

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7689074号

(P7689074)

(45)発行日 令和7年6月5日(2025.6.5)

(24)登録日 令和7年5月28日(2025.5.28)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

Z N A

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 K 31/519

請求項の数 18 (全148頁)

(21)出願番号 特願2021-540796(P2021-540796)

(86)(22)出願日 令和2年1月14日(2020.1.14)

(65)公表番号 特表2022-518208(P2022-518208
A)

(43)公表日 令和4年3月14日(2022.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/IB2020/050266

(87)国際公開番号 WO2020/148651

(87)国際公開日 令和2年7月23日(2020.7.23)

審査請求日 令和5年1月5日(2023.1.5)

(31)優先権主張番号 62/792,568

(32)優先日 平成31年1月15日(2019.1.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/820,593

(32)優先日 平成31年3月19日(2019.3.19)

最終頁に続く

(73)特許権者 509087759

ヤンセン バイオテック、インコーポレ
ーテッドアメリカ合衆国ペンシルベニア州190
44 ホーシャム・リτζ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

(74)代理人 100149010

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 若年性特発性関節炎の治療のための抗TNF抗体、組成物、及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

小児患者の若年性特発性関節炎(JIA)を治療する方法で用いるための医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、抗TNF抗体を含み、

前記方法が、抗TNF抗体の静脈内(IV)用量を前記患者に投与することを含み、

前記IV用量が、第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²であり、

前記抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)とを含み、前記抗TNF抗体で治療された前記患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たす、医薬組成物。

【請求項2】

前記患者の10%超が、8週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たし、前記患者の20%超が、16週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たし、前記患者の29%超が、28週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たす、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記小児患者が、2～17歳である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記若年性特発性関節炎(JIA)が、多関節型若年性特発性関節炎(pJIA)であ

る、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記方法が、メトトレキサート（MTX）を前記小児患者に投与することを更に含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法で用いるための医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、抗 TNF 抗体を含み、

前記方法が、抗 TNF 抗体の静脈内（IV）用量を前記患者に投与することを含み、前記 IV 用量が、第 0 週目、第 4 週目、及びその後は 8 週間毎に 80 mg/m²であり、

前記抗 TNF 抗体が、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、

前記抗 TNF 抗体で治療された前記患者が、4 週間の治療、8 週間の治療、12 週間の治療、16 週間の治療、20 週間の治療、24 週間の治療、又は 28 週間の治療後に JIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又は JIA ACR90 の JIA 米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有する、医薬組成物。

【請求項 7】

4 週間の治療後に、前記患者の 50% 超が JIA ACR30 及び JIA ACR50 の前記基準を満たす、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

12 週間の治療後に、前記患者の 50% 超が JIA ACR30、JIA ACR50、及び JIA ACR70 の前記基準を満たす、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

28 週間の治療後に前記患者の 83% 超が、JIA ACR30 の前記基準を満たし、前記患者の 79% 超が、JIA ACR50 の前記基準を満たし、前記患者の 70% 超が、JIA ACR70 の前記基準を満たし、前記患者の 46% 超が、JIA ACR90 の前記基準を満たす、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記小児患者が、2～17 歳である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記若年性特発性関節炎（JIA）が、多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記方法が、メトトレキサート（MTX）を前記小児患者に投与することを更に含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法で用いるための医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、抗 TNF 抗体を含み、

前記方法が、抗 TNF 抗体の静脈内（IV）用量を前記患者に投与することを含み、前記 IV 用量が、第 0 週目、第 4 週目、及びその後は 8 週間毎に 80 mg/m²であり、

前記抗 TNF 抗体が、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、前記抗 TNF 抗体で治療された前記患者が、4 週間の治療、8 週間の治療、12 週間の治療、16 週間の治療、20 週間の治療、24 週間の治療、又は 28 週間の治療後に JADAS10、JADAS27、又は JADAS71 最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有する、医薬組成物。

【請求項 14】

12 週間の治療、16 週間の治療、20 週間の治療、24 週間の治療、及び 28 週間の治療後に、前記患者の 10% 超が、JADAS10、JADAS27、及び JADAS7

1 最少疾患活動性の疾患を有する、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

24 週間の治療及び 28 週間の治療後に、前記患者の 15 % 以上が、J A D A S 10、J A D A S 27、及び J A D A S 71 最少疾患活動性の疾患を有する、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記小児患者が、2 ～ 17 歳である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記若年性特発性関節炎（J I A）が、多関節型若年性特発性関節炎（p J I A）である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記方法が、メトトレキサート（M T X）を前記小児患者に投与することを更に含む、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（関連出願の相互参照）

本出願は、2019 年 9 月 10 日付で作成された「J B I 6 0 4 2 U S P S P 3 S e q L i s t i n g . t x t」というファイル名の A S C I I 形式の配列表として E F S - W e b を介して電子的に提出され、25 kb のサイズを有する配列表を含む。E F S - W e b を介して提出された配列表は、本明細書の一部をなし、参照によりその全容を本明細書に援用するものである。

【0002】

（発明の分野）

本発明は、若年性特発性関節炎（J I A）の治療、特に多関節型若年性特発性関節炎（p J I A）の治療に使用するための、抗 T N F 抗体、例えば、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖（H C）と、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖（L C）とを有する抗 T N F 抗体ゴリムマブを用いた組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0003】

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

【0004】

単球又はマクロファージ以外の細胞も T N F α を生成する。例えば、ヒト非単球腫瘍細胞株は T N F α 並びに C D 4 + 及び C D 8 + 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 T N F α を生成する。

【0005】

T N F α 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。

【0006】

T N F α 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。T N F α 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。

【0007】

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。T N F α 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。

10

20

30

40

50

【0008】

TNF α 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TNF α 及び他のサイトカインの分泌を強く活性化する。TNF α 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。TNF α 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。

【0009】

したがって、TNF α 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療法に有用な標的である。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治療による有益な作用が、TNF α に対するモノクローナル抗体を用いた非盲検試験で報告されている。炎症の抑制による関節リウマチにおける有益な結果も無作為化二重盲検プラセボ対照試験で報告されている。

【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命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TNF α 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、ある特定の疾患を治療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、療法に適さないものとし得、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なおも、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。

【0013】

これらの問題のうちの1つ以上を解消するTNF阻害剤が提供されることが求められており、現在市販されている抗TNF抗体及び他のTNF阻害剤、例えば、REMICADE（登録商標）（インフリキシマブ）、HUMIRA（登録商標）（アダリムマブ）、及びSIMPONI（登録商標）（ゴリムマブ）の開発につながった。他のTNF阻害剤としては、例えば、CIMZIA（登録商標）（セルトリズマブ・ペゴール）、PEG化抗体断片、及びENBREL（登録商標）（エタネルセプト）、可溶性TNF受容体融合タンパク質が挙げられる。TNF阻害剤のレビューについては、例えば、Lis et al., Arch Med Sci. 2014 Dec 22; 10(6): 1175-1185を参照されたい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

簡単にするために、参照により本明細書に組み込まれる、本明細書に添付の独立及び従属請求項によって、一般的かつ好ましい実施形態がそれぞれ定義される。他の好ましい実施形態、特性、及び利点は、添付の図面と併せて、以下の発明を実施するための形態から明らかになるであろう。

【0015】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（heavy chain、HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（light chain、LC）とを含む、方法を提供する。

10

【0016】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、患者が2～17歳の小児患者である、方法を提供する。

【0017】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、患者が2～17歳の小児患者であり、若年性特発性関節炎（JIA）が多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）である、方法を提供する。

20

【0018】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、患者が2～17歳の小児患者であり、若年性特発性関節炎（JIA）が多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）であり、抗TNF α 抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与される、方法を提供する。

30

【0019】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含む、方法を提供する。

【0020】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF α 抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与され、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含む、方法を提供する。

40

【0021】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で

50

患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、28週間の抗TNF α 抗体による治療後に患者が非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

【0022】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF α 抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与され、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含み、28週間の抗TNF α 抗体による治療後に患者が非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

10

【0023】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、患者の29%超が、28週間の抗TNF α 抗体による治療後に非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

【0024】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF α 抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与され、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含み、患者の29%超が、28週間の抗TNF α 抗体による治療後に非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

20

【0025】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、28週間の治療後に患者が、JIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、及びJIA ACR90からなる群から選択されるJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有する、方法を提供する。

30

【0026】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、28週間の治療後に、患者の83%超がJIA ACR30の基準を満たし、患者の79%超がJIA ACR50の基準を満たし、患者の70%超がJIA ACR70の基準を満たし、患者の46%超がJIA ACR90の基準を満たす、方法を提供する。

40

【0027】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF α 抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与され、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含み、28週

50

間の治療後に、患者の83%超がJIA ACR30の基準を満たし、患者の79%超がJIA ACR50の基準を満たし、患者の70%超がJIA ACR70の基準を満たし、患者の46%超がJIA ACR90の基準を満たす、方法を提供する。

【0028】

28週間の抗TNF抗体による治療後に患者が、JADAS10、JADAS27、及びJADAS71からなる群から選択される若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）のベースラインからの変化を有する、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【0029】

JADAS10を有する患者が、14よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有し、JADAS27を有する患者が、16よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有し、JADAS71を有する患者が、20よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有する、請求項10に記載の方法。

【0030】

特定の実施形態では、本発明は、患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体を、臨床的に安全性が証明された、臨床的に証明された有効量で患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNFα抗体が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²の静脈内（IV）用量で投与され、方法が、メトトレキサート（MTX）を患者に投与することを更に含み、28週間の治療後にJADAS10を有する患者が、14よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有し、JADAS27を有する患者が、16よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有し、JADAS71を有する患者が、20よりも大きいベースラインからの減少の中央値を有する、方法を提供する。

【0031】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

【0032】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、患者の10%超が、8週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、患者の20%超が、16週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、患者の29%超が、28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たす、方法を提供する。

【0033】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、小児患者が2～17歳である、方法を提供する。

【0034】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する

方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、若年性特発性関節炎（JIA）が多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）である、方法を提供する。

【0035】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、IV用量が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²である、方法を提供する。

10

【0036】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、又は28週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たし、方法が、メトトレキサート（MTX）を小児患者に投与することを更に含む、方法を提供する。

20

【0037】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有する、方法を提供する。

30

【0038】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、4週間の治療後に、患者の50%超がJIA ACR30及びJIA ACR50の基準を満たす、方法を提供する。

40

【0039】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、12週間の治療後に、患者の50%超がJIA ACR30、JIA

50

ACR50、及びJIA ACR70の基準を満たす、方法を提供する。

【0040】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、28週間の治療後に患者の83%超が、JIA ACR30の基準を満たし、患者の79%超が、JIA ACR50の基準を満たし、患者の70%超が、JIA ACR70の基準を満たし、患者の46%超が、JIA ACR90の基準を満たす、方法を提供する。

