１：１の比で、階層化ブロック無作為化法を使用して行われる。層別因子は、地理的領域及びベースラインＭＴＸ使用（はい又はいいえ）である。これにより、ベースラインＭＴＸ使用と、各地理的領域内の対象の数に対する相対的な処置バランスを確実にする。
【０３８１】
ゴリムマブに割り当てられた対象は、５２週目まで２ｍｇ／ｋｇを受ける。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる。それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。
【０３８２】
プラセボに割り当てられた対象は、２４週目にゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇに交差し、２４、２８週目、及びｑ８ｗで５２週目までゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇを受ける。ゴリムマブＩＶ処置群の対象は、同じ用量でゴリムマブＩＶ注入を受け続ける。加えて、ゴリムマブＩＶ処置群の対象は、盲検を維持するために、２４週目にＩＶプラセボを受ける。対象及び治験研究施設は、研究全体を通して最初の割り当てられた処置群に盲検化されたままである。
【０３８３】
通常の状況下では、盲検は、６０週間のＤＢＬまで個々の対象に対して解除されるべきではない。そうでない場合には、対象の治療ステータスを知ることによって特定の緊急治療／一連の対処が示され得る場合に限り、盲検は解除されるべきである。緊急時には、治験責任医師は、ＩＷＲＳからの処置の同一性を決定してもよい。治験責任医師は、可能であれば治験依頼者又はその被指名人に連絡して、具体的な状況について検討することが推奨される。治験依頼者又はその被指名人との電話連絡は、毎日２４時間、週７日間可能である。盲検が解除された場合、治験依頼者には可及的速やかに通知しなければならない。非盲検化の日付及び理由は、施設関係者によってｅＣＲＦ及びソースドキュメントに文書化されなければならない。治験責任医師はまた、研究施設又は治験依頼者関係者に対して、研究処置割り当てを明らかにしないようにアドバイスされる。
【０３８４】
処置割り当てが非盲検化されていた対象は、予定された評価のために戻り続けることが予想される。更なる研究薬剤投与は、研究責任医師によって検討されるべきである。２４週目のＤＢＬにおいて、対象が研究になおも参加している間に、データは、限定された治験依頼者関係者に対して分析のために非盲検化される。非盲検対象レベルデータへのアクセスを有する治験依頼者関係者の識別は、非盲検化前に文書化される。治験研究施設及び対象は、６０週目のデータベースがロックされた後まで、最初の処置割り当てに対して盲検化されたままである。
【０３８５】
処置割り当て（即ち、研究薬剤血清濃度、研究薬剤に対する抗体、処置割り当て、及び研究薬剤調製／説明責任データ）を潜在的に非盲検化し得るデータは、特別に注意して取り扱われ、これにより、非盲検化の前に、そのようなデータは、データクリーニングの目的でデータ管理スタッフ、並びに妥当な場合、ゴリムマブに対する薬物動態及び抗体分析を実施する目的で臨床薬理学代表者、及び独立した薬物監査を実施する目的で品質保証代

表者のみが入手可能である。
【０３８６】
所与の対象の処置割り当ては、規制報告要件を満たすために、治験依頼者、ＩＲＢ／ＥＣ、及び施設関係者に対して非盲検化されてもよい。
【０３８７】
投与量及び投与
投与レジメン及び盲検化
研究薬剤の第１の注入前に、対象は、以下の２つの処置群のうちの１つに１：１の比で無作為に割り当てられる。
群Ｉ（ｎ＝２２０）：対象は、０、４、１２、及び２０週目にＩＶプラセボ注入を受ける。対象は、２４週目にＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇに交差し、２４、２８週目、及びその後ｑ８ｗに投与を受ける。
群ＩＩ（ｎ＝２２０）：対象は、０、４週目、及びその後ｑ８ｗにＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇを受ける。対象は、盲検を維持するために、２４週目にＩＶプラセボ注入を受ける。
注記：全ての注入は、３０±１０分間かけて完了する。
【０３８８】
早期離脱
１６週目に、腫脹関節数及び圧痛関節数の両方におけるベースラインからの５％未満の改善を有する群Ｉ及びＩＩにおける全ての対象が、二重盲検様式で早期離脱に入る。１６週目に、早期離脱対象である全ての対象は、治験者によって選択されるような、以下の併用薬介入のうちの１つが認められる。それらのコルチコステロイド用量（最大総用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ用量（最大総用量２５ｍｇ／週）、若しくはＮＳＡＩＤ用量の増加、又はＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド（最大用量プレドニゾン１０ｍｇ／日若しくは同等）、ＭＴＸ（最大用量２５ｍｇ／週）、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（最大投与量２０ｍｇ／日）の開始。安定用量のこれらの薬剤への滴定は、２４週目の訪問までに早期離脱対象である対象に対して完了されるべきである。
【０３８９】
研究薬剤投与及びタイミング
全てのベースライン後訪問は、指示された週±４日に行われ得る４週目、１２週目、１４週目、１６週目、及び２４週目の訪問を除き、研究全体を通して指定された週±７日に行われ得る。推奨される許容可能な時間帯が順守できない場合、治験依頼者には、訪問を予定に入れる前に連絡しなければならない。
【０３９０】
研究前及び同時療法
２４週目まで、又は以下のセクションで指定されるように、対象の併用薬を安定した状態に保持するためにあらゆる努力をするべきである。併用薬用量は、低減され得るか、又は投薬治療は、異常な検査値、副作用、併発症、又は外科処置の性能を理由に一時的に中断され得るが、変化及び変化の理由は、対象の医療記録に明確に文書化されるべきである。
【０３９１】
対象は、早期離脱に適格な対象についての１６週目を除いて、研究中にＰｓＡのための任意の新たな治療を開始するべきではない。
【０３９２】
併用薬レビューは、時間及びイベントスケジュールにおいて特定された研究訪問において行われる。
【０３９３】
メトトレキサート
対象は、安定用量のＭＴＸを服用して研究に入ることが許可される。

【０３９４】
対象がＭＴＸを使用している場合、治療は、研究薬剤の初回投与の少なくとも３か月前に開始されているべきである。ＭＴＸの投与経路及び２５ｍｇ以下／週の用量は、研究薬剤の初回投与前少なくとも４週間、安定であるべきである。この研究でＭＴＸを服用した全ての対象は、少なくとも５ｍｇの経口葉酸塩又は５ｍｇの葉酸を毎週受けることが推奨される。
【０３９５】
ＭＴＸによる治療を受けていない対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも４週間、治療を中断していなければならず、６０週目までＭＴＸを受けてはならない。（ＳＩＭＰＯＮＩ　ＩＶ（ｇｏｌｉｍｕｍａｂ）Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　ＣＮＴＯ１４８ＰＳＡ３００１　Ａｍｅｎｄｍｅｎｔ　２　４５　Ａｐｐｒｏｖｅｄ，２９　Ｊｕｎｅ　２０１６）１６週目の早期離脱に適格な対象に対して例外が認められる。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、彼らのＭＴＸ用量を開始し得るか、又はその単回増加を有し得る（２５ｍｇ／週の最大総用量）。
【０３９６】
ＭＴＸを開始する対象について、安定用量への滴定は、２４週目の訪問までに完了されるべきである。ＭＴＸを受けている対象については、研究の６０週目までこの薬剤の安定用量及び投与経路を維持するために、あらゆる努力をするべきである。しかしながら、ＭＴＸの用量は、毒性の場合に減少し得る。ＭＴＸ毒性の場合の用量調節に関するガイドラインは、Ｔｒｉａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｆｉｌｅに含まれる。
【０３９７】
コルチコステロイド
ＰｓＡのために経口コルチコステロイドで治療された対象は、研究薬剤の初回投与前少なくとも２週間、１日あたり≦１０ｍｇのプレドニゾンに相当する安定用量を受け、この用量を６０週目まで受け続けるべきである。ベースラインにおいて経口コルチコステロイドで治療されていない対象は、研究薬剤の初回投与の少なくとも２週間前に経口コルチコステロイドを中断していなければならず、彼らは、６０週目まで経口コルチコステロイドを受けてはならない。
【０３９８】
１６週目の早期離脱に適格な対象に対して例外が認められる。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、彼らの経口コルチコステロイド用量を開始し得るか、又はその単回増加を有し得る（１０ｍｇ／日のプレドニゾンの最大総用量又は同等）。
【０３９９】
２４週目の後及び６０週目まで、経口コルチコステロイドの単回用量の減少が許可される。そうでなければ、経口コルチコステロイドの用量及び種類は、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ、治験責任医師の裁量で変更され得る。
【０４００】
ＰｓＡの治療のためのコルチコステロイドの静脈内、筋肉内、又は硬膜外投与は、研究全体を通して許可されない。
【０４０１】
ＰｓＡ以外の兆候のための長期（２週間超）の経口又はＩＶコルチコステロイドは、研究全体を通して許可されない。ＰｓＡ以外の兆候に使用される短期（≦２週間）の経口、ＩＶ、ＩＭ、又は硬膜外コルチコステロイドは、治療医師の意見によって適切な代替物がない状況に限定されるべきである。コルチコステロイドの吸入、耳、眼、鼻腔内、及び粘膜送達の他の経路は、研究の過程全体を通して許可される。
【０４０２】
特に研究の最初の２４週間の間、関節内コルチコステロイド注射を避ける試みが行われなければならない。しかしながら、必要であれば、対象は、６０週間の研究の間、２つ以下の影響を受けた部位に最大２つの関節内、腱鞘、又は嚢のコルチコステロイド注射を受けてもよい。単一関節における重度の圧痛又は腫脹の場合、対象は、関節内コルチコステ

ロイド注射を受ける前に感染症について評価されることが提案される。
【０４０３】
非ステロイド性抗炎症薬及び他の鎮痛剤
安定用量のＮＳＡＩＤ及び他の鎮痛剤の使用が許可される。
【０４０４】
アスピリン及び選択的シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤を含むＮＳＡＩＤ、並びに他の鎮痛剤で治療された対象は、研究が行われている国で承認されている通常の市販用量を受けるべきであり、研究薬剤の初回投与の少なくとも２週間前に安定用量を服用しているべきである。２４週目まで、ＮＳＡＩＤ及び他の鎮痛剤の用量及び種類は、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ変更され得る。
【０４０５】
１６週目の早期離脱に適格な対象に対して例外が認められる。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、彼らのＮＳＡＩＤ用量を開始し得るか、又はその単回増加を有し得る。ＮＳＡＩＤを開始する対象について、安定用量への滴定は、２４週目の訪問までに完了されるべきである。
【０４０６】
２４週目の後及び６０週目まで、単回用量の減少が許可される。そうでなければ、ＮＳＡＩＤ及び他の鎮痛剤の処方は、対象が許容できない副作用を生じた場合にのみ変更され得る。
【０４０７】
カプサイシン及びジクロフェナクを含む局所鎮痛剤の使用が許可される。
【０４０８】
この試験では、アスピリンは、心臓血管又は脳血管疾患のために処方された低用量アスピリンを除いて、ＮＳＡＩＤと見なされる。
【０４０９】
疾患修飾性抗リウマチ薬／全身性免疫抑制薬
ＭＴＸを除いて、疾患修飾性抗リウマチ薬／全身性免疫抑制薬は、研究薬剤の初回投与の少なくとも４週間前に中断されなければならず、６０週目まで禁止されている。これらのＤＭＡＲＤとしては、ＳＳＺ、ＨＣＱ、金製剤、ペニシラミン、及びレフルノミドが挙げられるが、これらに限定されない。対象が研究薬剤の初回投与前３か月以内にレフルノミドを受けた場合、対象は、薬物排除手順を受けていなければならない。
【０４１０】
早期離脱に適格な対象に対して例外が認められる。１６週目に、早期離脱に適格な対象は、ＳＳＺ（最大用量３ｇ／日）、ＨＣＱ（最大用量４００ｍｇ／日）、又はレフルノミド（２０ｍｇ／日の最大用量）の単回開始を有し得る。ＳＳＱ、ＨＣＱ、又はレフルノミドを開始する対象について、安定用量への滴定は、２４週目の訪問までに完了されるべきである。
【０４１１】
６０週目まで禁止された全身性免疫抑制薬としては、シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、及びアザチオプリンが挙げられるが、これらに限定されない。（Ｓｙｓｔｅｍｉｃ　ＳＩＭＰＯＮＩ　ＩＶ（ｇｏｌｉｍｕｍａｂ）Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　ＣＮＴＯ１４８ＰＳＡ３００１　Ａｍｅｎｄｍｅｎｔ　２　４７　Ａｐｐｒｏｖｅｄ，２９　Ｊｕｎｅ　２０１６）免疫抑制薬は、コルチコステロイドを指さない。
【０４１２】
生物学的薬剤、細胞毒性薬物、又は治験薬
生物学的薬剤（例えば、ＳＣゴリムマブ、アナキンラ、エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブ、アレファセプト、エファリズマブ、リツキシマブ、ナタリズマブ）、細胞毒性剤（例えば、クロラムブシル、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、他のアルキル化剤）、又は治験薬の使用は、６０週間の研究中に許可されない。これ