10

【0041】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、小児患者が2～17歳である、方法を提供する。

20

【0042】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、若年性特発性関節炎（JIA）が、多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）である、方法を提供する。

30

【0043】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラインからの改善を有し、IV用量が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²である、方法を提供する。

40

【0044】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）投与量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、又はJIA ACR90のJIA米国リウマチ学会（JIA ACR）応答に対応するベースラ

50

インからの改善を有し、方法が、メトトレキサート（MTX）を小児患者に投与することを更に含む、方法を提供する。

【0045】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有する、方法を提供する。

10

【0046】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、24週間の治療、及び28週間の治療後に、患者の10%超が、JADAS10、JADAS27、及びJADAS71最小疾患活動性の疾患を有する、方法を提供する。

20

【0047】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、24週間の治療及び28週間の治療後に、患者の15%以上が、JADAS10、JADAS27、及びJADAS71最小疾患活動性の疾患を有する、方法を提供する。

30

【0048】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、小児患者が2～17歳である、方法を提供する。

40

【0049】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、若年性特発性関節炎（JIA）が多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）である、方法を提供する。

【0050】

50

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、IV用量が第0週目、第4週目、及びその後は8週間毎に80mg/m²である、方法を提供する。

【0051】

特定の実施形態では、本発明は、小児患者の若年性特発性関節炎（JIA）を治療する方法であって、抗TNF抗体の静脈内（IV）用量を患者に投与することを含み、抗TNF抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖（HC）と、配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖（LC）とを含み、抗TNF抗体で治療された患者が、4週間の治療、8週間の治療、12週間の治療、16週間の治療、20週間の治療、2週間の治療、又は28週間の治療後にJADAS10、JADAS27、又はJADAS71最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）を有し、方法が、メトトレキサート（MTX）を小児患者に投与することを更に含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【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TNF α 結合を阻害する能力のアッセイを示すグラフ表示である。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¹²⁵I標識TNF α とともにブ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TNF α 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配列を示す図である。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、その当時、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った。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配列を示す図である。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

10

20

30

40

50

配列が T N V 1 4 8 及び T N V 1 4 8 B の両方に関することを示す。生殖系列 D N A 配列 (C D R 3) 中のギャップは、その当時、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った。T N V m A b 重鎖は、J 6 結合領域を使用する。

【図 3】 T N V m A b 軽鎖可変領域の D N A 配列を示す図である。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 V g / 3 8 K ファミリーの代表的なメンバーである。T N V m A b 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。T N V 配列の最初の 1 6 個のヌクレオチド (下線付き) は、可変領域を P C R 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 m A b 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 C D R ドメインは、太字で示され、下線付きである。T N V 1 4 8 (B) と標識された行は、示される配列が T N V 1 4 8 及び T N V 1 4 8 B の両方に関することを示す。生殖系列 D N A 配列 (C D R 3) 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。T N V m A b 軽鎖は、J 3 結合領域を使用する。

【図 4】 T N V m A b 重鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す図である。示されるアミノ酸配列 (一文字表記) は、非クローン化 P C R 生成物及びクローン化 P C R 生成物の両方から決定された D N A 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 (F W) 及び相補性決定領域 (C D R) ドメインに分割したアミノ配列が示される。D P - 4 6 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、T N V m A b 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。T N V 1 4 8 (B) は、示される配列が T N V 1 4 8 及び T N V 1 4 8 B の両方に関することを示す。「T N V」は、異なる配列が示されない限り、示される配列が全ての T N V m A b に関することを示す。生殖系列配列 (C D R 3) 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】 T N V m A b 軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す図である。示されるアミノ酸配列 (一文字表記) は、非クローン化 P C R 生成物及びクローン化 P C R 生成物の両方から決定された D N A 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 (F W) 及び相補性決定領域 (C D R) ドメインに分割したアミノ配列が示される。V g / 3 8 K 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、T N V m A b 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。T N V 1 4 8 (B) は、示される配列が T N V 1 4 8 及び T N V 1 4 8 B の両方に関することを示す。「A L L」は、示される配列が T N V 1 4 、 T N V 1 5 、 T N V 1 4 8 、 T N V 1 4 8 B 、 及び T N V 1 8 6 に関することを示す。

【図 6】 r T N V 1 4 8 B 発現 C 4 6 6 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である。p 1 7 8 3 は重鎖プラスミドであり、p 1 7 7 6 は軽鎖プラスミドである。r T N V 1 4 8 B 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ーは、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。A b 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 p 1 7 8 3 の長さは 1 9 . 5 3 k b であり、プラスミド p 1 7 7 6 の長さは 1 5 . 0 6 k b 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。p 1 7 8 3 の可変領域コード配列は、B s i W I / B s t B I 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。p 1 7 7 6 の可変領域コード配列は、S a l I / A f l I 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 r T N V 1 4 8 B 生成細胞株の成長曲線分析のグラフ表示である。3 0 m L の容量中に 1.0×10^5 細胞 / m L の生存細胞密度を有するように、T 7 5 フラスコ内の I 5 Q + M H X 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 . 3 m L 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である。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、 $SOPPD32.025$ 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である。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の体重変化を示す図である。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、又はTNV196）の単回腹腔内ボラス投与で処置した。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、第3～第7週目で有意であった。10mg/kgのTNV148で処置した動物も、研究の第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重症度の進行を表す図である。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数は、第3週目から始まり、残りの研究の間中（第7週目）継続して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、第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よりも第3、第4及び第7週目で有意に低いAIを示した。1mg/kgのTNV148も、1mg/kgのTNV14処置群よりも第3及び第4週目で有意に低かった。TNV196は研究の第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処置であった。

【図11B】実施例4に示す関節炎指数に基づく疾患重症度の進行を表す図である。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数は、第3週目から始まり、残りの研究の間中（第7週目）継続して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、第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よりも第3、第4及び第7週目で有意に低いAIを示した。1mg/kgのTNV148も、1mg/kgのTNV14処置群よりも第3及び第4週目で有意に低かった。TN

10

20

30

40

50

V 1 9 6 は研究の第 6 週目まで A I において有意な減少を示したが（D－P B S 処置群と比較したとき）、T N V 1 4 8 はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の 1 m g / k g 処置であった。

【図 1 1 C】実施例 4 に示す関節炎指数に基づく疾患重症度の進行を表す図である。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した群の関節炎指数は、第 3 週目から始まり、残りの研究の間中（第 7 週目）継続して D－P B S 対照群よりも低かった。1 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物及び 1 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、D－P B S 処置群と比較したとき、第 3 週目以降の A I 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（1 0 m g / k g の T N V 1 4、1 4 8 及び 1 9 6 と比較した 1 0 m g / k g の c A 2）、1 0 m g / k g の処置群の間に有意差はなかった。1 m g / k g の処置群を比較したとき、1 m g / k g の T N V 1 4 8 は、1 m g / k g の c A 2 よりも第 3、第 4 及び第 7 週目で有意に低い A I を示した。1 m g / k g の T N V 1 4 8 も、1 m g / k g の T N V 1 4 処置群よりも第 3 及び第 4 週目で有意に低かった。T N V 1 9 6 は研究の第 6 週目まで A I において有意な減少を示したが（D－P B S 処置群と比較したとき）、T N V 1 4 8 はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の 1 m g / k g 処置であった。

10

【図 1 2】実施例 5 の対照と比較した、本発明の抗 T N F 抗体に応答した関節炎マウスモデルマウス T g 1 9 7 の体重変化を示す図である。約 4 週齢の T g 1 9 7 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－P B S）、又は 3 m g / k g の抗体（T N V 1 4、T N V 1 4 8）（第 0 週目）の腹腔内ボーラス投与で処置した。注射は第 1、第 2、第 3 及び第 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、第 2、第 3 及び第 4 週目の T N V 1 4 又は T N V 1 4 8 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。

20

【図 1 3 A】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。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した群の関節炎指数は、第 2 週目から始まり、残りの研究の間中（第 5 週目）継続して D－P B S 対照群よりも有意に低かった。1 m g / k g 又は 3 m g / k g の c A 2 で処置した動物及び 3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物は、d－P B S 対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点で A I 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。3 m g / k g の T N V 1 4 8 で処置した動物は、d－P B S 処置群と比較したとき、第 3 週目から始まり、第 5 週目まで継続する有意な減少を示した。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、研究の第 4 及び第 5 週目でより低い用量の両 c A 2（1 m g / k g 及び 3 m g / k g）と比較したとき、A I において有意な減少を示し、また第 3～第 5 週目で T N V 1 4 で処置した動物よりも有意に低かった。3 m g / k g の処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物に関する A I は、いくつかの時点で 1 0 m g / k g よりも有意に高く、一方 T N V 1 4 8 で処置した動物は、1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物と有意に異ならなかった。

30

【図 1 3 B】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。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した群の関節炎指数は、第 2 週目から始まり、残りの研究の間中（第 5 週目）継続して D－P B S 対照群よりも有意に低かった。1 m g / k g 又は 3 m g / k g の c A 2 で処置した動物及び 3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物は、d－P B S 対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点で A I 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。3 m g / k g の T N V 1 4 8 で処置した動物は、d－P B S 処置群と比較したとき、第 3 週目から始まり、第 5 週目まで継続する有意な減少を示した。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、研究の第 4 及び第 5 週目でより低い用量の両 c A 2（1 m g / k g 及び 3 m g / k g）と比較したとき、A I において有意な減少を示し、また第 3～第 5 週目で T N V 1 4 で処置した動物よりも有意に低かった。3 m g / k g の処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物に関する A I は、いくつかの時点で 1 0 m g / k g よりも有意に高

40

50

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、第2週目から始まり、残りの研究の間中（第5週目）継続して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、第3週目から始まり、第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、研究の第4及び第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、また第3～第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、いくつかの時点で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。

10

【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の体重変化を示す図である。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。

20

【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図である。全ての処置群が初期の時点で多少の保護作用を示し、5mg/kgのcA2及び5mg/kgのTNV148は、第1～第3週目にAIにおいて有意な減少を示し、全ての処置群が第2週目で有意な減少を示した。研究の後期に、5mg/kgのcA2で処置した動物は多少の保護作用を示し、第4、第6及び第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、第6週目で有意な減少を示し、全ての処置群が第7週目で有意な減少を示した。研究の終わりで（第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。

30

【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の体重変化を示す図である。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図である。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数は、第4週目から始まり、残りの研究の間中（第8週目）継続して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、第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（第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、第7及び第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。