らの薬剤のいずれかが使用される場合、対象は、更なる研究薬剤の注入から中断される。

【０４１３】

補完療法

アーユルヴェーダ療法医学、漢方薬、又は鍼治療などの非薬物療法を含む補完療法の使用は、６０週間の研究中に許可されない。

【０４１４】

局所療法及び紫外線Ｂ光

乾癬に対する局所用薬剤／治療（例えば、コルチコステロイド角質溶解薬［研究全体を通して許可されるサリチル酸シャンプーを除く］、コールタール［研究全体を通して許可されるコールタールシャンプーを除く］、アントラリン、ビタミンＤ３類似体、又は局所用タロリムス、及びレチノイド）の同時使用は、２４週目まで許可されない。

【０４１５】

対象は、研究訪問前の午前中にサリチル酸及びタール含有シャンプーを使用するべきではない。非薬用シャンプーは、訪問の日に使用され得る。

【０４１６】

２４週目の注入後、病巣内コルチコステロイドを含む局所療法が、高及び超高効力コルチコステロイド（クラスＩ及びＩＩ）を除いて使用され得る。ＵＶＢ又は日焼けベッドは、６０週目まで許可されない。対象は、研究中に長時間の日光曝露を避けることが奨励されるべきである。

【０４１７】

乾癬の全身療法

乾癬に対する全身療法の同時使用（例えば、紫外線Ａ［ＰＵＶＡ］とソラレン、全身性レチノイド、シクロスポリン、又はタクロリムス）は、６０週目まで許可されない。全身性抗乾癬療法の使用は、研究薬剤の初回投与の少なくとも４週間前に中断されなければならない。

【０４１８】

研究評価

研究手順

概論

妊娠する可能性がある女性に対してのみ、治験責任医師によって必要と判断されるか、又は地方規制によって必要とされる場合、追加の血清又は尿妊娠試験が実施されて、対象の研究への参加中の任意の時点で妊娠がないことを確証することができる。また、追加のＴＢ試験は、治験責任医師によって必要と判断されるか、又は地方規制によって必要とされる場合に実施され得る。

【０４１９】

全ての訪問別ＰＲＯ評価は、その訪問に対して任意の試験、手順、又は他の相談前に実施されて、対象の認識に影響を及ぼすことを防止するべきである。更なる詳細については、ＰＲＯユーザマニュアルを参照する。

【０４２０】

ロジスティック的に実行不可能でない限り、時間及びイベントスケジュールにおいて指定された順序で全ての他の評価を実施するためにあらゆる努力をするべきであり、可能であれば、同じ個人（複数可）は、各訪問において評価を実施するべきである。

【０４２１】

薬物動態マーカーの分析のための血清及び全血（遺伝子発現分析用）は、全ての対象から収集される。０及び２４週目に、ＤＮＡ分析のための全血試料は、研究の任意選択的な薬理ゲノム学的（ＤＮＡ）要素に参加することに同意した対象からのみ収集される。ＤＮＡ分析のための血液試料は、地方規制によって許可された場合にのみ収集される。薬理ゲノム学的研究のための血液試料の収集及び取り扱いに関する詳細については、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｍａｎｕａｌ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｓａｍｐｌｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｓｈｉｐｍｅｎｔ Ｐ

ｒｏｃｅｄｕｒｅｓを参照のこと。ＤＮＡ抽出に失敗した場合、対象から代替の薬理ゲノム学的血液試料が要求され得る。署名されたインフォームドコンセントは、代替試料を得るために必要とされる。

【０４２２】

各対象からのこの研究で収集される全血量は、主要な研究のために約２５３ｍＬであり、任意選択的なＤＮＡ試験のために２０ｍＬである。

【０４２３】

反復又は予定されていない試料は、安全上の理由で、又は試料に関する技術的問題のために採取され得る。

【０４２４】

スクリーニングフェーズ

書面によるインフォームドコンセントが得られた後、かつ無作為化前６週間の期間内に、全てのスクリーニング評価が実施される。スクリーニング訪問は、１回を超える訪問に分割され得る。例えば、インフォームドコンセントを得た後、治験責任医師は、最初の訪問において全ての検査室試験を完了する。次いで、対象が中央検査室試験結果によって判定されたように研究に適格である場合にのみ、対象は、スクリーニング手順の残りの部分に戻る。組み入れ基準の全てを満たし、かつ除外基準のいずれも満たさない対象が、研究に登録される。各対象について、研究の時間及びイベントスケジュールに順守するためにあらゆる努力をするべきである。対象は、研究の任意選択的な薬理ゲノム学的研究要素に参加するために、別個の書面の薬理ゲノム学的インフォームドコンセントを提供しなければならない。

【０４２５】

妊娠する可能性のある女性は、スクリーニング時に陰性血清妊娠試験、及び無作為化前に陰性尿妊娠試験を受けなければならない。妊娠する可能性がある女性及び子供の父親になることが可能な男性の両方が、非常に効果的な避妊方法を使用し、研究期間中及びその後４か月間、避妊の使用を継続することに同意しなければならない。各対象によって使用される避妊法（複数可）は、文書化されなければならない。

【０４２６】

１２誘導ＥＣＧは、いかなる理由でも研究中に対象がＥＣＧを必要とする場合、最初の研究薬剤投与前のＥＣＧが、変化を検出するための比較のために利用可能であることを確実にするために、スクリーニング時に現地で実施される。

【０４２７】

胸部Ｘ線検査（後－前［ＰＡ］）は、対象が、ＴＢを含む悪性又は現在の活動性感染症を示唆するいかなる異常も有さないことを確実にするために、スクリーニング時に実施される。研究薬剤の初回投与の最大３か月前に撮影された胸部Ｘ線が使用され得る。

【０４２８】

対象は、ＴＢのための試験を受けなければならず、彼らの病歴評価は、ＴＢの履歴、又は活動性ＴＢを有する個人への既知の職業性又は他の個人的曝露に関する特定の質問を含んでいなければならない。対象は、胸部Ｘ線検査結果及びツベルクリン皮膚又は他のＴＢ試験に対する応答を含む、ＴＢの過去の試験に関して質問されるべきである。

【０４２９】

陰性のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果（及びＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験が承認／登録されていないか、又はＴＳＴが現地の保健機関によって命じられている国における陰性のＴＳＴ結果）を有する対象は、無作為化前の手順を継続する資格がある。新たに同定された陽性のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験（又はＴＳＴ）結果を有する対象は、活動性ＴＢを除外するための評価を受け、第１の用量の研究薬剤の投与前に潜在性ＴＢのための適切な治療を開始しなければならない。活動性ＴＢの兆候がない潜在性ＴＢのための治療を現在受けている対象、又は潜在性ＴＢの履歴を有し、かつ研究薬剤の初回投与前５年以内に潜在性ＴＢのための適切な治療を完了しているという文書を有する対象については、

例外が認められる。これらの対象は、スクリーニング中にＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験（又はＴＳＴ）で再試験される必要はない。潜在性ＴＢのための適切な治療は、免疫不全患者に対する現地の国のガイドラインに従って定義される。免疫不全患者に対する現地の国のガイドラインが存在しない場合、米国ガイドラインに従わなければならないか、又は対象は、研究から除外されなければならない。以前の抗ＴＢ治療の妥当性を検証し、適切な文書を提供することは、治験責任医師の責任である。

【０４３０】

第１のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果が不確定である対象は、試験を繰り返すべきである。第２のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果も不確定である場合、対象は、潜在的ＴＢが除外され、彼らの胸部Ｘ線写真がＴＢ（活動性又は陳旧性、非活動性ＴＢ）を示唆する異常を示さず、対象が治験責任医師によって判断されるようなＴＢの更なる危険因子を有しない場合、潜在性ＴＢのための治療なしに登録され得る。この判定は、治験依頼者のメディカルモニターに速やかに報告され、対象のソースドキュメントに記録され、治験責任医師によって頭文字で略式署名されなければならない。

【０４３１】

再試験

異常スクリーニング検査室血液試験及び除外につながるＣＲＰレベルの再試験は、スクリーニング期間中に予定されていない訪問を使用して１回のみ許可される（適格性を再評価するために）。

【０４３２】

治療フェーズ

治療フェーズは、プラセボ対照及び積極的治療フェーズを含む。０週目に、適格な対象は、２つの処置：ゴリムマブＩＶ２ｍｇ／ｋｇ又はプラセボＩＶのうちの１つを受けるように無作為に割り当てられる。

【０４３３】

有効性

乾癬性関節炎応答評価

関節評価

６８個の関節の各々が圧痛に関して評価され、６６個の関節の各々が腫脹に関して評価される（股関節は、腫脹に関して除外される）。全ての関節は、時間及びイベントスケジュールに示されるように、訪問時に検査される。

【０４３４】

関節評価を実施するのに十分な訓練及び経験を有する独立した関節評価者（ＩＪＡ）は、全関節評価並びに指炎及び腱付着部炎評価を実施するために各研究施設において指定される。対象のベースライン関節評価を実施する同一のＩＪＡはまた、５２週目までの全ての後続の訪問において、その対象に関する関節評価も実施するべきであることが強く推奨される。

【０４３５】

治験依頼者は、各施設における最初の対象のスクリーニング前に、各施設の指定されたＩＪＡのための訓練を提供する。補助ＩＪＡは、対象の研究訪問のための関節評価を実施する前に、訓練を完了しなければならない。

【０４３６】

ＩＪＡが過去３年以内の以前の臨床研究において、治験依頼者によって訓練され、この訓練の適切な文書（証明書）が存在する場合、その訓練は、この研究に十分であると見なされる。しかしながら、試験の開始前の反復訓練が奨励される。各ＩＪＡの訓練の文書は、研究施設で維持されるべきである。

【０４３７】

施設で関節評価を実施している全てのＩＪＡは、研究施設においてデリゲーションログ上に列挙されなければならず、各訪問においてソースドキュメントに文書化されるべきで

ある。

【０４３８】

２４週目の後、関節評価者は、もはや独立している必要はない。しかしながら、関節評価者は、研究中に変更されるべきではないことが推奨される。

【０４３９】

評価不可能な関節

関節は、関節を評価することが物理的に不可能である場合にのみ（即ち、ギプスによりアクセス不可能な関節、切断により存在しない関節、アクセスを不可能にするように変形した関節）、ＩＪＡによって「評価不可能」と指定されるべきである。他の全ての場合において、ＩＪＡは、圧痛及び腫脹に関して各関節を評価するべきである（股関節は、腫脹に関して除外される）。これは、以前の手術を可視的に示すいかなるもの（例えば、瘢痕）、又は彼らが有し得る対象の以前の関節処置／注射の認識（例えば、対象が研究参加前にＩＪＡの患者であった場合）にかかわらず、完了されるべきである。

【０４４０】

米国リウマチ学会レスポンス

米国リウマチ学会レスポンスは、複数の疾患評価基準の改善の数値測定として提示される。例えば、ＡＣＲ２０応答[10]は、以下のように定義される。

１．腫脹関節数（６６個の関節）及び圧痛関節数（６８個の関節）の両方におけるベースラインからの２０％以上の改善、

並びに

２．以下の５つの評価のうちの３つにおけるベースラインからの２０％以上の改善：

・患者の疼痛評価（ＶＡＳ）
・患者の疾患活動性の包括的評価（ＶＡＳ）
・医師の疾患活動性の包括的評価（ＶＡＳ）
・患者のＨＡＱ－ＤＩによって測定された身体機能の評価
・ＣＲＰ

【０４４１】

ＡＣＲ５０、ＡＣＲ７０、及びＡＣＲ９０は、ベースラインからの改善閾値がそれぞれ５０％、７０％、及び９０％であることを除いて、同様に定義される。

【０４４２】

指炎評価

指炎の存在及び重症度は、０～３のスコアリングシステム（０－指炎なし、１－軽度の指炎、２－中程度の指炎、及び３－重篤な指炎）を使用して両手及び両足において評価される。[15,16]

【０４４３】

ＩＪＡは、全ての指炎評価を実施する。治験依頼者は、指炎評価訓練を提供する。この訓練の文書は、研究施設の訓練ファイル内に維持される。

【０４４４】

腱付着部炎評価

腱付着部炎は、Ｌｅｅｄｓ腱付着部炎指標（Leeds Enthesitis Index、ＬＥＩ）を使用して評価される。[18]ＬＥＩは、ＰｓＡを有する対象における腱付着部炎を評価するために開発され、以下の腱付着部に局所的圧力を加えることによって疼痛の有無を評価する。

・肘外側上顆、左及び右
・肘内側上顆、左及び右
・アキレス腱付着部、左及び右

【０４４５】

ＩＪＡは、全ての腱付着部炎評価を実施する。治験依頼者は、腱付着部炎評価訓練を提供する。この訓練の文書は、研究施設の訓練ファイル内に維持される。

【０４４６】

撮像評価

修正総ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｈｅｉｊｄｅシャープ（ｖｄＨ－ｓ）スコアは、手のＤＩＰ関節の追加、並びにペンシルインカップ及び全体的な骨溶解変形の評価によって、ＰｓＡ放射線損傷評価の目的のために修正された元のｖｄＨ－Ｓスコア[28]である。関節びらんスコアは、手の４０個の関節及び足の１２個の関節におけるびらん重症度の要約である。各手関節は、関与する表面積に応じて、びらんなしを示す0から関節骨の半分超からの骨の広範な損失を示す5までスコアリングされる。足関節の各側面は、このスケールで等級分けされるため、足関節に対する最大びらんスコアは、１０である。したがって、最大びらんスコアは、３２０である。関節裂隙狭小化（ＪＳＮ）スコアは、手の４０個の関節及び足の１２個の関節におけるＪＳＮの重症度を要約する。ＪＳＮの評価は、０～４にスコアリングされ、0は、ＪＳＮなしを示し、4は、関節裂隙の完全な損失、骨性強直症、又は完全な脱臼を示す。したがって、最大ＪＳＮスコアは、２０８であり、５２８は、ＰｓＡに対する考え得る最悪の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアである。

【０４４７】

手（後前）及び足（前後）の単一のＸ線検査は、不要なＸ線を最小限に抑えるために訪問時に実施され、対象は、組み入れ及び除外基準が確認され、対象が研究に入る資格があると思われた後に撮影された手及び足のベースラインＸ線写真を有することが推奨される。ベースラインＸ線写真は、無作為化の前に撮影されなければならない。これらのＸ線検査は、無作為化の約2週間前に実施されて、Ｘ線写真の品質に関するいかなる潜在的な問題にも対処する時間を考慮することが示唆される。ＥＥに適格な対象は、１６週目及び２４週目に収集されたＸ線写真を有する。ＥＥに適格ではない対象は、２４週目に撮影されたＸ線写真を有する。全ての対象は、５２週目に撮影されたＸ線写真を有する。全てのＸ線写真は、対象の予定された訪問の±２週間に撮影される。

【０４４８】

５２週目の前に研究薬剤を永続的に中止する対象については、手及び足のＸ線検査は、研究薬剤の中止時に実施されるべきである。手及び足のこれらのＸ線検査は、過去6週間以内に別のＸ線写真のセットが得られた場合には実施される必要はない。

【０４４９】

Ｘ線写真は、中央の独立した読み取り者によって評価される。2つの読み取りキャンペーンが存在し、読み取りキャンペーン1は、0週目、１６週目（早期離脱に入った対象について）、及び２４週目（及び／又は２４週目の前の研究薬剤中断訪問）を含み、読み取りキャンペーン2は、0週目、２４週目、及び５２週目のデータ、又は２４週目の後であるが５２週目の前の研究薬剤中断訪問を含む。

【０４５０】

Ｘ線写真の取得に関する詳細な情報は、撮像マニュアルに提供される。

【０４５１】

健康評価質問表の障害指標

対象の機能状態は、ＨＡＱ－ＤＩによって評価される。[13]この２０問の計器は、8つの機能領域（身支度、起床、食事、歩行、衛生、伸展、握力、及び日常生活活動）におけるタスクの達成で人が感じる困難の程度を評価する。各機能領域における応答は、困難なしを示す0からその領域内でタスクを実行することが不可能であることを示す3までスコアリングされる（即ち、より低いスコアは、より良好な機能を示す）。評価の特性は、評価されており、ＰｓＡにおけるその妥当性が決定されている。[19]また、対象の疾患の変化に応答することが示されている。[22]ＰｓＡにおいて、０．３０のスコアの減少は、有意義な改善を示すと決定されている。[21]

【０４５２】

最小疾患活動性

ＰｓＡ最小疾患活動性（ＭＤＡ）基準は、ＰｓＡで使用される7つの結果尺度の複合体である。対象は、7つの結果尺度のうちの5つを満たした場合、ＭＤＡを達成することと分類される：圧痛関節数1以下；腫脹関節数1以下；乾癬活動性及び重症度指数1以下又は身体表面積3以下；１５以下の患者の疼痛ビジュアルアナログスケール（ＶＡＳ）スコ

ア；２０以下の患者の包括的疾患活動性ＶＡＳスコア；健康評価質問表（ＨＡＱ）スコア０．５以下；及び圧痛腱付着部点１以下。[6]

【０４５３】

３６項目ショートフォーム健康調査

医学的アウトカム研究健康指標ＳＦ－３６質問票は、Ｒａｎｄ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｉｎｓｕｒａｎｃｅ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔの一部として開発され、８つの多項目スケールからなる。

・健康問題による身体機能の制限；
・身体健康問題による日常的役割の活動の制限；
・身体の痛み；
・全般的な精神的健康状態（心理的苦痛及び健康）；
・個人的又は感情的問題による日常的役割の活動の制限；
・身体的又は精神的健康問題による社会的機能の制限；
・活力（エネルギー及び疲労）；
・全般的な健康状態の認識。

【０４５４】

これらのスケールは、０～１００にスコアリングされ、より高いスコアは、より良好な健康を示す。別のアルゴリズムは、身体成分サマリー（ＰＣＳ）及び精神成分サマリー（ＭＣＳ）の２つのサマリースコアを得る。これらのサマリースコアはまた、より高いスコアがより良好な健康を示してスケーリングされるが、一般的な米国の集団基準に基づき、スコアを５０の平均及び１０の標準偏差に変換するために線形変換が実施されるノルムベースのシステムを使用してスコアリングされる。[3,4] ＳＦ－３６によって測定される概念は、任意の年齢、疾患、又は処置群に特有ではなく、異なる疾患の相対的な負担と異なる治療の相対的利益との比較を可能にする。[3,3]

【０４５５】

乾癬応答評価

乾癬の面積及び重症度指標

ＰＡＳＩは、乾癬病変の重症度及び療法に対するそれらの応答を評価及び等級分けするために使用されるシステムである。[1,2] ＰＡＳＩは、０～７２の範囲であり得る数値スコアを生成する。ＰＡＳＩ５０応答は、ベースラインからのＰＡＳＩスコアの５０％以上の改善として定義され、ＰＡＳＩ７５及びＰＡＳＩ９０は、同様に定義される。

【０４５６】

ベースラインにおける対象のＰＡＳＩ評価を実施した医師又は被指名人が、全ての後続の訪問においてもその対象に対してＰＡＳＩを実施するべきであることを確実にするために、あらゆる努力をするべきである。治験依頼者は、ＰＡＳＩ訓練を提供する。この訓練の文書は、施設の訓練ファイル内に維持される。

【０４５７】

エンドポイント

主エンドポイント

この研究の主エンドポイントは、１４週目にＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合である。

【０４５８】

研究は、１４週目のＡＣＲ２０を有する対象の割合が、プラセボ群と比較してゴリムマブ群において統計的に有意により大きいことが実証された場合、陽性であると考えられる。

【０４５９】

主要セカンダリーエンドポイント

以下の主要セカンダリーエンドポイントは、以下に指定されるような重要度順で列挙される。

１．１４週目のＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化。

２．１４週目にＡＣＲ５０応答を達成する患者の割合。
３．１４週目にＰＡＳＩ７５応答を達成する対象の割合（ベースラインの３％以上のＢＳＡ乾癬関与を有する）。
４．２４週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化。
【０４６０】
他のセカンダリーエンドポイント
制御されたセカンダリーエンドポイント（多様性に対するタイプＩエラー率の制御を伴う）。
以下の制御されたセカンダリーエンドポイントは、主エンドポイント及び主要セカンダリーエンドポイントに加えて分析され、以下に指定されるような重要度順で列挙される。
１．ベースラインにおいて腱付着部炎を有する対象における、１４週目の腱付着部炎スコアにおけるベースラインからの変化。
２．ベースラインにおいて指炎を有する対象における、１４週目の指炎スコアにおけるベースラインからの変化。
３．１４週目のＳＦ－３６ＰＣＳにおけるベースラインからの変化。
４．２４週目にＡＣＲ５０応答を達成する患者の割合。
５．１４週目にＡＣＲ７０応答を達成する患者の割合。
６．１４週目のＳＦ－３６ＭＣＳにおけるベースラインからの変化。
【０４６１】
多様性を制御するために、主エンドポイント及び全ての主要セカンダリーエンドポイントが統計的有意性を達成したときにのみ、上記のエンドポイントが、上記の順序に従って順次試験される。そうでなければ、公称Ｐ値が提供される。
【０４６２】
他のセカンダリーエンドポイントは、以下を含む
主エンドポイント、主要セカンダリーエンドポイント、及び制御されたセカンダリーエンドポイントに加えて、以下のエンドポイントが評価される。
【０４６３】
徴候及び症状の低減並びに身体機能に関連したエンドポイント
１．２週目にＡＣＲ２０応答を達成する患者の割合。
２．経時的に、ＡＣＲ２０、ＡＣＲ５０、ＡＣＲ７０、及びＡＣＲ９０応答を達成する対象の割合。
３．経時的なＡＣＲ応答の成分におけるベースラインからの変化。
４．経時的に、ＡＣＲ応答の各成分において≧２０％、≧５０％、≧７０％、及び≧９０％の改善を達成する対象の割合。
５．経時的なＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化。
６．経時的に、ＨＡＱ－ＤＩスコアにおいてＰｓＡ対象に対する臨床的に有意義な改善（０．３以上の改善）を達成する対象の割合。
７．経時的な、ベースラインにおいて指炎を有する対象における指炎のベースラインからの変化、及び指炎がある指を有する対象の割合。
８．経時的な、ベースラインにおいて腱付着部炎を有する対象における腱付着部炎スコアにおけるベースラインからの変化、及び腱付着部炎を有する対象の割合。
９．２４週目にＡＣＲ２０応答を達成した対象における、５２週目にＡＣＲ応答を達成する対象の割合。ＡＣＲ５０、７０、及び９０応答者に対する同様のエンドポイントも評価される。
１０．２４週目にＨＡＱ－ＤＩ応答を達成した対象における、５２週目にＨＡＱ－ＤＩ応答を達成する対象の割合（ＨＡＱ－ＤＩスコアの０．３以上の改善を達成する対象）。
１１．経時的なＭＤＡを達成する対象の割合。
【０４６４】
皮膚疾患に関連したエンドポイントは、以下を含む
１．ベースラインにおいて３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象については、全