40

【図18】pJIAの臨床研究設計の図である。DBL＝データベースロック、LTE＝長期延長、MSE＝主要二次エンドポイント、PE＝一次エンドポイントである。ゴリム

50

マブ 80 mg/m² の I V 注入は、示された時間に矢印でマークされている。患者は、市販の M T X も、研究組み入れの時点と同じ週 1 回の B S A ベースの用量で少なくとも第 28 週目まで投与された。

【図 19】第 28 週目までの J I A A C R 30、50、70、及び 90 レスポンダーの割合を示す図である。J I A A C R 30、50、70、及び 90 の記号は、それぞれ、閉じた円、閉じた正方形、閉じた三角形、及び閉じた菱形である。

【図 20】第 28 週目までの不活動性疾患を有する患者の割合を示す図である。

【図 21】第 28 週目までの J A D A S 10、27、又は 71 最小疾患活動性を有する患者の割合を示す図である。*注：この分析では、J A D A S 10、27、及び 71 のエンドポイントの値は同じである。

【図 22】観察された濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する、及び条件重み付き残差 (C W R E S) に対する個人予測 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)、集団予測 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)、及び 1 回目の投与後の日数の母集団 P K (P P K) モデルの適合度プロットである。

【図 23】観察された Cトラフ, s s ($\mu\text{g}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブのトラフ濃度) 及び 8 週間にわたる p o s t - h o c A U C, s s ($\mu\text{g} \cdot \text{日}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブ濃度の A U C s s) について、異なる年齢分類における第 28 週目の一次エンドポイントを示す図である。ボックス内の水平線は中央値を表し、ボックスの下縁は、第 1 四分位を表し、ボックスの上縁は第 3 四分位を表し、ひげは、 $1.5 \times \text{I Q}$ 範囲内の最も極端な観測値である。

【図 24】観察された Cトラフ, s s ($\mu\text{g}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブのトラフ濃度) 及び 8 週間にわたる p o s t - h o c A U C, s s ($\mu\text{g} \cdot \text{日}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブ濃度の A U C s s) について、異なる年齢分類における第 52 週目の二次エンドポイントを示す図である。ボックス内の水平線は中央値を表し、ボックスの下縁は、第 1 四分位を表し、ボックスの上縁は第 3 四分位を表し、ひげは、 $1.5 \times \text{I Q}$ 範囲内の最も極端な観測値である。

【図 25】Cトラフ, s s ($\mu\text{g}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブのトラフ濃度) 及び 8 週間にわたる p o s t - h o c A U C, s s ($\mu\text{g} \cdot \text{日}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブ濃度の A U C s s) について、体重四分位による第 28 週目の P K を示す図である。ボックス内の水平線は中央値を表し、ボックスの下縁は、第 1 四分位を表し、ボックスの上縁は第 3 四分位を表し、ひげは、 $1.5 \times \text{I Q}$ 範囲内の最も極端な観測値である。

【図 26】Cトラフ, s s ($\mu\text{g}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブのトラフ濃度) 及び 8 週間にわたる p o s t - h o c A U C, s s ($\mu\text{g} \cdot \text{日}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブ濃度の A U C s s) について、C 反応性タンパク質 (C R P) 四分位による第 28 週目の P K を示す図である。ボックス内の水平線は中央値を表し、ボックスの下縁は、第 1 四分位を表し、ボックスの上縁は第 3 四分位を表し、ひげは、 $1.5 \times \text{I Q}$ 範囲内の最も極端な観測値である。

【図 27】G O - V I V A 研究における p J I A 被験者の異なる年齢分類における第 28 週目、及び G O - F U R T H E R 研究における成人 R A 被験者における第 20 週目及び第 36 週目の観察された Cトラフ, s s ($\mu\text{g}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブのトラフ濃度) を示す図である。

【図 28】G O - V I V A 研究における p J I A 被験者の異なる年齢分類、及び G O - F U R T H E R 研究における成人 R A 被験者における第 28 週目の、8 週間にわたる p o s t - h o c A U C, s s ($\mu\text{g} \cdot \text{日}/\text{mL}$ で表した血清ゴリムマブ濃度の A U C s s) を示す図である。

【図 29 A】血清ゴリムマブ濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する P K 四分位による第 52 週目の J I A A C R 応答を示し、J I C A C R 30 レスポンダーを示す図である。

【図 29 B】血清ゴリムマブ濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する P K 四分位による第 52 週目の J I A A C R 応答を示し、J I C A C R 50 レスポンダーを示す図である。

【図 29 C】血清ゴリムマブ濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する P K 四分位による第 52 週目の J I A A C R 応答を示し、J I C A C R 70 レスポンダーを示す図である。

10

20

30

40

50

【図29D】血清ゴリムマブ濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対するPK四分位による第52週目のJIA ACR応答を示し、JIC ACR90レスポnderを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明は、配列番号36を含む重鎖(HC)と、配列番号37を含む軽鎖(LC)とを有する抗TNF抗体を含む組成物、及びかかる抗TNF抗体を生成するための製造プロセスを提供する。

【0054】

本明細書で使用する時、「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、本発明の抗体の中に組み込むことができる、重鎖若しくは軽鎖の少なくとも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1つの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。用語「抗体」は、更に、抗体、その消化断片、特定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、あるいは抗体の構造及び／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)、fabc(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)。

【0055】

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CH₁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)として調製できる。

【0056】

本明細書で使用する時、用語「ヒト抗体」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、CL、CHドメイン(例えば、CH1、CH2、及びCH3)、ヒンジ(VL、VH))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、及び科に特異的な抗体を指す。更に、キメラ抗体は、上記の任意の組み合わせを含む。かかる変化又は変異は、任意選択的にかつ好ましくは、改変していない抗体に比べて、ヒト又は他の種における免疫原性を保持するか又は低減させる。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体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、ヒト以外の動物、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。その上、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、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを接続する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。かかるリンカーペプチドはヒト由来のものと見なされる。

10

【0057】

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、例えば、DuoBody（登録商標）（二重特異的抗体）、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。通常、親和性クロマトグラフィー工程によって行われる正しい分子の精製は、生成物の収率が低くて手間がかかり得るため、二重特異性抗体の生成を促進するための異なる手法が開発されている。

20

【0058】

完全長二重特異性抗体は、例えば、インビトロでの無細胞環境において又は共発現を使用して、異なる特異性を有する2つの抗体半分子のヘテロ二量体形成に好都合になるように各半分子における重鎖CH3界面に置換を導入することによって、2つの一特異性二価抗体間でのFabアーム交換（又は半分子交換）を使用して生成され得る。Fabアーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及びCH3ドメインの解離－会合の結果である。親単一特異性抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は減少する。親単一特異性抗体のうち1つの得られた遊離システインは、第2の親単一特異性抗体分子のシステイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体のCH3ドメインは、解離－会合により解放及び再形成する。FabアームのCH3ドメインは、ホモ二量体形成よりヘテロ二量体形成を好むように工学処理されてもよい。得られた生成物は、それぞれ異なるエピトープに結合することができる、2つのFabアーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。

30

【0059】

本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体形成」は、同一のCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体」は、同一のCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖を有する抗体を意味する。

40

【0060】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体形成」は、同一でないCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体」は、同一でないCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖を有する抗体を意味する。

【0061】

「ノブインホール（knob-in-hole）」戦略（例えば、国際公開第2006/028936号を参照のこと）を使用して、完全長二重特異性抗体を生成することができる。簡潔に、ヒトIgGにおけるCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸は、ヘテロ二量体形成を促進するために、CH3ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置において変異さ

50

れ得る。小さな側鎖を有するアミノ酸（ホール）が、第1の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸（ノブ）が、第2の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。2つの抗体の共発現後に、ヘテロ二量体が、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なCH3置換の対は、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S、及びT366W/T366S__L368A__Y407Vである（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾された位置／第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾された位置として表す）。

【0062】

他の戦略、例えば、1つのCH3表面における正に荷電した残基及び第2のCH3表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を使用する重鎖ヘテロ二量体形成の促進が、米国特許出願公開第2010/0015133号、米国特許出願公開第2009/0182127号、米国特許出願公開第2010/028637号、又は米国特許出願公開第2011/0123532号に記載されるように使用されてもよい。他の戦略では、ヘテロ二量体形成は、米国特許出願公開第2012/0149876号又は米国特許出願公開第2013/0195849号に記載されるように、次の置換：L351Y__F405A__Y407V/T394W、T366I__K392M__T394W/F405A__Y407V、T366L__K392M__T394W/F405A__Y407V、L351Y__Y407A/T366A__K409F、L351Y__Y407A/T366V__K409F、Y407A/T366A__K409F、又はT350V__L351Y__F405A__Y407V/T350V__T366L__K392L__T394W（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾された位置／第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾された位置として表す）により促進することができる。

【0063】

上述された方法に加えて、二重特異性抗体は、国際特許出願公開第2011/131746号に記載される方法に従って、インビトロでの無細胞環境において、2つの単一特異的ホモ二量体抗体のCH3領域中に非対称な突然変異を導入し、ジスルフィド結合を異性化させる還元条件下において、2つの親単一特異性ホモ二量体抗体から二重特異性ヘテロ二量体抗体を形成することにより生成され得る。この方法において、第1の単一特異性二価抗体及び第2の単一特異性二価抗体は、ヘテロ二量体の安定性を促進するCH3ドメインにおいてある特定の置換を有するように工学処理されるが、これらの抗体は、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合を異性化させるのに十分な還元条件下において共にインキュベートされ、それにより、Fabアーム交換により二重特異性抗体が生成される。インキュベート条件は、最適には、非還元条件に戻され得る。使用され得る例示的な還元剤は、2-メルカプトエチルアミン（2-MEA）、ジチオスレイトール（DTT）、ジチオエリスリトール（DTE）、グルタチオン、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、L-システイン、及びβ-メルカプトエタノールであり、好ましくは、2-メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトール、及びトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンからなる群から選択される還元剤である。例えば、少なくとも20℃の温度において、少なくとも25mMの2-MEAの存在下又は少なくとも0.5mMのジチオスレイトールの存在下で、pH5~8、例えば、pH7.0又はpH7.4において、少なくとも90分のインキュベートが使用されてもよい。

【0064】

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を任意選択的に特徴とし得る。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、任意選択的にかつ好ましくは、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、症状の測定可能な緩和並びに低い及び／

10

20

30

40

50

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をもとに、任意選択的に特徴とし得る。低い若しくは許容できる免疫原性、及び／又は高い親和性、並びに他の好適な特性が、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H A H A、H A C A若しくはH A M A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（E l l i o t t e t a l . , L a n c e t 344 : 1125-1127 (1994)、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【0065】

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T N F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T N F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。

【0066】

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T N F抗体を含む有効量の組成物又は医薬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、又は関連分野で知られている、既知の方法を使用して行い決定して、単回（例えば、ボーラス）、複数回、若しくは持続投与当たり約0.001~500mg/kgの量、又は単回、複数回、若しくは持続投与当たり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。刊行物とは、電子形式若しくは印刷形式で記録されたものを全て含む任意のメディア形式で利用可能な、任意の科学刊行物若しくは特許公報又は任意の他の情報を指す。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：A u s u b e l , e t a l . , e d . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N Y , N Y (1 9 8 7 - 2 0 0 1) 、 S a m b r o o k , e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y (1 9 8 9) 、 H a r l o w a n d L a n e , a n t i b o d i e s , a L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y (1 9 8 9) 、 C o l l i g a n , e t a l . , e d s . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N Y (1 9 9 4 - 2 0 0 1) 、 C o l l i g a n e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n P r o t e i n S c i e n c e , J o h n W i l e y & S o n s , N Y , N Y , (1 9 9 7 - 2 0 0 1) 。

【0067】

本発明の抗体：配列番号1、2、及び3の重鎖可変C D R領域の全て、並びに／又は配列番号4、5、及び6の軽鎖可変C D R領域の全てを含む、本発明の少なくとも1つの抗T N F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、A u s u b e l , e t a l . , e d . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N Y , N Y (1 9 8 7 - 2 0 0 1) 、 S a m b r o o k , e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y (1 9 8 9) 、 H a r l o w a n d L a n e , a n t i b o d i e s , a L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H

arbor, 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。

【0068】

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。他の特異的な又は一般的な哺乳動物の抗体も同様に生じ得る。免疫原性をもつ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。

【0069】

1つのアプローチでは、ハイブリドーマは、適切な不死化細胞株（例えば、Sp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMA IWA、NEURO 2Aなどであるがこれらに限定されない骨髓腫細胞株、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、及び上記のColligan, Immunologyの第2章参照されたい。なお両文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0070】

抗体生成細胞はまた、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を使用して、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核酸若しくは内在核酸を発現させることもできる。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し、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することができる。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。

【0071】

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（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/Bio

10

20

30

40

50

site、Xoma (Berkeley, CA)、Ixsysから入手可能。以下を参照、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614989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(Affymax)、国際公開第89/06283号、欧州特許第371998号、欧州特許第550400号、(Xoma)、欧州特許第229046号、国際出願PCT/US91/07149号(Ixsys)、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590689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、関連する特許及び出願と同様に、参照により全体が組み込まれる))。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)、Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996))、ゲルマイクロドロップレット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。

【0072】

ヒト以外の抗体又はヒト抗体を工学処理又はヒト化する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

10

20

30

40

50

変領域、定常領域又は他のドメインから採取される。

【0073】

既知のヒトIg配列は、数多くの刊行物及びウェブサイトの開示されており、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/;
www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com/;
www.pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
www.isac-net.org/sites_geo.html;
www.aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPS_tart.html;
www.baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cn.usc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
www.abgen.cvm.tamu.edu/lab/;
www.abgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;

10

20

30

40

50

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/frproducts.html;
www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al

10

., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health (1983) があり、各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0074】

かかるインポートされた配列は、免疫原性を低減させるため、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、結合速度定数、解離速度定数、結合活性、特異性、半減期、又は任意の他の好適な特性を低減、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次元の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。選択された免疫グロブリン配列候補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を利用可能である。これらの表示を調べることにより、免疫グロブリン配列候補の機能において残基が示す可能性の高い働きの解析、すなわち免疫グロブリン候補の抗原結合能に影響する残基の解析が可能となる。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、抗原結合に直接的にかつほとんど実質的に影響する。本発明の抗体のヒト化又は工学処理は、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

20

30

40

50

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。

【0075】

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に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。

【0076】

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 et al. 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 et al.、国際公開第98/50433号、Jakobovits et al.、国際公開第98/24893号、Lonberg et al.、国際公開第98/24884号、Lonberg et al.、国際公開第97/13852号、Lonberg et al.、国際公開第94/25585号、Kucheralapate et al.、国際公開第96/34096号、Kucheralapate et al.、欧州特許第0463151(B1)号、Kucheralapate et al.、欧州特許第0710719(A1)号、Surani et al.、米国特許第5,545,807号、Bruggemann et al.、国際公開第90/04036号、Bruggemann et al.、欧州特許第0438474(B1)号、Lonberg et al.、欧州特許第0814259(A2)号、Lonberg et al.、GB2272440(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)、Tuailon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(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、参照により各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、機能的に再構成された、又は機能的な再構成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に由来するDNAを含む、少なくとも1つの導入遺伝子を含む。かかるマウスの内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊又は欠失させて、当該マウスの、内因性遺伝子によりコードされている抗体の産生能を除去することができる。

【0077】

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も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化学合成法に加えて、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でのペプチド配列のディスプレイを含む。各バクテリオファージ又は細胞は、特定

10

20

30

40

50

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。かかる方法は、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、インビトロでの化学合成法及び組換え法の両方の態様を有する。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、上記のColligan、上記のAusubel、又は上記のSambrookを参照されたい。なお、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。

【0078】

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準備することができる。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）。

【0079】

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、誘導プロモーターを用い、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. Microbiol. 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タンパク質又は天然資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哺乳動物タンパク質を、商業生成レベルで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、単鎖抗体 (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 Ph

10

20

30

40

50

ysiol. 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。

【0080】

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 $0.1 \sim 9.9$ (又はその中の任意の範囲若しくは値) $\times 10^{-7}$ 、 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。

10

【0081】

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により求めることができる。(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)、及び本明細書に記載される方法を参照されたい。) 特定の抗体抗原相互作用について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溶液、並びに本明細書に記載される緩衝剤などの標準緩衝剤を用いて行われる。

20

【0082】

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。

30

【0083】

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もよい。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もよい。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。

【0084】

40

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抗体をなお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、遺伝子コードは、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

50

成することは、日常的であろう。例えば、上記の Ausubel et al. 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、の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。

【0085】

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、抗体の全長若しくは抗体の一部をコード化する配列、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プロセッ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ともに、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、追加のアミノ酸、例えば、追加の機能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マーカー配列に融合させることができ、例えば、このマーカー配列は、これを融合させた抗体断片又は部分を含む抗体の精製を促進するペプチドをコードする配列である。

【0086】

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、かかる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、寄託されたライブラリにおける部分長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動物の核酸ライブラリのcDNAに相補的な、ゲノム配列又はcDNA配列である。

【0087】

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。このcDNAライブラリは、稀な配列の発現量を増大させるよう正規化することができる。相補配列に対する配列同一性が低い配列を使用する、低又は中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が典型的なものであるが、これに限定されない。同一性がより高い配列には、任意選択的に、中及び高ストリンジェンシーの条件を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%の配列同一性をもつ配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オルソログス又はパラログス配列を同定するために利用できる。

【0088】

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 を参照されたい。各々は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0089】

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。

【0090】

核酸には、本発明のポリヌクレオチドに加えて、都合よく配列を含ませることができる。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配列は、本発明のタンパク質を精製するのに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。

【0091】

かかるクロニング配列及び／又は発現配列に追加の配列を付加して、クロニング及び／又は発現におけるそれらの機能を最適化すること、ポリヌクレオチドの単離に役立てること、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。）

【0092】

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ストリンジェントな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の同定に使用される。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。）

【0093】

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、ゲノムDNA又はcDNA配列にハイブリダイズさせて、同じ又は異なる生体の相同遺伝子を単離することができる。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条件がストリンジェントになるほど、二重鎖の形成が生じる際のプローブと標的との間の相補性の度合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。検出可能な結合に必要とされる相補性（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よって異なる。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中の配列のわずかな違いは、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減させることで埋め合わせることができることを理解すべきである。

【0094】

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。

【0095】

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 et al. 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, et al. の同第4,795,699号及び同第4,921,794号、Innisの同第5,142,033号、Wills

10

20

30

40

50

on, et al. の同第5, 122, 464号、Innisの同第5, 091, 310号、Gyllensten, et al. の同第5, 066, 584号、Gelfand, et al. の同第4, 889, 818号、Silvera, et al. 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を有する）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。）

【0096】

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こと、試料中の所望のmRNAの存在を検出するため、核酸の配列決定のため、又は他の目的でプローブとして用いる核酸を作製することに関し有用であり得る。インビトロでの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, et al.、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生成物の収率を改善することができる。

【0097】

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。

【0098】

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）プロモーターの両方を使用して、本発明の核酸の発現を導くことができる。

【0099】

いくつかの実施形態では、プロモーター、エンハンサー、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、内因性プロモーターを変えることができる。

【0100】

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

10

20

30

40

50

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。

【0101】

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、適切な包装細胞株を用いてインビトロでこれを包装し、その後、宿主細胞内に形質導入することができる。

【0102】

DNA挿入物は、適切なプロモーター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。構築物により発現される成熟した転写産物のコード部分は、好ましくは、最初に翻訳開始部位を含み、翻訳されるmRNAの最後に終止コドン（例えば、UAA、UGA、又はUAG）が適切に位置することになる。哺乳類又は真核生物の細胞の発現ではUAA及びUAGが好ましい。

【0103】

発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカーを含むが、これは任意選択的である。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。

【0104】

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。

【0105】

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。

【0106】

別の方法としては、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。かかる方法は、米国特許第5,580,734号、同第5,641,670号

10

20

30

40

50

、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。

【0107】

抗体、その特定された部分又は変異体の生成に有用な細胞培養物の一例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は、しばしば細胞からなる単層形態を取るが、哺乳動物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くつか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 CRL 1650）、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）から容易に入手できる。好ましい宿主細胞としては、CHO細胞、並びに骨髓腫及びリンパ腫細胞などのリンパ系に由来する細胞が挙げられる。特に好ましい宿主細胞は、CHO細胞、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。

【0108】

これらの細胞の発現ベクターは、複製起点、プロモーター（例えば、後期又は初期SV40プロモーター、CMVプロモーター（米国特許第5，168，062号；同第5，385，839号）、HSV tkプロモーター、pgk（ホスホグリセレートキナーゼ）プロモーター、EF-1 α プロモーター（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ー、エンハンサー、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atalog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。

【0109】

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。

【0110】

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ー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィー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ー（high performance liquid chromatography、「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、各々は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0111】

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、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。

【0112】

例示的な抗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依存性若しくは媒介性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時、「中和抗体」という用語は、アッセイに応じて約20～120%、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することができる。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。