体的に、かつベースラインＭＴＸ使用によって、経時的にベースラインからのＰＡＳＩの５０％以上、７５％以上、９０％以上、及び１００％の改善を達成する対象の割合。
２．ベースラインにおいて３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象については、経時的なＰＡＳＩのベースラインからの改善。
３．ベースラインにおいて３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象については、経時的にＰＡＳＩ７５及びＡＣＲ２０応答の両方を達成する対象の割合。
４．ベースラインにおいて３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象については、経時的にＰＡＳＩ５０及び５以上のＤＬＱＩの改善の両方を達成する対象の割合。
５．ベースラインにおいて３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象については、経時的にＰＡＳＩ７５及び修正されたＰｓＡＲＣ応答の両方を達成する対象の割合。

【０４６５】
関節構造損傷に関連するエンドポイントは、以下を含む
構造損傷エンドポイントについては、２つの読み取りキャンペーンが存在し、読み取りキャンペーン１は、２４週目における分析に寄与し、読み取りキャンペーン２は、５２週目における分析に寄与する。
１．２４週目に０以下の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化を有する対象の割合。
２．２４週目及び５２週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化。
３．０週目から２４週目、２４週目から５２週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおける変化。２４週目及び５２週目の領域（手、足）による修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化。
４．２４週目及び５２週目の損傷の種類（びらん及びＪＳＮ）による修正ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化。
５．ベースライン、２４週目、及び５２週目に関節損傷のない状態（０の修正総ｖｄＨ－Ｓスコア、０のびらんスコア、又は０のＪＳＮスコア）を維持している対象の数。
６．２４週目及び５２週目に０以下又は０．５以下の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化を有する対象の数。

【０４６６】
健康関連の生活の質に関連したエンドポイントは、以下を含む
１．経時的なＳＦ－３６のＰＣＳスコア及びＭＣＳスコアにおけるベースラインからの変化。
２．経時的なＳＦ－３６スケールにおけるベースラインからの変化。
３．経時的に、５以上のＳＦ－３６ＰＣＳスコア改善を達成する対象の割合。
４．経時的に、５以上のＳＦ－３６ＭＣＳスコア改善を達成する対象の割合。

【０４６７】
対象の完了／脱退
完了
対象は、研究の６０週目に評価を完了した場合、研究を完了したと見なされる。いかなる理由でも研究処置を早期に中断する対象は、研究を完了したとは見なされない。

【０４６８】
研究処置の中断
対象の研究処置が治療レジメンの終了前に中断されなければならない場合、これは、研究からの対象の自動脱退をもたらさない。

【０４６９】
対象が５２週目に、又はその前に研究薬剤投与を中断する場合、その対象は、特定の有効性及び最終的な安全性のための訪問に戻らなければならない。

【０４７０】
以下のいずれかが生じる場合、研究薬剤投与は、永久的に中止されなければならない。
・研究期間内、又は最後の研究薬剤投与後４か月以内の妊娠及び計画された妊娠。

・人工呼吸器補助を必要とする喘鳴及び／若しくは呼吸困難を伴う気管支けいれんをもたらす反応、又は研究薬剤投与後に生じる症候性低血圧。
・研究薬剤の注入の１～１４日後に生じる、発熱及び／又は発疹を伴う筋肉痛及び／又は関節痛をもたらす反応（血清病を示唆し、他の認識された臨床的症候群の徴候及び症状を表すものではない）。これらは、掻痒、顔、手、又は唇の浮腫、嚥下障害、じんま疹、咽頭炎、及び／又は頭痛を含む他の事象を伴う場合がある。
・日和見感染症。
・非黒色腫皮膚癌を除く悪性腫瘍。
・ＣＨＦ。
・脱髄疾患。
・対象は、以下のＴＢスクリーニング基準に従って不適格であると見なされる。
－活動性ＴＢの診断が行われる。
－潜在性ＴＢのための治療を受けている対象は、この治療を早期に中断するか、又は治療に不適合である。
－対象は、フォローアップ評価質問及び／若しくは身体検査に基づき活動性ＴＢを示唆する症状を有するか、又は活動性ＴＢを有する人と最近密接に接触していて、追加の評価を受け続けることができないか、若しくは続けない。
－継続評価を受ける対象は、活動性ＴＢが除外され得、潜在性ＴＢのための適切な治療が、研究薬剤の次の投与前に開始され、完了まで継続され得ない限り、現在の活動性ＴＢの兆候を有する胸部Ｘ線写真、及び／又は陽性のＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果（及び／又はＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験が承認／登録されていないか、若しくはＴＳＴが現地の保健機関によって命じられている国における陽性のＴＳＴ結果）を有する。持続的に不確定なＱｕａｎｔｉＦＥＲＯＮ（登録商標）－ＴＢ　Ｇｏｌｄ試験結果を有する対象は、潜在的ＴＢが除外され、彼らの胸部Ｘ線写真がＴＢ（活動性又は陳旧性、非活動性ＴＢ）を示唆する異常を示さず、対象が治験責任医師によって判断されるようなＴＢの更なる危険因子を有しない場合、潜在性ＴＢのための治療なしに継続し得る。この判定は、治験依頼者のメディカルモニターに速やかに報告され、対象のソースドキュメントに記録され、治験責任医師によって頭文字で略式署名されなければならない。－潜在性ＴＢのための治療を受けている対象は、この治療を早期に中断するか、又は治療に不適合である。
・プロトコル禁止薬剤の開始
・治験責任医師又は治験依頼者のメディカルモニターは、安全性の理由から、それが対象の最善の利益であると確信している。

【０４７１】
深刻な感染症を発症する対象については、研究薬剤投与の中断が考慮されなければならない。

【０４７２】
研究からの脱退
以下の理由のいずれかで、対象は、研究から脱退させられる。
・追跡不能
・同意の撤回
・死亡

【０４７３】
対象が追跡不能である場合、対象に接触し、中断／脱退の理由を決定するために、研究施設関係者によってあらゆる合理的な努力が注がれなければならない。追跡のために取られる手段は、文書化されなければならない。

【０４７４】
対象が研究を完了する前に脱退する場合、脱退の理由は、ｅＣＲＦ及びソースドキュメントに文書化されるべきである。脱退した対象に割り当てられた研究薬剤は、別の対象に割り当てられなくてもよい。脱退する対象は、置き換えられない。対象が処置終了前に研

究薬剤投与から中断した場合、処置後評価が得られるべきである。

【０４７５】

主要な研究にとどまる一方での、任意選択的な研究試料の収集への参加の脱退

対象は、研究にとどまる一方で、任意選択的な研究試料について同意を撤回し得る。そのような場合、任意選択的な研究試料は破壊される。試料破壊プロセスは、上記のように進む。

【０４７６】

今後の研究における試料の使用からの脱退

対象は、研究のための試料の使用に対する同意を撤回し得る。そのような場合、試料は、それらがもはや臨床研究に必要とされなくなった後に破壊される。研究のための試料保持の詳細は、任意選択的な研究試料についての主要ＩＣＦ及び別個のＩＣＦに提示される。

【０４７７】

統計的方法

連続変数、並びに別個の変数の計数及び割合に対するｎ、平均、ＳＤ、中央値、ＩＱ範囲、最小値、及び最大値などの単純な記述要約統計は、大部分のデータを要約するために使用される。

【０４７８】

ベースラインにおけるＭＴＸ使用（はい／いいえ）によって階層化されたカイ二乗検定又はコクラン・マンテル・ヘンツェル（ＣＭＨ）は、特に明記しない限り、処置に応答する対象の割合などのカテゴリー変数を比較するために使用される。一般に、因子としてＭＴＸ療法のベースライン使用を伴うＡＮＯＶＡは、特に明記しない限り、連続変数を分析するために使用される。全ての統計的検定は、α＝０．０５（両側）で実施される。エンドポイントが非ガウス、例えば、ｖｄＨ－Ｓにおけるベースラインからの変化であると見なされる場合、ファン・デル・ヴェルデン正規スコアが利用される。統計分析に加えて、グラフデータ表示（例えば、線プロット）及び対象リストもまた、データを要約／提示するために使用され得る。

【０４７９】

有効性及び対象ベースライン分析は、特に明記しない限り、治療企図集団（即ち、無作為化された全ての対象）を利用する。有効性分析に含まれる対象は、割り当てられた処置を受けるかどうかにかかわらず、彼らの割り当てられた処置群に従って要約される。

【０４８０】

安全性及びＰＫ分析は、試験処置の少なくとも１回の投与を受けた全ての対象を含む。

【０４８１】

対象情報

対象の人口統計学的データ（例えば、年齢、人種、性別、身長、体重）及びベースライン疾患特性（例えば、疾患の持続時間、関節数、及びＣＲＰ）は、処置群によって要約される。

【０４８２】

試料サイズ決定

試料サイズ推定値は、生物製剤のウステキヌマブ（治験依頼者によって開発された抗ＩＬ１２／２３モノクローナル抗体）を用いた治験依頼者の直近のＰｓＡ研究からのデータに基づく。活動性ＰｓＡを有する対象におけるウステキヌマブの第３相研究（ＣＮＴＯ１２７５ＰＳＡ３００１）は、最小ＣＲＰ基準を含み、より現在に近いＰｓＡ集団を表す。ＣＮＴＯ１２７５ＰＳＡ３００１研究のＡＣＲ２０応答速度は、プラセボ、ウステキヌマブ４５ｍｇ、及び９０ｍｇの処置群のそれぞれに対して２４週目に２２．８％、４２．４％、及び４９．５％であった。各処置群に２２０人で合計４４０人の対象は、カイ二乗検定を使用して、０．０５の両側有意水準で、ゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ群における４０％のＡＣＲ２０応答及びプラセボ群における２０％の応答を仮定すると、１４週目の処置群間の応答者の割合の有意差を検出するために９９％の検出力を確実にする（表６）。

【０４８３】
【表９】
表６：検出力計算の結果－ＡＣＲ２０応答を有する対象の割合

群当たりの試料サイズ	ゴリムマブ%ACR20応答者	プラセボ%ACR20応答者	デルタ	検出力（%）
220	0.25	0.10	0.15	98.7
220	0.30	0.10	0.20	＞99.9
220	0.35	0.10	0.25	＞99.9
220	0.40	0.10	0.30	＞99.9
220	0.35	0.20	0.15	94.3
220	0.40	0.20	0.20	99.6
220	0.45	0.20	0.25	＞99.9
220	0.50	0.20	0.30	＞99.9
220	0.45	0.30	0.15	90.4
220	0.50	0.30	0.20	99.1
220	0.55	0.30	0.25	＞99.9
220	0.60	0.30	0.30	＞99.9

【０４８４】
また、各シナリオについてシミュレーションが実施されて、２４週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化の有意差を検出するための検出力を計算した（表７）。
【０４８５】
２４週目に、極端な異常値を除外した修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの平均（標準偏差）の変化は、ＣＮＴＯ１２７５ＰＳＡ３００１研究において、プラセボ、ウステキヌマブ４５ｍｇ、及び９０ｍｇの処置群でそれぞれ、０．９２（２．１５）、０．２８（１．９４）、及び０．１７（１．４４６）であった。プラセボ群において０．９、ゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ群において０．３５、及び各処置群に対して２の標準偏差の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの平均変化を仮定すると、４４０人の対象（即ち、１群当たり２２０人）が、０．０５の有意水準（両側）で有意差を検出するために９０．７％の検出力をもたらす。
【０４８６】
【表１０】
表７：検出力計算の結果－修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化

デルタ	プラセボ平均変化	ゴリムマブ平均変化	検出力（%）
0.30	0.90	0.60	40.2
0.35	0.90	0.55	52.3
0.45	0.90	0.45	75.1
0.50	0.90	0.40	84.1
0.55	0.90	0.35	90.7
0.60	0.90	0.30	94.8
0.65	0.90	0.25	97.2
0.70	0.90	0.20	98.7
0.75	0.90	0.15	99.5
0.80	0.90	0.10	99.8
0.85	0.90	0.05	99.9
0.90	0.90	0.00	＞99.9
0.95	0.90	−0.05	＞99.9
1.00	0.90	−0.10	＞99.9