【0113】

本明細書で使用する時、用語「抗体」又は「複数の抗体」は、2009年のバイオロジクス価格競争・イノベーション法(BPCI Act)並びに同様の世界的な法律及び規則で承認されたバイオシミラー抗体分子を含む。BPCI Actの下で、抗体は、臨床的に不活性な成分のわずかな違いにもかかわらず、基準品と「非常に類似」しており、安全性、純度、効力の点で基準品と同等の臨床結果が得られると「期待される」ことをデータが示す場合、バイオシミラーであることが実証され得る(Endocrine Practice: February 2018, Vol. 24, No. 2, pp. 195-204)。これらのバイオシミラー抗体分子は、短縮された承認経路を提供し、それにより、出願人は、法的な承認を確保するために、イノベーターの基準品の臨床データに依存している。臨床試験の成功に基づいてFDAに承認されたオリジナルのイノベーター基準抗体と比較して、バイオシミラー抗体分子は、本明細書では、「フォローオン生物学的」と呼ばれる。本明細書に提示されるように、SIMPONI(登録商標)(ゴリムマブ)は、臨床試験の成功に基づいてFDAに承認されたオリジナルのイノベーター参照抗TNF抗体である。ゴリムマブは、2009年から米国で販売されている。

10

20

30

40

50

【0114】

例示的な配列

様々な実施形態において、TNF阻害剤は、抗TNF抗体SIMPONI（登録商標）（ゴリムマブ）、又は以下に示す配列を含むその抗原結合断片を含む。抗TNF抗体SIMPONI（登録商標）（ゴリムマブ）及び他の抗TNF抗体に関する更なる情報については、例えば、米国特許第7,250,165号、同第7,691,378号、同第7,521,206号、同第7,815,909号、同第7,820,169号、同第8,241,899号、同第8,603,778号、同第9,321,836号、及び同第9,828,424号を参照されたい。

【0115】

例示的な抗TNF抗体の配列 例－SIMPONI（登録商標）（ゴリムマブ）

重鎖CDR（HCDR）及び軽鎖CDR（LCDR）は、Kabatにより定義される。

【0116】

CDRに下線が付されたゴリムマブ重鎖（HC）のアミノ酸配列：（配列番号36）

【0117】

【化1】

```
1 QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFIFs SYAMHWVRQA PGNLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARD R GIAAGGNY YGMDVWGQGT
121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPs SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP
181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KHTCTPPCPA
241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
361 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT
421 VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK 456
```

【0118】

CDRに下線が付されたゴリムマブ軽鎖（LC）のアミノ酸配列：（配列番号37）

【0119】

【化2】

```
1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQK GPAPRLLIYD ASNRATGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ Q RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP
121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL
181 TLSKADYEKH KKYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
```

【0120】

CDRに下線が付されたゴリムマブ可変重鎖（VH）のアミノ酸配列：（配列番号38）

【0121】

【化3】

```
1 QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFIFs SYAMHWVRQA PGNLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARD R GIAAGGNY YGMDVWGQGT
121 TVTVSS
```

【0122】

CDRに下線が付されたゴリムマブ可変軽鎖（VL）のアミノ酸配列：（配列番号39）

【0123】

【化4】

```
1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQK GPAPRLLIYD ASNRATGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ Q RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT V
```

10

20

30

40

50

【0124】

ゴリムマブ重鎖の相補性決定領域1 (HCDR1) のアミノ酸配列：(配列番号40)
SYAMH

【0125】

ゴリムマブ抗体重鎖の相補性決定領域2 (HCDR2) のアミノ酸配列：(配列番号41)

FMSYDGSNKKYADSVKG

【0126】

ゴリムマブ重鎖の相補性決定領域3 (HCDR3) のアミノ酸配列：(配列番号42)
DRGIAAGGNYYYYGMDV

【0127】

ゴリムマブ軽鎖の相補性決定領域1 (LCDR1) のアミノ酸配列：(配列番号43)
RASQSVYSYLA

【0128】

ゴリムマブ軽鎖の相補性決定領域2 (LCDR2) のアミノ酸配列：(配列番号44)
DASNRA T

【0129】

ゴリムマブ軽鎖の相補性決定領域3 (LCDRL) のアミノ酸配列：(配列番号45)
QQRSNWPPFT

【0130】

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、このタンパク質の少なくとも1つの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、このタンパク質の少なくとも1つの細胞外部分、可溶性部分、親水性部分、外部部分、又は細胞質顆粒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。

【0131】

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(すなわち、CDR1、CDR2、及び／又はCDR3)の少なくとも一部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(すなわち、CDR1、CDR2、及び／又はCDR3)の少なくとも一部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、及び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技術に関する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)核酸分子を調製して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)と一緒に化学的に結合させることにより調製できる。

10

20

30

40

50

【0132】

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させた抗体生成細胞を調製することができる。あるいは、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。

10

【0133】

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中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としては、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のアミノ酸を、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) を有する第2のアミノ酸で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。

20

30

【0134】

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つのヌクレオチドのコード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を参照されたい)。

40

【0135】

50

【表 1】

1文字表記	3文字表記	名称	3つのヌクレオチドコドン
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

10

20

【0136】

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。

【0137】

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。

30

【0138】

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、分子内の残基ごとに単個のアラニンによる変異を導入する。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)）。

40

【0139】

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。

【0140】

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

50

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。

【0141】

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使用して決定される。

10

【0142】

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。

20

【0143】

当業者には明らかとなるように、本発明には、本発明の少なくとも1つの生物学的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%～100%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。

30

【0144】

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、インビボでの血清半減期の増大）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（polyethylene glycol、PEG）、ポリプロピレングリコール（polypropylene glycol、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。

40

【0145】

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、モノメトキシーポリエチレン

50

グリコール (monomethoxy-polyethylene glycol、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、PEG5000及びPEG20,000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。

【0146】

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 (C₁₂、ラウリン酸塩)、n-テトラデカン酸塩 (C₁₄、ミリスチン酸塩)、n-オクタデカン酸塩 (C₁₈、ステアリン酸塩)、n-エイコサン酸塩 (C₂₀、アラキジン酸塩)、n-ドコサン酸塩 (C₂₂、ベヘン酸)、n-トリアコンタン酸塩 (C₃₀)、n-テトラコンタン酸塩 (C₄₀)、シス-Δ⁹-オクタデカン酸塩 (C₁₈、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 (C₂₀、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。

【0147】

修飾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、用語「修飾剤」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romo、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、及び、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C₁～C₁₂基 (ここで、1つ以上の炭素原子は酸素、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、結合することができる。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、-(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH-及び-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-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 (ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide、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、モノー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(trifluoroacetic acid、TFA)処理により生成物から除去し、記載されているように別のカルボン酸塩にカップリングできる一級アミンを露出させることができ、又はこれを無水マレイン酸と反応させ、得られる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 et al.、国際公開第92/16221号を参照のこと。)

【0148】

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エステルを利用して、部位特異的なものではない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成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。

【0149】

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て応答し、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。

【0150】

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、又はその特定された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重量モル濃度によるものである。

【0151】

本発明の抗TNF抗体組成物は更に、かかる調節、処置又は療法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（sulfasalazine））、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（erythropoietin）（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、喘息薬、 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つを更に含む、任意の好適かつ有効量の組成物又は医薬組成物のうちの少なくとも1つを含み得る。このような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。

【0152】

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、任意選択的に作用させることができる。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なんらかの自然発生するか、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

10

20

30

40

50

ば血清型 0157 の株：H7）、ブドウ球菌種（例えば、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ピオゲネス）、赤痢菌種（例えば、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ボイド赤痢菌及びソネ赤痢菌）、サルモネラ種（例えば、腸チフス菌、サルモネラコレラースイス、サルモネラエンテリティディス）、クロストリジウム種（例えば、クロストリジウム・パーフリンジェンス、クロストリジウム・ディフィシル、クロストリジウム・ボツリヌス）、カンピロバクター種（例えば、カンピロバクター・ジュジュニ、カンピロバクター・フィータス）、ヘリコバクター種（例えば、ヘリコバクター・ピロリ）、アエロモナス種（例えば、アエロモナス・ソブリア、アエロモナス・ハイドロフィラ、アエロモナス・キャビエ）、プレシオモナス・シゲロイデス、腸炎エルシニア、ビブリオ種（例えば、コレラ菌、ビブリオ・パラヘモリティカス）、クレブシエラ種、緑膿菌、及び連鎖球菌の種の株を含むが、これらに限定されない。例えば、Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990)、Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991)、Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990)、Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992、Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991)、Marrack et al, Science, 248:705-711 (1990) 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）。

【0153】

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。薬学的に許容される助剤が好ましい。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, 18th 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できる担体を、日常的に選択することができる。

【0154】

本組成物において有用な医薬品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。

【0155】

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、ラクトー

10

20

30

40

50

ス、スクロース、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。

【0156】

抗TNF抗体組成物は、緩衝剤又はpH調整剤も含むことができ、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。

10

【0157】

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、「TWEEN 20」及び「TWEEN 80」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。

【0158】

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適したこれら及び追加の既知の医薬品賦形剤及び／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」、19th ed., Williams & Williams, (1995)、及び「Physician's Desk Reference」、52^d 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）及び緩衝剤（例えばクエン酸）又はポリマー剤である。

20

【0159】

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できる製剤中に少なくとも1つの抗TNF抗体を含む薬剤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つの既知の保存剤、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

30

40

50

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（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。

【0160】

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抗体を水性希釈剤中で再構成して、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。

【0161】

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り生成してもよいし、又は他の生物源から精製してもよい。

【0162】

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、再構成の際に約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。

【0163】

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。かかる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。

【0164】

他の賦形剤、例えば、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、保存剤エンハンサーは、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。

【0165】

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、薬学的に許容できる可溶化剤、又はポリソ

10

20

30

40

50

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。

【0166】

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。

【0167】

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、現在使用できるよりも便利な治療レジメンを提供することができる。

【0168】

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 °C 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、かかるラベルに最高 1 ～ 12 ヶ月、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。

【0169】

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。

【0170】

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。

【0171】

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もよく、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。

【0172】

これらの単一バイアルシステムを含む認識された装置としては、B-D（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、NOVOPEN（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、AUTOPEN（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、OPTIPEN（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、GENOTROPIN PEN（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、-HUMATROPEN（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、BIOJECTOR（登録商標）（ペン型インジェクタ装置）、Reco-Pen、Humaject、Jtip Needle-Free Injector、Intraject、Medi-Jectなどの溶液を送達するためのペン型インジェクタ装置が挙げられ、例えば、以下により製造又は開発されている。

Becton Dickinson（Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com）,

Disetronic（Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com）;

Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com) ;

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

Medi-Ject Corp（Minneapolis, MN, www.mediject.com）。

【0173】

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）（ペン型インジェクタ装置）などの、再構成し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剤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。

【0174】

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抗体を水性希釈剤中で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、ヒト用医薬製品用途に有用である。

【0175】

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。

【0176】

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。

【0177】

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。

10

【0178】

治療適用。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。

【0179】

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。

20

【0180】

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、強直性脊椎炎、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、喘息、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、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、喘息、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、喘息、重症筋無力症、抗体媒介性細胞障害、III型過敏症反応、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型過敏症、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）、家族性血食組織のリンパ