【０４８７】
暫定分析
暫定分析は計画されていない。しかしながら、独立したデータ監視委員会（ＤＭＣ）が

安全性データを定期的にレビューして、対象の安全性を監視する。

【０４８８】

有効性分析

主エンドポイント分析

主エンドポイントは、１４週目にＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合である。

【０４８９】

関節炎の徴候及び症状の低減は、処置群間の１４週目のＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合を比較することによって評価される。ベースラインＭＴＸ使用によって階層化されたコクラン・マンテル・ヘンツェル（ＣＭＨ）検定（はい又はいいえ）は、この分析のために０．０５の有意水準（両側）で実施される。

【０４９０】

この一次有効性分析では、全ての無作為化された対象からのデータは、彼らの受けた実際の処置にかかわらず、彼らの割り当てられた処置群に従って分析される。対象が１４週目に少なくとも１つのＡＣＲ成分のデータを有する場合に、欠測ＡＣＲ成分を割り振るために、欠測を直前の値で補完する（ＬＯＣＦ）手順が使用される。対象が１４週目に全てのＡＣＲ成分のデータを有さない場合、対象は、非応答者と見なされる。加えて、治療失敗規則が適用される。

【０４９１】

修正された分析セット及び異なるルールによる感度分析が実施され得る。

【０４９２】

加えて、サブグループ分析は、人口統計的特性、ベースライン疾患特性、及びベースライン薬剤による主有効性エンドポイントにおける一貫性を評価するために実施される。サブグループと処置群との間の相互作用試験も、必要に応じて提供される。

【０４９３】

主要な二次分析

以下の主要な二次分析は、以下に指定されるような重要度順で実施される。

１．１４週目のＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。

２．１４週目にＡＣＲ５０応答を達成する対象の割合が要約され、処置群間で比較される。

３．１４週目にＰＡＳＩ７５応答を達成する対象の割合（ベースラインの３％以上のＢＳＡ乾癬関与を伴う）が要約され、処置群間で比較される。

４．２４週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。

【０４９４】

２つの処置群（１つの統計的比較）のみが存在するため、各有効性エンドポイント内の多様性を調節する必要はない。

【０４９５】

多様性に対するタイプＩエラー率を制御するために、第１の主要セカンダリーエンドポイントは、主エンドポイントが０．０５の有意水準（両側）で統計的有意性を達成した場合にのみ試験される。後続の主要セカンダリーエンドポイントは、主エンドポイント及び先行する主要セカンダリーエンドポイント（複数可）が、０．０５の有意水準（両側）で統計的に有意である場合にのみ試験される。

【０４９６】

２４週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化の主要セカンダリーエンドポイントについて、ベースラインの修正総ｖｄＨ－Ｓスコアを有する全ての無作為化された対象を含む修正されたＩＴＴ集団は、分析に含まれる。多重代入法は、欠測データのために２４週目のＸ線写真スコアを帰属させるために使用される。対象が２４週目の前に早期離脱又は中断したかどうかにかかわらず、２４週目のＸ線写真データを使用した感度分析も実施される。

【０４９７】
他の計画された有効性分析
制御されたセカンダリーエンドポイント分析（多様性に対するタイプＩエラー率の制御を伴う）
以下の有効性分析は、一次及び主要な二次分析に加えて実施される。
１．ベースラインにおいて腱付着部炎を有する対象における、１４週目の腱付着部炎スコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
２．ベースラインにおいて指炎を有する対象における、１４週目の指炎スコアにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
３．１４週目のＳＦ－３６ＰＣＳにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
４．２４週目にＡＣＲ５０応答を有する対象の割合が要約され、処置群間で比較される。
５．１４週目にＡＣＲ７０応答を達成する対象の割合が要約され、処置群間で比較される。
６．１４週目のＳＦ－３６ＭＣＳにおけるベースラインからの変化が要約され、処置群間で比較される。
【０４９８】
多様性を制御するために、主エンドポイント及び主要セカンダリーエンドポイントが統計的有意性を達成したときにのみ、上記の分析が、上記の順序に従って順次実施される。そうでなければ、公称Ｐ値が提供される。
【０４９９】
他のセカンダリーエンドポイントの分析は、以下を含む
徴候及び症状の低減並びに身体機能に関連した分析
以下のエンドポイントは、処置群によって要約される。要約は、エンドポイントの訪問が指定されていない場合、５２週目まで経時的である。処置群間の比較は、２４週目の前及び２４週目の訪問時に行われる。
１．２週目にＡＣＲ２０応答を達成する対象の割合が、処置群によって要約され、群間で比較される。
２．２４週目に、ＡＣＲ２０、ＡＣＲ５０、ＡＣＲ７０、及びＡＣＲ９０応答を達成した対象の割合。要約は、ベースラインＭＴＸ使用及び全体によって行われる。加えて、これらのエンドポイントはまた、帰属なしで観察されたデータを使用して要約される。
３．ＡＣＲ応答の成分におけるベースラインからの変化率が、処置群間で１４週目及び２４週目に比較され、経時的に要約される。
４．ＨＡＱ－ＤＩスコアにおけるベースラインからの変化が、経時的に各処置群について要約され、２４週目に処置群間で比較される。
５．ＨＡＱ－ＤＩ応答者の割合（ＨＡＱ－ＤＩスコアの≧０．３の改善を達成する対象）が、経時的に各処置群について要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。
６．ベースラインにおいて指炎を有する対象における指炎のベースラインからの変化率、及び指炎がある指を有する対象の割合が、経時的に各処置群について要約され、２４週目に処置群間で比較される。
７．ベースラインにおいて腱付着部炎を有する対象における腱付着部炎スコアにおけるベースラインからの変化率、及び腱付着部炎を有する対象の割合が、経時的に各処置群について要約され、２４週目に処置群間で比較される。
８．２４週目に応答者である対象における、５２週目にＡＣＲ２０応答者である対象の割合が、処置群によって要約される。同様の要約が、ＡＣＲ５０、７０、及び９０応答者について実施される。
９．２４週目に応答者である対象における、５２週目にＨＡＱ－ＤＩ応答者である対象（ＨＡＱ－ＤＩスコアの≧０．３の改善を達成する対象）の割合が、処置群によって要約される。

１０．ＭＤＡを達成する対象の割合が、経時的に各処置群について要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。

【０５００】

皮膚疾患に関連した分析は、以下を含む

以下の分析が実施される。

１．ベースラインにおける≧３％のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象について、ベースラインからのＰＡＳＩにおける≧５０％、≧７５％、≧９０％、及び１００％の改善を達成する対象の割合が、全体的に、かつベースラインＭＴＸ使用によって、経時的に各処置群について経時的に要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。

２．ベースラインにおける≧３％のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象について、ＰＡＳＩにおけるベースラインからの改善率が、経時的に各処置群について要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。

３．ベースラインにおける３％以上のＢＳＡ乾癬皮膚関与を有する対象について、ＰＡＳＩ７５及びＡＣＲ２０応答の両方を達成する対象の割合が、経時的に各処置群について要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。

【０５０１】

関節構造損傷に関連する分析は、以下を含む

２４週目の分析は、読み取りキャンペーン１からのデータに対して実施され、５２週目の分析は、読み取りキャンペーン２からのデータに対して実施される。

【０５０２】

以下の分析が実施される。

１．２４週目に０以下の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化を有した対象の割合が要約され、処置群間で比較される。

２．２４週目及び５２週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化が、処置群によって、かつ早期離脱状態によって要約される。

３．２４週目及び５２週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化が、処置群間で比較される。

４．０週目～２４週目及び２４週目～５２週目の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおける変化が、処置群によって、かつ早期離脱状態によって要約される。

５．領域（手、足）による修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化は、処置群によって要約され、２４週目及び５２週目に処置群間で比較される。

６．損傷の種類（びらん及びＪＳＮ）による修正ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化が、処置群によって要約され、２４週目及び５２週目に処置群間で比較される。

７．関節損傷のない状態（０の修正総ｖｄＨ－Ｓスコア、０のびらんスコア、又は０のＪＳＮスコア）を維持している対象の数が、処置群によって要約され、２４週目及び５２週目に処置群間で比較される。

８．０以下又は０．５以下の修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化を有する対象の数が、処置群によって要約され、２４週目及び５２週目に処置群間で比較される。

９．２４週目及び５２週目における修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化の累積経験分布関数が提示される。

１０．２４週目及び５２週目における読み取り者による修正総ｖｄＨ－Ｓスコア、びらんスコア、及びＪＳＮスコアにおけるベースラインからの変化が、処置群によって要約される。

【０５０３】

健康関連の生活の質に関連した分析は、以下を含む

以下の分析が実施される。

１．２４週目のＳＦ－３６のＰＣＳスコア及びＭＣＳスコアにおけるベースラインからの変化が、処置群間で比較される。

２．ＳＦ－３６のＰＣＳスコア及びＭＣＳスコアにおけるベースラインからの変化が、経時的に各処置群について要約される。
３．ＳＦ－３６スケールにおけるベースラインからの変化が、経時的に各処置群について要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。
４．≧５のＳＦ－３６ＰＣＳスコアの改善を達成する対象の割合が、経時的に要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。
５．≧５のＳＦ－３６ＭＣＳスコアの改善を達成する対象の割合が、経時的に要約され、１４及び２４週目に処置群間で比較される。

【０５０４】

エンドポイントの基準

研究は、１４週目のＡＣＲ２０を有する対象の割合が、プラセボ群と比較してゴリムマブ群において統計的に有意により大きいことが実証された場合、陽性であると考えられる。

【０５０５】

研究薬物情報

研究薬物の物理的記述

ゴリムマブ

ＩＶ投与のための５０ｍｇのゴリムマブ最終バイアル化製品（Final Vialed Product、ＦＶＰ）は、４ｍＬのＩ型ガラスバイアル瓶内でＣＮＴＯ１４８ＩｇＧを含有する単回使用の滅菌溶液として供給される。各バイアル瓶は、ｐＨ５．５のヒスチジン、ソルビトール、及びポリソルベート８０の水性媒体中に１２．５ｍｇ／ｍＬゴリムマブの４ｍＬ溶液を含有する。防腐剤は存在しない。

【０５０６】

プラセボ

生理食塩水は、単回使用注入バッグ内でＩＶ注入用の滅菌液体として供給される。防腐剤は存在しない。

【０５０７】

メトトレキサート

メトトレキサート（経口又は注射可能）は、治験依頼者によって供給されず、むしろ商業薬剤から取得されなければならない。

【０５０８】

早期離脱のために処方される薬剤

メトトレキサート、ＮＳＡＩＤ、コルチコステロイド、スルファラジン、ヒドロキシクロロキン、及びレフルノミドは、治験依頼者によって供給されず、むしろ商業薬剤から取得されなければならない。

【０５０９】

調製、取り扱い、及び保存

研究施設では、ゴリムマブ溶液のバイアル瓶は、凍結されず、２℃～８℃（３５．６°Ｆ～４６．４°Ｆ）において固定された冷蔵庫に保存され、光から保護されなければならない。製品の激しい振とうは、回避されるべきである。投与前に、製品は、粒子状物質及び変色に関して視覚的に検査されるべきである。変色、可視粒子、又は他の異質粒子が溶液中に観察される場合、製品は、使用されるべきではない。

【０５１０】

ガラスバイアル瓶内の研究薬剤は、使用できる状態である。研究薬剤ＩＶ注入は、非盲検薬剤師又は他の適切に認定及び公認された関係者によって、対象の体重に従って調製される。薬剤師又は他の適切に認定及び公認された関係者は、適切な数のバイアル瓶を使用して必要な量の研究薬剤を調製する。