30

40

50

組織球増多症、皮膚科学的状態、乾癬症、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少なくとも1つが挙げられるがそ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処置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。

【0181】

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、脳卒中、虚血脳卒中、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 arrhythmias)、心室細動、ヒス束不整脈 (His bundle arrhythmias)、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、少なくとも1つの抗TNF抗体を含む有効量の組成物又は医薬組成物を、かかる調節、処置又は療法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。

【0182】

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O157: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。

【0183】

本発明はまた、白血病、急性白血病、急性リンパ球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、B細胞、T細胞又はFAB ALL、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)、慢性骨髄性白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML)、慢性リンパ球性白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL)、有毛細胞白血病、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, 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/高力

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処置するための方法も提供する。

【0184】

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, Shier-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、神経性筋萎縮症 (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、びまん性レビー小体病、レビ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医薬組成物を、このような調節、処置又は療法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, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)を参照のこと。

【0185】

本発明のいずれの方法も、かかる調節、処置、又は療法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医薬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 (sulfasalazine))、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 (erythropoietin) (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、喘息薬、β作動薬、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害剤、

10

20

30

40

50

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。

10

【0186】

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その変異体を更に含む）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、テニダブ、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ー、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。

20

【0187】

本明細書で使用されるとき、「腫瘍壊死因子抗体」、「TNF抗体」、「TNF α 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、TNF α 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、TNF α に結合することができ、抗TNF抗体、その抗原結合断片、及びTNF α 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、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。

30

【0188】

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TNF α IgG1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IgG1 Fc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。

【0189】

キメラA2 (cA2) は、天然及び組換えの両方のヒトTNF α 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TNF α との結合アッセイから、キメラ抗体cA2の親和性定数は、 $1.04 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 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., I

40

50

mmunol. 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、これらの参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0190】

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。

【0191】

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., Cytokine 2(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0218868号(1987年4月22日公開)、Yone et al.、EPO特許公開第0288088号(1988年10月26日)、Liang, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 137: 847-854 (1986); Meager, et al., Hybridoma 6: 305-311 (1987)、Fendly et al., Hybridoma 6: 359-369 (1987)、Bringman, et al., Hybridoma 6: 489-507 (1987)及びHirai, et al., J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987)を参照のこと。これらの参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）。

【0192】

TNF受容体分子。本発明に有用な好ましいTNF受容体分子は、TNF α に高い親和性で結合し（例えば、Feldmann et al.、国際公開第92/07076号(1992年4月30日公開)、Schall et al., Cell 61: 361-370 (1990)、及びLoetscher et al., Cell 61: 351-359 (1990)を参照のこと。これらの参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）、任意選択的に低い免疫原性を有するものである。特に、55kDa (p55 TNF-R)及び75kDa (p75 TNF-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TNF α 阻害結合タンパク質として検出されている(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。

【0193】

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

10

20

30

40

50

み込まれる。

【0194】

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1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(Lessler et al., Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991)、Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler et al., Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker et al., Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler et al., 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)、これらの参考文献の各々は、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 et al., 米国特許第5,116,964号、Capon et al., 米国特許第5,225,538号及びCapon et al., Nature 337:525-531 (1989)にも見ることができ、これら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。

【0195】

TNF受容体分子の機能的等価物、誘導體、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、TNF α 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目指す。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、TNF α 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。

【0196】

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。

【0197】

治療処置。本発明の任意の方法は、かかる調節、処置又は療法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医薬組成物を投与することを含む、TNF媒介障害を処置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(sulfasalazine))、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(erythropoietin)(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、喘息薬、 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。

【0198】

本明細書で使用する時、用語「安全」は、それが本発明の抗TNF抗体(例えば、抗TNF抗体ゴリムマブ)による組成物、用量、投与レジメン、治療又は方法に関する場合、良好なリスクに対する、標準的なケア又は他の抗TNF剤などの別の比較薬と比較した有害事象(adverse events、AE)及び重篤な有害事象(serious adverse events、SAE)の許容可能な頻度及び／又は許容可能な重症度による利益比を指す。有害事象とは、医薬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、本発明の抗TNF抗体による組成物、用量、投与レジメン、治療又は方法に関する場合の安全は、例えば、注入反応、肝胆検査値異常、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。

【0199】

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 사용되는場合、「効果」及び「効果的な」という用語は、本発明の抗TNF抗体(例えば、抗TNF抗体ゴリムマブ)による特定の組成物、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症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、患者に投与される。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、被験者の病気、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。かかる指標には例えば、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、彼らは臨床症状の改善を示す徴候、症状、生検、若しくは他の試験結果、又は疾患活動性の任意の他の尺度に基づいて決定してもよい。例えば、本発明の抗TNF抗体は、若年性特発性関節炎(JIA)、特に多関節型若年性特発性関節炎(pJIA)に関する患者の状態の改善を得るために投与することができる。JIA及び／又はpJIAの治療における有効性は、例えば、非活動性疾患の基準を満たす患者、JIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70、及び／又はJIA ACR90から選択されるJIA米国リウマチ学会(JIA ACR)応答に対応するベースラインからの改善を有する患者、及び／又はJADAS10、JADAS27、及び／又はJADAS71から選択される若年性関節炎疾患活動性スコア(JADAS)のベースラインからの減少を有する患者によって決定することができる。

【0200】

本明細書で使用する時、特に断りがない限り、用語「臨床的に証明された」（独立して、又は用語「安全（性）」及び／又は「有効（性）」を修飾するために使用される）は、米国食品医薬品局、E M E A、又は対応する国家規制機関の承認基準を満たしている臨床試験によって証明されていることを意味するものとする。例えば、臨床研究は、薬剤の効果を臨床的に証明するために使用される、適切なサイズの無作為化二重盲検試験であってもよい。

【0201】

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、平均して、合計、1回の投与当たり患者の体重1kg当たり少なくとも約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当たり患者の体重1kg当たり少なくとも約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り達成される。あるいは、有効な血清濃度は、単回又は複数回投与当たり、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、すなわち、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。

【0202】

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当たりの血清濃度0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500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。

【0203】

あるいは、投与される用量は、特定の薬剤の薬力学的特徴並びにその投与の方法及び経路、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キログラム当たり約0.1～100ミリグラムであり得る。通常、投与当たり1キログラム当たり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。

【0204】

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、あるいは又は追加的に、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若しくは第52週目のうちの少なくとも1週に、あるいは又は追加的に、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日当たり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。

10

【0205】

体内投与に好適な剤形（組成物）は、一般に、1単位又は容器当たり約0.1ミリグラム~約500ミリグラムの活性成分を含有する。これらの医薬組成物において、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。

20

【0206】

非経口投与には、抗体は、薬学的に許容でき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。

【0207】

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。

30

【0208】

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。

【0209】

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適した様々なデバイス及び方法のいずれかをを使用して、送達することができる。

40

【0210】

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、例えば、水溶液、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

50

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射デバイス、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。

【0211】

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、頸管内、胃内、肝内、筋肉内、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、ボラス、膈内、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、膈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エンハンサーを用いて（Junginger, et al. In「Drug Permeation Enhancement」; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994、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を可能にする酸化剤を用いて（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oresis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）。

【0212】

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適した他のデバイスも、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適した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、吸気時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）（Glaxo）、DISKUS（登録商標）（吸入器）（Glaxo）、SPIROS（登録商標）（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、混合粉末の呼気作動を使用する（米国特許第4668218号

10

20

30

40

50

(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(登録商標)(ネブライザー)(Aradigm)、ULTRAVENT(登録商標)(ネブライザー)(Mallinckrodt)、及びAcorn IIネブライザー(Marquest Medical Products)(米国特許第5404871号(Aradigm)、国際公開第97/22376号)(上記の文献は参照により全体が本明細書に組み込まれる)などのネブライザー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、本発明の実施に適した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、うまく呼吸できるよう、例えば、約10 μ m未満、好ましくは約1~5 μ mの小さな乾燥粒子を送達することができる。

【0213】

噴霧でのTNF抗体組成物の投与。TNF抗体組成物タンパク質を含む噴霧は、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ともに電界により静電噴霧を生成することができる。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10 μ m未満、好ましくは約1 μ m~約5 μ m、最も好ましくは約2 μ m~約3 μ mの範囲の粒径を有する。

【0214】

噴霧器とともに使用するのに適した少なくとも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若しくはmg/gmであるがこれらに限定されない、1mL若しくはmg/gmの溶液当たり約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ついて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。

【0215】

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を作り出され、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10 µm未満、好ましくは約1 µm～約5 µm、最も好ましくは約2 µm～約3 µmの範囲の粒径を有する。

【0216】

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適した少なくとも1つの抗TNF抗体の製剤は、典型的には、溶液1 mL当たり約0.1 mg～約100 mg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。

【0217】

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。計量バルブの起動により、約10 µm未満、好ましくは約1 µm～約5 µm、最も好ましくは約2 µm～約3 µmの範囲の大きさの粒子を含有するエアゾールとして混合物が放出される。所望のエアゾール粒径は、ジェットミル粉碎、噴霧乾燥、臨界点凝縮などが挙げられる当業者に既知の多様な方法により生成される、抗体組成物タンパク質の処方を使用することにより得ることができる。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。

【0218】

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。

【0219】

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。

【0220】

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、胰トリプシン阻害剤、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）、パラベン保存剤（ソルビン酸）、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、抗酸化剤（システイン）、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。

【0221】

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、例えば水を含むことができる。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（プロテインノイド）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5,587,713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。

【0222】

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適する粘膜表面には、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（pregelatinated starch）などが挙げられる（米国特許第5,849,695号）。

【0223】

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）。

【0224】

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週間～1年間、被験者に送達することが時に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できる非毒性塩、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、ナフタレンモノー又はジスルホン酸、ポリガラクト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、ゴマ油とともに、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配合することができる。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処方、例えば、気体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編、Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1978）で既知である。

【0225】

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。

【0226】

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。

【0227】

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つのプロモーター要素、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、エンハンサー、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ー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ー、レトロウイルス、例えば、RSV、HTLV I、HIV Iからの長末端反復(long terminal repeats、LTRS)、及びサイトメガロウイルス(cytomegalovirus、CMV)の初期プロモーター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ー）。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 (ATCC 37152)、pSV2dhfr (ATCC 37146) 並びにpBC12MI (ATCC 67109) 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。

【0228】

あるいは、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。

【0229】

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/Technology 10: 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。

【0230】

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ー (LTR) (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5: 438-447 (1985)) に加え、CMVエンハンサー (Boshart, et al., Cell 41: 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。