【０５１１】

無菌手順は、研究材料の調製及び投与中に使用されなければならない。直射日光への曝露は、調製及び投与中に回避されるべきである。

【０５１２】
結果及び結論
活動性乾癬性関節炎を有する成人患者における静脈内ゴリムマブに関する２４週目までの有効性及び安全性
導入：ＧＯ－ＶＩＢＲＡＮＴ研究は、活動性ＰｓＡを有する成人患者（生物製剤を摂取していない）における静脈内（ＩＶ）ゴリムマブの安全性及び有効性を評価するようにデザインされた３相、多施設共同、無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験である。生物製剤を摂取していない活動性ＰｓＡ患者を、０、４週目（ｗｋ）、及びその後８週間毎にＩＶゴリムマブ２ｍｇ／ｋｇ、又はｗｋ０、４、１２、及び２０にプラセボでｗｋ２４にゴリムマブに交差に無作為化した（１：１）。主エンドポイントは、ｗｋ１４におけるＡＣＲ２０応答であった。多様性が制御されたエンドポイントは、ＡＣＲ５０、ＡＣＲ７０、ＰＡＳＩ７５、ＨＡＱ－ＤＩにおけるベースラインからの変化、腱付着部炎、指炎、ｗｋ１４のＳＦ－３６ＰＣＳ／ＭＣＳスコア、ＡＣＲ５０、及びｗｋ２４の修正総ｖｄＨ－Ｓ（構造損傷）スコアにおけるベースラインからの変化を含んだ。有効性分析は、無作為化処置に基づき、ｗｋ２４までの有害事象（ＡＥ）が報告される。治験責任医師は、ｗｋ６０まで盲検化されている。
【０５１３】
結果：４８０人の患者を無作為化した（プラセボ：２３９人、ゴリムマブ：２４１人）。研究は、その主エンドポイント及び制御されたセカンダリーエンドポイントの全てを満たした。ｗｋ１４に、プラセボに対してゴリムマブ患者の有意により大きい割合が、ＡＣＲ２０を達成した（７５．１％対２１．８％）。加えて、ゴリムマブ処置は、ｗｋ１４に、ベースラインＨＡＱ－ＤＩスコアからの有意な変化（－０．６０対－０．１２）、ＡＣＲ５０（４３．６％対６．３％）、ＰＡＳＩ７５（５９．２％対１３．６％）、ＡＣＲ７０（２４．５％対２．１％）、腱付着部炎及び指炎におけるベースラインからの有意な変化（それぞれ－１．８対－０．８及び－７．８対－２．８，）、ＳＦ－３６ＰＣＳ及びＳＦ－３６ＭＣＳスコアにおけるベースラインからの変化（それぞれ８．６５対２．６９及び５．３３対０．９７）をもたらした（全てｐ＜０．００１）。ｗｋ２４に、プラセボ患者に対してゴリムマブ患者の有意により大きい割合が、ＡＣＲ５０を達成した（５３．５％対６．３％、ｐ＜０．００１）。ｗｋ２４に、修正総ｖｄＨ－Ｓスコアにおけるベースラインからの変化によって測定されるように、プラセボに対して、ゴリムマブ患者についての構造損傷の進行が著しく少なかった（－０．３６対１．９５、Ｐ＜０．００１）。ＡＣＲ２０は、早ければｗｋ２にプラセボよりもゴリムマブで有意に高く（４５．６％対７．５％；ｐ＜０．００１）、ゴリムマブ患者の２７．０％（対４．２％のプラセボ）が、Ｗｋ１４までに最小疾患活動性を達成した。ゴリムマブ対プラセボ処置患者における実質的な差により、ＡＣＲ２０に対して処置する必要があった数は、ｗｋ１４の事後分析において１．９であった（表）。Ｗｋ２４まで、ゴリムマブ患者の４６．３％及びプラセボ患者の４０．６％が、１以上のＡＥを有し、それぞれ患者の２．９％対３．３％が、１以上の重篤ＡＥを有した。最も一般的な治療下で発現したタイプのＡＥは、感染症であり（ゴリムマブ患者の２０．０％対プラセボ患者の１３．８％）、３つのみが深刻であった。日和見感染症又は結核の症例は、ｗｋ２４まで報告されなかった。２つの死亡、２つの悪性腫瘍、及び１つの脱髄事象が報告された。注入反応の速度は、２％未満で低かった。深刻又は重篤なものはなかった。
【０５１４】
結論：活動性ＰｓＡを有する対象について、ＩＶゴリムマブは、疾患活動性及び身体機能、皮膚乾癬のクリアランス、指炎及び腱付着部炎の低減、ＨＲＱｏＬ、及び構造的進行の阻害の臨床的に有意義かつ驚くほどに有意な改善を実証した。ゴリムマブはまた、ｗｋ２４まで良好な耐容性を示し、安全性プロファイルは、ＳＣゴリムマブを含む他の抗ＴＮＦ療法と一致した。
【０５１５】

【表１１】

表８：臨床応答

	プラセボ	ゴリムマブ2mg／kg	P値
無作為化した患者、n	239	241	
14週目における臨床的有効性			
ACR20、n（%）	52（21．8%）	181（75．1%））	p＜0．001
ACR50、n（%）	15（6．3%）	105（43．6%）	p＜0．001
ACR70、n（%）	5（2．1%）	59（24．5%）	p＜0．001
PASI75、n（%）*	27／198（13．6%）	116／196（59．2%）	p＜0．001
HAQ－DIにおけるベースラインからの変化			
n	222	233	
平均（SD）	－0．12（0．47）	－0．60（0．53）	p＜0．001
腱付着部炎におけるベースラインの変化** n	173	182	
平均（SD）	－0．8（1．98）	－1．87（1．75）	p＜0．001
指炎におけるベースラインからの変化**			
n	115	130	
平均（SD）	－2．8（7．03）	－7．8（8．57）	p＜0．001
最小疾患活動性			
MDA n／N（%）	10／239（4．2%）	65／241（27．0%）	p＜0．001
治療が必要な数			
NNT（95%CI）		1．9（1．64、2．18）	
24週目の臨床的有効性			
ACR50、n（%）	15（6．3%）	129（53．5%）	
24週目の撮像データ			
vdH－Sスコアにおけるベースラインからの変化			
N	237	237	
平均（SE）	1．95（0．264）	－0．36（0．144）	p＜0．001
14週目におけるHRQoL			
SF－36PCSスコアにおけるベースラインからの変化			
n	222	233	
平均（SD）	2．69（5．92）	8．65（7．60）	p＜0．001
SF－36MCSスコアにおけるベースラインからの変化			
n	222	233	
平均（SD）	0．97（7．64）	5．33（9．95）	p＜0．001

*≧3%のBSA関与を有する患者間
**ベースラインにおいて所見を有する患者間
ACR、米国リウマチ学会基準；PASI、乾癬の面積及び重症度指標；HAQ－DI、健康評価質問表障害指標；CI、信頼区間；SD、標準偏差；SE、標準誤差；vdH－S、修正総van der Heijdeシャープ；HRQoL、健康関連の生活の質；SF－36PCS／MCS、36項目ショートフォーム健康調査身体／精神成分サマリー

【０５１６】

【表１２】

表９：ベースラインＭＴＸ使用によって階層化された、１４週目にＡＣＲ２０応答を達成した対象の数全分析セット

	プラセボ	ゴリムマブ2mg／kg
14週目にACR20応答について評価可能な対象[a]	239	241
ACR20応答を有する対象	52(21．8%)	181(75．1%)
%差(95%CI)[b]		53．4(45．80、60．90)
p値[c]		＜0．001
ベースラインMTX使用:はい	173	163
ACR20応答を有する対象	38(22．0%)	126(77．3%)
ベースラインMTX使用:いいえ	66	78
ACR20応答を有する対象	14(21．2%)	55(70．5%)

[a]ACR20応答は、治療失敗、部分的欠測データに対するLOCF、及び完全欠測データに対するNRIを使用した帰属データに基づく。
[b]信頼区間は、ベースラインMTX使用(はい、いいえ)に対するWald統計量制御に基づく。
[c]p値は、ベースラインMTX使用(はい、いいえ)に対するCMH試験制御に基づく。

【０５１７】

以上の教示に照らして、本発明の数多くの修正及び変形形態が可能であり、したがって、これらは添付の特許請求の範囲内に入るものである。

【０５１８】

参考文献

１．Basra MKA, Fenech R, Gatt RM, Salek MS, Finlay AY. The Dermatology Life Quality Index １９９４－２００７：a comprehensive review of validation data and clinical results. Br J Rheumatol. ２００８；１５９：９９７－１０３５.

２．Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage－secreted factor cachectin. Nature. １９８５；３１６（６０２８）：５５２－５５４.

３．Cassell SE, Bieber JD, Rich P, Tutuncu ZN, Lee SJ, Kalunian KC, Wu CW, Kavanaugh A. The modified Nail Psoriasis Severity Index：validation of an instrument to assess psoriatic nail involvement in patients with psoriatic arthritis. J Rheumatol. ２００７；３４（１）：１２３－１２９.

４．Cella D, Yount S, Sorensen M, Chartash E, Sengupta N, Grober J. Validation of the Functional Assessment of Chronic Illness Therapy Fatigue Scale relative to other instrumentation in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. ２００５；３２（５）：８１１－８１９.

５．Chandran V, Bhella S, Schentag C, Gladman D. Functional Assessment of Chronic Illness Therapy－Fatigue Scale is valid in patients with psoriatic arthritis. Ann Rhe

um Dis. 2007;66:936-939.
6. Coates LC, Helliwell PS. Validation of minimal disease activity criteria for psoriatic arthritis using interventional trial data. Arthritis Care Res (Hoboken). 2010;62(7):965-969.
7. Costello P, FitzGerald O. Disease mechanisms in psoriasis and psoriatic arthritis. Curr Rheumatol Rep. 2001;3(5):419-427.
8. EuroQol Group. EuroQol-a new facility for the measurement of health-related quality of life. Health Policy. 1990;16:199-208.
9. Feldman SR, Gordon KB, Bala M, et al. Infliximab treatment results in significant improvement in the quality of life of patients with severe psoriasis:a double-blind placebo-controlled trial. British Journal of Dermatology. 2005;152:954-960.
10. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1995;38(6):727-735.
11. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use. Clin Exp Dermatol. 1994;19(3):210-216.
12. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. Dermatologica. 1978;157(4):238-244.
13. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcomes in arthritis. Arthritis Rheum. 1980;23(2):137-145.
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.
15. Gladman DD, Inman RD, Cook RJ, et al. International spondyloarthritis interobserver reliability exercise--the INSPIRE study:II. Assessment of peripheral joints, enthesitis, and dactylitis. J Rheumatol. 2007;34(8):1740-1745.
16. Gladman DD, Ziouzina O, Thavaneswaran A, Chandran V. Dactylitis in psoriatic arthritis:prevalence and response to therap

y in the biologic era. J Rheumatol. 2013;40(8):1357-1359.
17. Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB, et al. Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. Ann Rheum Dis. 2004;63(7):769-773.
18. Healy PJ, Helliwell PS. Measuring clinical enthesitis in psoriatic arthritis: assessment of existing measures and development of an instrument specific to psoriatic arthritis. Arthritis Rheum. 2008;59(5):686-691
19. Husted JA, Gladman DD, Cook RJ, Farewell VT. Responsiveness of health status instruments to changes in articular status and perceived health in patients with psoriatic arthritis. J Rheumatol. 1998;25(11):2146-2155.
20. Khilji FA, Gonzalez M, Finlay AY. Clinical meaning of change in dermatology life quality index scores. Br J Dermatol. 2002;147(suppl 62):25-54. SIMPONI IV(golimumab) Clinical Protocol CNTO148PSA3001 Amendment 2 98 Approved, 29 June 2016
21. Mease PJ, Antoni CE, Gladman DD, Taylor WJ. Psoriatic arthritis assessment tools in clinical trials. Ann Rheum Dis. 2005;64(Suppl II):ii49-ii54.
22. Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, et al. Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. Arthritis Rheum. 2004;50(7):2264-2272
23. Mease PJ. Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds Enthesitis Index (LEI), Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesis Score (MASES), Leeds Dactylitis Index (LDI), Patient Global for Psoriatic Arthritis, Dermatology Life Quality Index (DLQI), Psoriatic Arthritis Quality of Life (PsAQOL), Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT-F), Ps

oriatic Arthritis Response Criteria(PsARC), Psoriatic Arthritis Joint Activity Index(PsAJAI), Disease Activity in Psoriatic Arthritis(DAPSA), and Composite Psoriatic Disease Activity Index(CPDAI). Arthritis Care Res(Hoboken). 2011;63Suppl11:S64-S85.

24. Partsch G, Steiner G, Leeb BF, Dunky A, Broll H, Smolen JS. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. J Rheumatol. 1997;24(3):518-523.

25. Pham T, Guillemin F, Claudepierre P, et al. TNFα antagonist therapy in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis:recommendations of the French Society for Rheumatology. Joint Bone Spine. 2006;73:547-553.

26. Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium. J Rheumatol. 1998;25(8):1544-1552.

27. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H;CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis:development of new criteria from a large international study. Arthritis Rheum. 2006;54(8):2665-2673.

28. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, et al. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1992;35(1):26-34.

29. van der Linden MA. Disease Activity Scores using C-reactive protein. April5, 2004. 以下で入手可能：www.umcn.nl/scientist/afdelingen/reumatologie/the_das/the_das_crp. 2005年8月19日にアクセス。

30. van Riel P, Fransen J, Scott DL. EULAR handbook of clinical assessments in rheumatoid arthritis. Third ed. Alphen Aan Den Rijn, The Netherlands:Van Zuiden Communications B.V. 2004. 請求に応じて入手可能。

31. van Riel PL, van Gestel AM, Scott DL, for the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials-ESCISIT. EULAR Handbook of Clinical Assessments in Rheumatoid Art

hritis. Alphen Aan Den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications B. V.; 2000: 40.

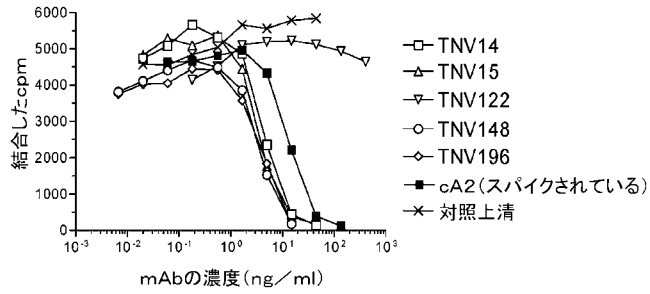
32. Veale DJ, Markham T, Fearon U, et al. St Vincents University Hospital, Dublin, Ireland. Therapy in psoriasis and psoriatic arthritis: anti-TNF-alpha clinical and angiogenic responses. Arthritis Rheum. 2003; 48 (suppl): S168-S169.

33. 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.

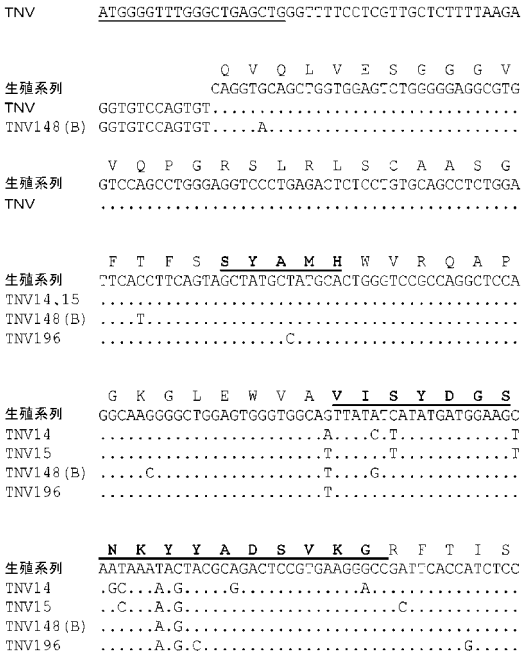
34. Ware JE, Kosinski M, Keller SD. Interpretation: Norm-Based. In: SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual. Boston, MA: The Health Institute; 1994: 8: 1-8: 42.

35. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, et al. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2006; 65 (4): 442-452.

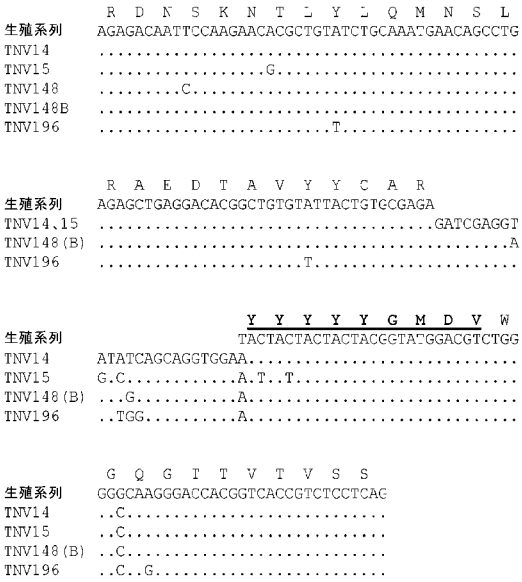
【図１】



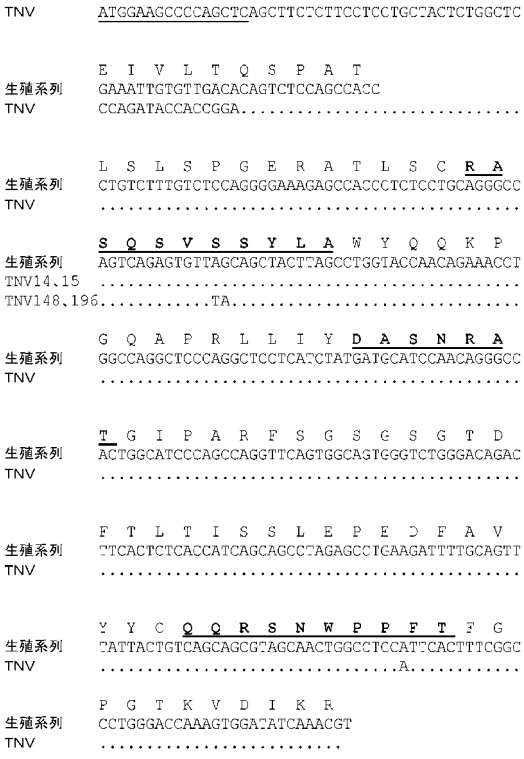
【図２Ａ】



【図２Ｂ】


R D N S K N T L Y L Q M N S L
生殖系列 AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV14 .....
TNV15 .....G.....
TNV148 .....C.....
TNV148B .....
TNV196 .....T.....
R A E D T A V Y Y C A R
生殖系列 AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV14､15 .....GATCGAGGT
TNV148(B) .....A
TNV196 .....T.....
Y Y Y Y Y G M D V W
生殖系列 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
生殖系列 GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
TNV14 ..C.....
TNV15 ..C.....
TNV148(B) ..C.....
TNV196 ..C..G.....

【図３】


TNV ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC
E I V L T Q S P A T
生殖系列 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC
TNV CCAGATACCACCGGA.....
L S L S P G E R A T L S C R A
生殖系列 CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
TNV .....
S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
生殖系列 AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV14､15 .....
TNV148､196.....TA.....
G Q A P R L L I Y D A S N R A
生殖系列 GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
TNV .....
T G I P A R F S G S G S G T D
生殖系列 ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TNV .....
F T L T I S S L E P E D F A V
生殖系列 TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT
TNV .....
Y Y C Q Q R S N W P P F T F G
生殖系列 TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC
TNV .....A.....
P G T K V D I K R
生殖系列 CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
TNV .....

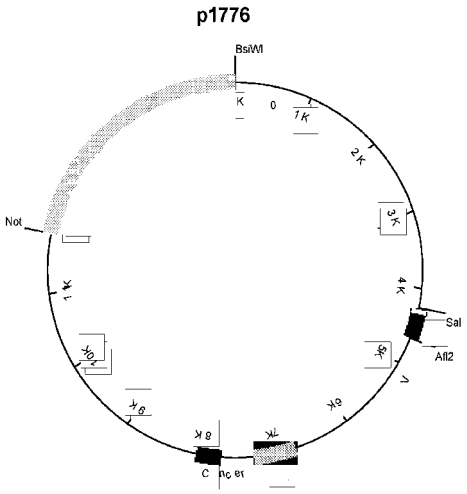
【図４】

生殖系列 MGFGLSWVFLVALLRGVQC シグナル SEQ ID NO. 32
TNV .....
生殖系列 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS FR1 SEQ ID NO. 7
TNV .....
TNV148(B) .....I..
生殖系列 SYAMH CDR1 SEQ ID NO. 1
TNV .....
生殖系列 WVRQAPGKGLEWVA FR2 SEQ ID NO. 7
TNV .....
TNV148(B) .....N.....
生殖系列 VISYDGSNKYYADSVKG CDR2 SEQ ID NO. 2
TNV14 I.L....S.K.....D
TNV15 F.L.....K.....
TNV148(B) FM.....K.....
TNV196 F.....KS.....
生殖系列 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR FR3 SEQ ID NO. 7
TNV14 .....
TNV15 .....A.....
TNV148 .....P.....
TNV148B .....
TNV196 ...V.....F.....F....
生殖系列 --------YYYYYGMDV
TNV14 DRGISAGGN..... CDR3 SEQ ID NO. 3
TNV15 ...V....N.....
TNV148(B) ....A...N.....
TNV196 ....G...N.....
生殖系列 WGQGTTVTVSS J6 SEQ ID NO. 7
TNV .....

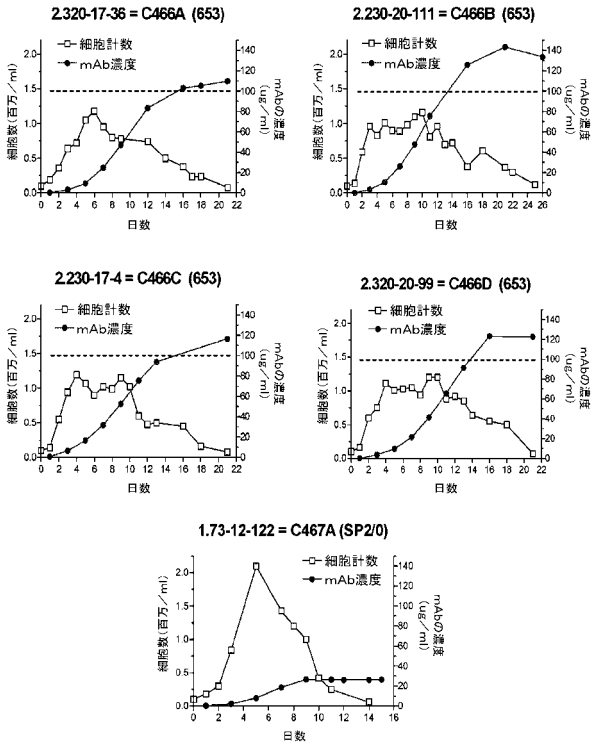
【図５】

TNV MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG シグナル SEQ ID NO. 33
生殖系列 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC FR1 SEQ ID NO. 8
TNV .....
生殖系列 RASQSVSSYLA CDR1 SEQ ID NO. 4
TNV14 .....
TNV15 .....
TNV148(B) .....Y....
TNV196 .....Y....
生殖系列 WYQQKPGQAPRLLIY FR2 SEQ ID NO. 8
TNV .....
生殖系列 DASNRAT CDR2 SEQ ID NO. 5
TNV .....
生殖系列 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC FR3 SEQ ID NO. 8
TNV .....
生殖系列 QQRSNWPPFT CDR3 SEQ ID NO. 6
TNV .....
生殖系列 FGPGTKVDIK J3 SEQ ID NO. 8
TNV .....