【0231】

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初期プロモーターの制御下でマウス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 C. M. A. Biochem. et Biophys. Acta 1097: 107-143 (1990)、及びM. J. Page and M. A. Sydenham, Biotechnology 9: 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。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。

10

20

30

40

50

【0232】

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) の強いプロモーター (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ー (Boshart, et al., Cell 41: 521-530 (1985)) から単離された断片を含有する。プロモーターの下流は、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ー、例えば、ヒトβアクトチンプロモーター、SV40 初期若しくは後期プロモーター、又は他のレトロウイルス、例えば HIV 及び HTLV I 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. USA 89: 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、gp_t、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つより多い選択マーカー、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。

【0233】

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。

【0234】

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 T4 DNA リガーゼでライゲートする。次に、大腸菌 HB101 又は XL-1 Blue 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。

【0235】

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。5 µg の発現プラスミド pC4 は、リポフェクチンを使用して、0.5 µg 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。1 µg/mL の G418 で補充した α マイナス 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 50 ng/mL のメトトレキサート + 1 µg/mL の G418 で補充した α マイナス 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 (50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM) を使用して、6 ウェルペトリ皿又は 10 mL 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 (1 mM、2 mM、5 mM、10 mM、20 mM) を含む新しい 6 ウェルプレートに移す。100~200 mM 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。

【0236】

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。

【0237】

概要。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)F₂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., Nature 368:856-859 (1994)、Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996)、Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (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 $1 \times 10^9 \sim 9 \times 10^{12}$ 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。

【0238】

略語。BSA-ウシ血清アルブミン、CO₂-二酸化炭素、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、H₂O₂-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又は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-単位容量当たりの容量、w/v-単位容量当たりの重量。

【0239】

材料及び方法

動物。ヒト抗体を発現し得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, Fremont, CAなどから)市販されており、これは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., Nature 368:856-859 (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 Biotechnology 14:845-851 (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。

【0240】

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に従って、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(1~400μg x 2)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、100 μ Lの生理学的生理食塩水に希釈した1~400 μ g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、100 U/mLのペニシリン、100 μ g/mLのストレプトマイシン及び0.25 μ g/mLのアンホテリシンB (PSA)を含有する、10 mL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、25 mMヘペスを含有するRPMI 1640培地に再懸濁する。

10

【0241】

細胞融合。既知の、例えば、当該技術分野で既知の方法に従い、1:1~1:10のマウス骨髓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、脾臓細胞及び骨髓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°Cでゆっくり1 mL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25 mMヘペスを含有する10.5 mLのRPMI 1640培地 (37°C)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500~1500 rpmで遠心分離する。その後、細胞をHAT培地 (25 mMヘペス、10%胎児クロンI血清 (Hyclone)、1 mMピルビン酸ナトリウム、4 mM L-グルタミン、10 μ g/mLのゲンタマイシン、2.5% Origin培養サプリメント (Fisher)、10% 653調整RPMI 1640/ヘペス培地、50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン及び16 μ M チミジンを含むRPMI 1640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200 μ L/ウェルで平板培養する。次に、7~10日間、5% CO₂及び95%空気を含有する加湿した37°Cのインキュベータにプレートを配置する。

20

【0242】

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2 μ g/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) Tween 20を含有する0.15 M生理食塩水で洗浄した後、ウェルをPBS中1% (w/v) BSA、200 μ L/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°Cで凍結する。マウス血清希釈物を、50 μ L/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特異的な50 μ L/ウェルHRP標識ヤギ抗ヒトIgGにより、室温で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、100 μ L/ウェルのクエン酸塩-リン酸塩基質溶液 (0.1 Mクエン酸及び0.2 Mリン酸ナトリウム、0.01% H₂O₂及び1 mg/mL OPD)を15分かけて室温で添加する。次に、25 μ L/ウェルで反応停止溶液 (4 N硫酸)を添加し、自動プレート分光光度計により490 nmでODを読み取る。

30

40

【0243】

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°Cで一晩、炭酸ナトリウム緩衝剤中10 μ g/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°Cで1時間、1% BSA-PBSで遮断し、直ちに使用するか、又は-20°C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°Cで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 により、37°Cで1時間プローブする。次に

50

、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する。

【0244】

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、上清をやぎ抗ヒト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、ウェル当たり適切な計数で、放射線標識されたTNFでプローブする。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。

【0245】

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。

【0246】

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IgG1又はHRP標識ヤギ抗ヒトIgG3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ともにインキュベートする。

【0247】

ヒトTNFによるヒト抗ヒトTNF抗体の結合動力学。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。

【0248】

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BIACore 2000ユニットに配置する。HBS緩衝剤（0.01Mヘプス、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、一晚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。

【0249】

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。2つのフローセルを動態実行に使用し、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。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（2回順次注射することにより、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））。

【0250】

10

20

30

40

50

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($k_a, \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)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。

【0251】

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。

【0252】

ヒト抗ヒトTNF抗体の結合動力学。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及び図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。

【0253】

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 $1 \times 10^{-9} \sim 7 \times 10^{-12}$ 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。

【0254】

結論。

【0255】

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した。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、 $1 \times 10^{-9} \sim 9 \times 10^{-12}$ 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。

【0256】

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。

【0257】

概要。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)F₂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に移された。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。

【0258】

略語：BSA—ウシ血清アルブミン、CO₂—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、H₂O₂—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—

10

20

30

40

50

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、TNF α －腫瘍壊死因子 α 、v/v－単位容量当たりの容量、w/v－単位容量当たりの重量。

【0259】

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TNF α 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、TNF α 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。

10

【0260】

本明細書で定義されるように、用語「半減期」は、薬物の血漿濃度（例えば、治療用の抗TNF α 抗体）が、1消失半減期後に半減することを示す。したがって、それぞれの後続の半減期では、より少ない薬物が消失する。1半減期後に体内に残っている薬物の量は50%であり、2半減期後では25%、といった具合である。薬物の半減期は、そのクリアランス及び分布容積に依存する。消失半減期は、体内の薬物の量とは無関係であると考えられる。

【0261】

材料及び方法。

【0262】

動物。ヒト免疫グロブリンを発現するが、マウスIgM又はIgk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Vk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 γ 1(2)、並びに／又は γ 3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、HC α 12/KC α 5遺伝子型系統由来のマウスを使用した。

20

【0263】

ヒトTNF α の精製。セファロース4B (Pharmacia) に連結されたTNF α 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、アフィニティークロマトグラフィーにより、ヒトTNF α 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TNF α を溶出し、2MトリスHCl、pH8.5で中和した。精製されたTNF α は、10mMトリス、0.12M塩化ナトリウム、pH7.5に緩衝剤交換され、0.2 μ mのシリンジフィルタを通して濾過された。

30

【0264】

免疫化。約16週齢の雌のGenPharmマウスを、第0、第12及び第28日目に等量のTitermaxアジュバントで乳化した合計100 μ gのTNF α (ロットJG102298又はJG102098)で、IP(200 μ L)及びID(尾の付け根にて100 μ L)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、TNF α 固相EIAアッセイを使用して滴定した。第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、TNF α に対して1:160の特定のヒトIgG力価を有するマウスに、100 μ Lの生理学的生理食塩水で希釈した50 μ gのTNF α 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、100 μ g/mLのストレプト

40

50

マイシン及び0.25 µg/mLのアンホテリシンB (PSA) を含有する、10 mL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、25 mMヘペスを含有するRPMI 1640培地に再懸濁した。

【0265】

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髓腫融合パートナー653を受け取った。細胞株を、10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、1 mMピルビン酸ナトリウム、0.1 mM NEAA、2 mM 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)。

【0266】

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)、2 mM L-グルタミン (全てJRH Biosciencesから) 及び0.5 µg/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。

【0267】

細胞融合。細胞融合は、1:1の比率の653マウス骨髓腫細胞及びマウス生脾臓細胞を使用して行った。簡潔に、脾臓細胞及び骨髓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°Cでゆっくり1 mLの50% (w/v) PEG/PBS溶液 (PEG分子量1,450 g/mol, Sigma) に再懸濁した。1分間かけて10.5 mLのRPMI培地 (添加剤なし) (JRH) (37°C) 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750 rpmで遠心分離した。次いで、細胞をHAT培地 (10% ウシ胎児血清 (JRH)、1 mMピルビン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、10 µg/mL ゲンタマイシン、2.5% Origen培養サプリメント (Fisher)、50 µM 2-メルカプトエタノール、1% 653調整RPMI培地、100 µM ヒポキサンチン、0.4 µM アミノプテリン、及び16 µM チミジンを含むRPMI/ヘペス培地) 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200 µL/ウェルで平板培養した。次に、7~10日間、5% CO₂ 及び95% 空気を含有する加湿した37°Cのインキュベータにプレートを配置した。

【0268】

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1 µg/mLのTNFαで一晩プレートをコーティングした。0.02% (v/v) Tween 20を含有する0.15 M生理食塩水で洗浄した後、ウェルをPBS中1% (w/v) BSA、200 µL/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°Cで凍結されるかのいずれかであった。マウス血清を、50 µL/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-P

10

20

30

40

50

B S中に1：30，000で希釈したFc特異的（Accurate）な50μL／ウェルのHRP標識ヤギ抗ヒトIgGにより、室温で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% H₂O₂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。

【0269】

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 結合ヤギ抗ヒトκ（Southern Biotech）抗体、又は1% BSA-HBSS中で1：30，000に希釈したHRP 結合ヤギ抗ヒト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。

【0270】

アイソタイプ。抗体のアイソタイプの決定は、特定の力価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、上述のように遮断した。24ウェル培養物からの希釈なしの上清を、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IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄（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。

【0271】

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。

【0272】

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。

【0273】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1 : G e n T N V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

10

【0274】

結論。

G e n T N V融合は、C e n t o c o rで調製された組換えヒトT N F α 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むハイブリッドマウスからの脾細胞を利用して行われた。I g G 1 κ アイソタイプの8つの完全ヒトT N F α 反応性I g Gモノクローナル抗体を生成した。親細胞株は、更なる特徴付け及び開発のためにM o l e c u l a r B i o l o g yグループに移された。これらの新しいヒト抗体のうちの1つは、R e m i c a d e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。

20

【0275】

参考文献：

T a y l o r, e t a l., I n t e r n a t i o n a l I m m u n o l o g y 6 : 5 7 9 - 5 9 1 (1 9 9 3) 。

L o n b e r g, e t a l., N a t u r e 3 6 8 : 8 5 6 - 8 5 9 (1 9 9 4) 。

N e u b e r g e r, M. N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 4 : 8 2 6 (1 9 9 6) 。

F i s h w i l d, e t a l., N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 4 : 8 4 5 - 8 5 1 (1 9 9 6) 。