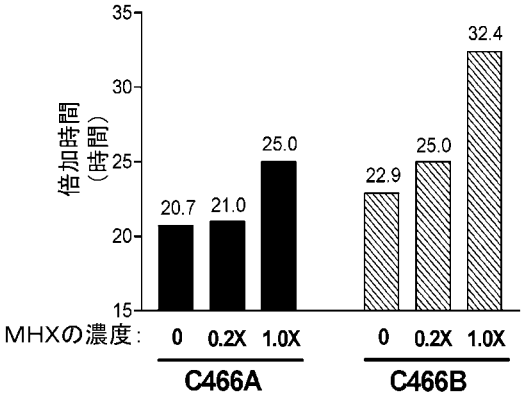
【図６】


p1776
BsiWI
Not
Sal
Afl2

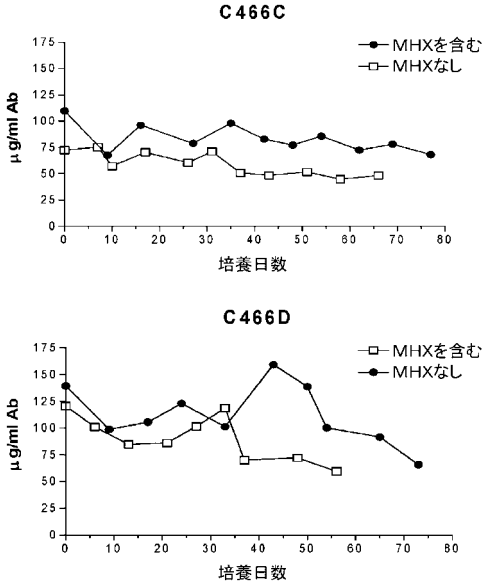
【図７】


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)
細胞計数
mAb濃度
細胞数(百万／ml)
mAbの濃度(ug／ml)
日数

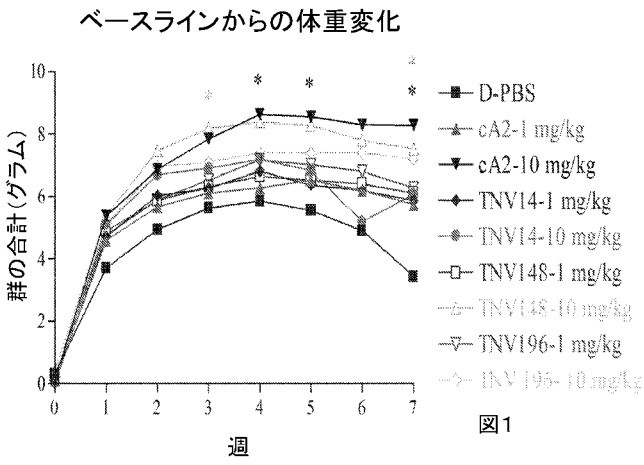
【図８】


倍加時間（時間）
20.7
21.0
25.0
22.9
25.0
32.4
MHXの濃度:
0
0.2X
1.0X
C466A
C466B

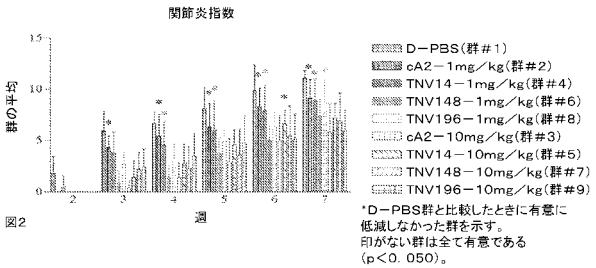
【図９】


C466C
C466D
MHXを含む
MHXなし
µg/ml Ab
培養日数

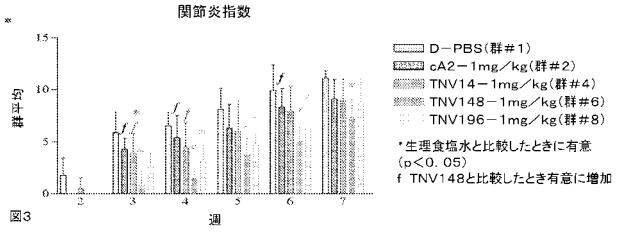
【図１０】



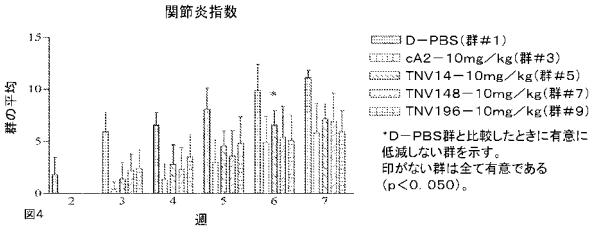
【図１１Ａ】



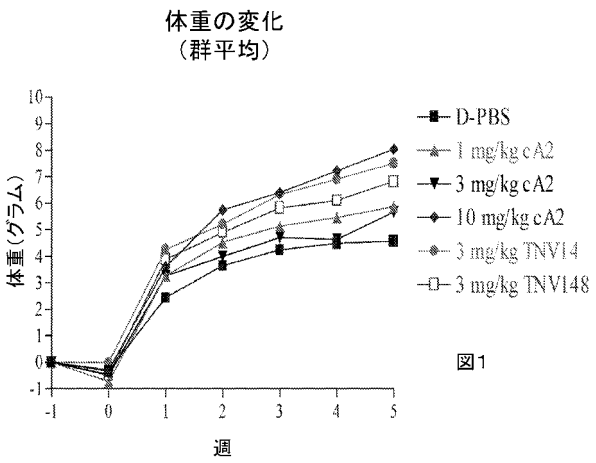
【図１１Ｂ】



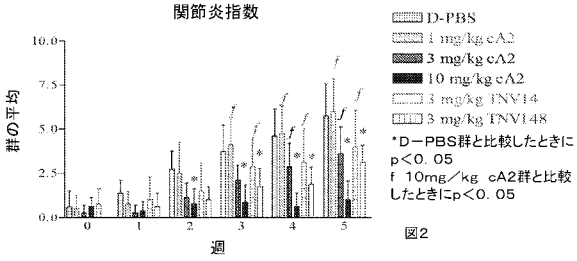
【図１１Ｃ】



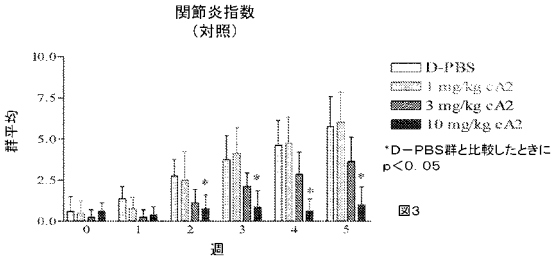
【図１２】



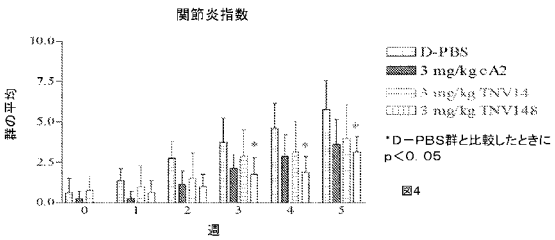
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【図１３Ｃ】



【図１４】

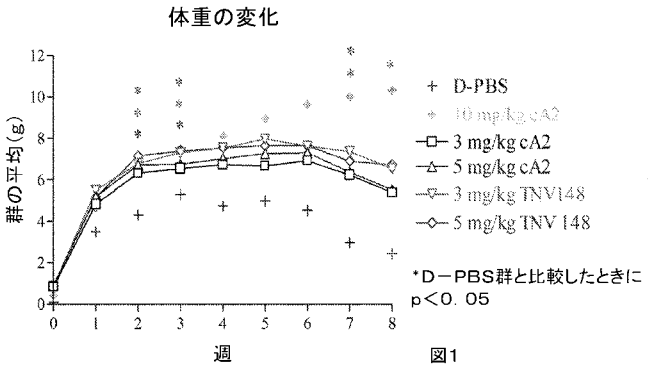


図1

【図１５】

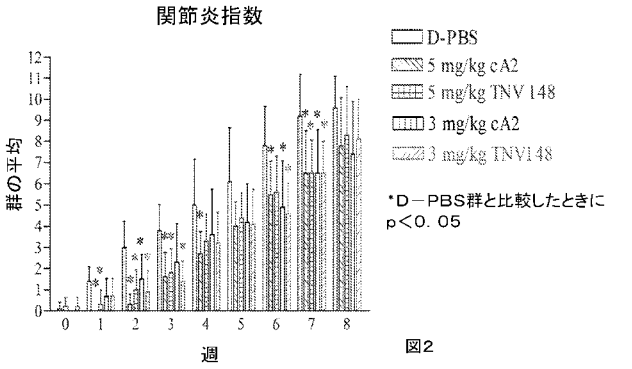


図2

【図１６】

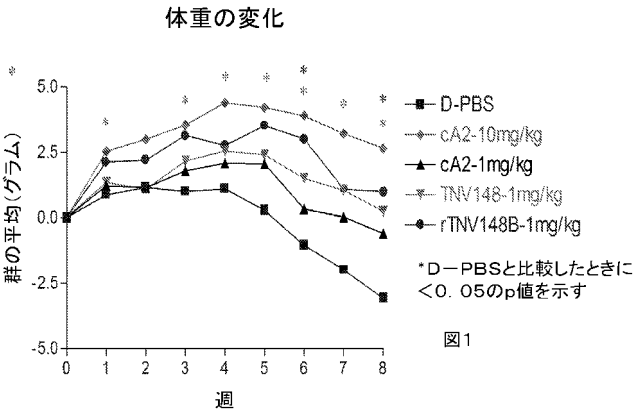


図1

【図１７】

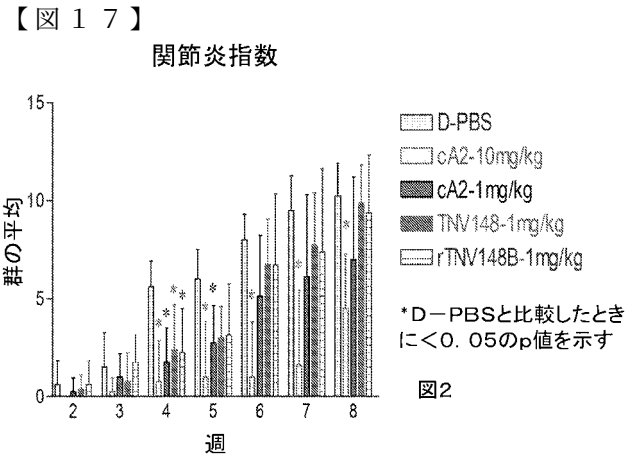
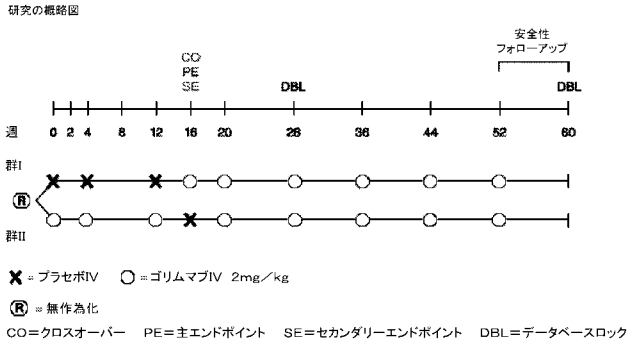


図2

【図１８】



【配列表】
2020506916000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/061949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395; C07K 14/525; C07K 16/24 (2018.01)
CPC - A61K 2039/505; C07K 16/241; C07K 2317/76; G01N 2800/102 (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/145.1; 424/158.1; 514/18.7 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0214528 A1 (DORAI et al) 27 August 2009 (27.08.2009) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	ACOSTA FELQUER et al. "Drug therapies for peripheral joint disease in psoriatic arthritis: a systematic review," Journal of Rheumatology, 30 November 2014 (30.11.2014), Vol. 41, No. 11, Pgs. 2277-2285. entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	COHEN et al. "Intravenous golimumab in rheumatoid arthritis," Expert Review of Clinical Immunology, 15 May 2014 (15.05.2014), Vol. 10, Iss. 7, Abstract only. entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	US 2002/0168360 A1 (DINGIVAN et al) 14 November 2002 (14.11.2002) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	US 2008/0311043 A1 (HOFFMAN et al) 18 December 2008 (18.12.2008) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	WO 2010/056399 A1 (INCODE BIOPHARMACEUTICS, INC. et al) 20 May 2010 (20.05.2010) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	US 2009/0028794 A1 (MEDICH et al) 29 January 2009 (29.01.2009) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	WO 2014/140509 A1 (THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM) 18 September 2014 (18.09.2014) entire document	1, 2, 4, 5, 7, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 January 2018	20 FEB 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/061949

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 36 and 37 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/061949

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 3, 6, 9, 10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*16/24*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/24	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人 100149010
弁理士 星川 亮
(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者 ハリソン，ダイアン，ディー.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 シャー，エリザベス，シー.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 キム，リーーライアン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ロ，キム ハン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01
4C085 AA14 BB36 CC23 EE01 EE03 GG02
4C086 AA01 AA02 CB09 GA16 MA03 MA05 NA05 ZA89 ZA96 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26