30

S c a l l o n, e t a l., C y t o k i n e 7 : 7 5 9 - 7 7 0 (1 9 9 5) 。

【0276】

実施例 4：ヒト抗T N F α 抗体を発現する細胞株のクローニング及び調製。

概要。T N V表記の8つのヒトモノクローナル抗体 (m A b) のパネルは、明らかに高結合活性で固定化されたヒトT N F α に結合することが認められた。8つのm A bのうちの7つは、組換えT N F受容体へのヒトT N F α の結合を効率的に遮断することを示した。7つのm A bをコード化するDNAの配列分析は、全てのm A b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m A bが互いに同一であり、そのため8つのm A bの元のパネルがT N V 1 4、T N V 1 5、T N V 1 4 8、及びT N V 1 9 6で表される4つの別個のm A bのみを含むことも明らかにした。m A bの推定アミノ酸配列の分析及びインビトロT N F α 中和データの結果に基づいて、m A b T N V 1 4 8及びT N V 1 4を更なる研究のために選択した。

40

【0277】

T N V 1 4 8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m A bはT N V 1 4 8 Bと表記された。T N V 1 4 8 B及びT N V 1 4の重鎖及び軽鎖可変領域をコード化するP C R増幅DNAを、別のヒトm A b (1 2 B 7 5) 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、I L - 1 2 A n t i b o

50

dies, 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。

【0278】

P3X63Ag8.653(653)細胞又はSp2/0-Ag14(Sp2/0)マウス骨髓腫細胞を、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rTNV148B mAb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。

10

【0279】

序論。ヒトTNF α 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TNF α に結合しかつ完全ヒトIgG1 κ 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、TNF α 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TNF α 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。

20

【0280】

TNV148 mAb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マウス骨髓腫細胞内に導入し、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。

【0281】

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。¹²⁵Iodine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。

30

40

【0282】

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た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

50

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。

【0283】

【表3】

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)
BstBI		T V T V S (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)
Afl2		T K V D I K (配列番号28)
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)

【0284】

653マウス骨髓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マウス骨髓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A及びB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。

【0285】

受容体へのTNFの結合の阻害のためのアッセイ。TNF 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¹²⁵I標識TNFαの結合を遮断する能力についてアッセイした (Scallone et al. (1995) Cytokine 7:759-770)。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Opti plates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TNF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-18 mAb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5 ng/mLとなるように、¹²⁵I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時間ブレインキュベートした。コーティングされたOpti platesを洗浄して未結合のp55-sf2を除去し、50: Lの¹²⁵I-TNFα/細胞上清混合物をOpti platesに移した。室温で2時間後、PBS-Tweenで3回、Opti platesを洗浄した。100: LのMicroscint-20を添加し、Top Count y計数器を使用して結合したcpmを決定した。

【0286】

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。7×10⁶~1.7×10⁷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。

【0287】

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。

【0288】

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10×HIFI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。

【0289】

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。50 µL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10 µLの容量まで乾燥させた。次に、総容量20 µLの、1 µLの精製されたPCR生成物、10 µMオリゴヌクレオチドプライマー、4 µLのBig Dye Terminator (商標) ready reaction mix、及び14 µL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、ABI 377 DNAシーケンサを使用して検出された。

【0290】

アミノ酸を変更するための部位特異的突然変異誘発。TNV148 mAbにおいてPro⁷⁵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、QuickChange (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。10 ng又は50 ngのいずれかのTNV148重鎖プラスミドテンプレート(p1753)、5 µLの10X反応緩衝剤、1 µLのdNTPミックス、125 ngのプライマー399、125 ngのプライマー400及び1 µL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50 µL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、その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1 µL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、1 µL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20 µL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、1 µLのプラスミドを、3 µLのBig Dyeミックス、1 µLのpUC19フォワードプライマー、及び10 µL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。

【0291】

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-12 Antibodie

10

20

30

40

50

s, 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号に開示されており、その全体は参照により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。

【0292】

プラスミドp1560の12B75重鎖遺伝子を修飾するために、プロモーター及び可変領域を含有する6.85kbのBamHI/HindIII断片をp1560からpUC19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、QuickChange (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BstBI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。

【0293】

プラスミドp1558の12B75軽鎖遺伝子を修飾するために、12B75プロモーター及び可変領域を含有する5.7kbのSalI/AflIII断片を、p1558からプラスミドL28のXhoI/AflIII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、QuickChange (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AflIII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。この目的で使用され得る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BsiWI、AflIII、HindIII、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AflIII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AflIII部位とHindIII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、プロモーター及び可変領域を含有するBsiWI/AflIII断片が遺伝子の2つの半分の結合して移入できるBsiWI及びAflIIIの固有の部位を含有していた。

【0294】

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。

【0295】

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。

【0296】

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。

【0297】

【表4】

Mab	Gm(f+)		G1m(z)	
	128ベクター プラスミドID	中間 プラスミドID	発現 プラスミドID	発現 プラスミドID
重鎖				
TNV14	p1751	p1777	p1781	p1786
TNV15	p1752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148 p1753	p1778	p1782	p1787	
TNV148 Bp1760	p1779	p1783	p1788	
TNV196 p1754	(ND)	(ND)	(ND)	
	pBCベクター プラスミドID	中間 プラスミドID	発現 プラスミドID	
軽鎖				
TNV14	p1748	p1755	p1775	
TNV15	p1748	p1755	p1775	
TNV148	p1749	p1756	p1776	
TNV196	p1749	p1756	p1776	

【0298】

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、p 1 7 4 8 及び p 1 7 4 9 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、p 1 7 4 8 及び p 1 7 4 9 の S a l I / A f l I I 断片を、中間ベクター p 1 7 4 6 の S a l I 部位と A f l I I 部位との間にクローニングして、それぞれ p 1 7 5 5 及び p 1 7 5 6 を作製した。次に、軽鎖遺伝子のこれらの 5' 等分を、B s i W I / A f l I I 断片を p 1 7 5 5 及び p 1 7 5 6 から新しく調製されたコンストラクト p 1 7 6 2 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 p 1 7 7 5 及び p 1 7 7 6 を作製した（表 2）。

【0299】

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 T N V 発現プラスミドで行った（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 S p 2 / 0 又は 6 5 3 であったか、（2）重鎖定常領域が C e n t o c o r の以前の I g G 1 ベクター又は 1 2 B 7 5 重鎖定常領域でコード化されたか、（3）m A b が T N V 1 4 8 B、T N V 1 4 8、T N V 1 4、又は新しい H C / L C 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 A b 遺伝子インサートであったかどうか、及び（5）重鎖遺伝子における完全な J - C イントロン配列の有無により区別された。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。

【0300】

S p 2 / 0 細胞及び 6 5 3 細胞は各々、前に記載された標準条件下で（K n i g h t D M e t a l . (1993) M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 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、S a l I 及び N o t I 制限酵素は、それぞれ T N V 1 4 8 B 重鎖プラスミド p 1 7 8 3 及び軽鎖プラスミド p 1 7 7 6 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、B a m H I で重鎖プラスミドを、そして B s i W I 及び N o t I で軽鎖プラスミドを消化することにより、m A b 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 Q i e x 精製樹脂により、m A b 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 P s t I 線形化 p S V 2 g p t プラスミド（p 1 3）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 I M D M、15 % F B S、2 m M グルタミン中に細胞を播種し、5 % C O₂ のインキュベータにおいて、37 °C でインキュベートした。2 日後、等量の I M D M、5 % F B S、2 m M グルタミン、2 X M H X 選択物（1 X M H X = 0.5 : g / m L のマイコフェノール酸、2.5 : g / m L のヒポキサンチン、50 : g / m L 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。

【0301】

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 E L I S A によりヒト I g G についてアッセイした。簡潔に言うと、ポリクロナルヤギ抗ヒト I g G F c 断片でコーティングされた 96 ウェル E I A 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 I g G（H + L）及び適切な色基質を使用して結合ヒト I g G 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 m A b を標準として使用した標準曲線は、上清中のヒト I g G の定量化を可能にするために各 E I A プレートに含まれた。最もヒト I g G 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、続けて、生成が最も高い親クローンを特定した。

【0302】

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、1×MHXの、ウェル当たり1つの細胞又はウェル当たり4つの細胞を播種し、コロニーが現れるまで、12～20日間、5%CO₂インキュベータにおいて37℃でインキュベートした。ウェル当たり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。

10

【0303】

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1×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rTNV14 JG92399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た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。

20

【0304】

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で、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、0.2×MHX、又は1×MHX（1×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。

30

【0305】

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、又は有しないのいずれかで、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。

【0306】

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、¹²⁵I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

40

50

c A 2 陽性対照 m A b よりも T N F α 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、T N V m A b が細胞系アッセイ及びインビボで T N F α 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。

【0307】

D N A 配列の分析。

R N A がヒト m A b 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 T N F α 遮断活性を示した 7 つの T N V m A b (T N V 1 4、T N V 1 5、T N V 3 2、T N V 8 6、T N V 1 1 8、T N V 1 4 8、及び T N V 1 9 6) を特徴付ける際の最初の工程として、これらの m A b を生成する 7 つのハイブリドーマ細胞株から全 R N A を単離した。次に、各 R N A 試料を使用して、各 m A b 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 c D N A を調製した。次に、これらの c D N A 生成物を P C R 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 P C R 増幅 D N A を直接配列決定した。配列決定した重鎖 c D N A 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 D P - 4 6 と 9 0 % を超えて同一であった (図 2)。同様に、配列決定した軽鎖 c D N A 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 1 0 0 % 同一又は 9 8 % 同一のいずれかであった (図 3)。これらの配列結果は、c D N A に転写され配列決定された R N A 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 P C R 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 T N V 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 T N V m A b の実際の配列を表すことに留意するべきである。

【0308】

固有の中和 m A b。

各 m A b の重鎖及び軽鎖両方の可変領域全体の c D N A 配列の分析は、T N V 3 2 が T N V 1 5 と同一であり、T N V 1 1 8 が T N V 1 4 と同一であり、T N V 8 6 が T N V 1 4 8 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、D N A 配列分析と一致していた、すなわち、T N V 8 6 及び T N V 1 4 8 の両方が、T N F 結合の遮断において T N V 1 1 8 及び T N V 1 4 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 T N V m A b である、T N V 1 4、T N V 1 5、T N V 1 4 8、及び T N V 1 9 6 にのみ焦点を当てた。

【0309】

4 つの m A b の関連性

D N A 配列結果は、4 つの T N V m A b 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 D P - 4 6 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 C D R 3 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 J 6 エクソンを使用するため、それらは明らかに、単一の V D J 遺伝子再配列事象から生じ、この後に各 m A b を固有のものにする体細胞変化が続いた。D N A 配列分析は、4 つの m A b 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)。T N V 1 4 及び T N V 1 5 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 V g / 3 8 K ファミリーの代表的な生殖系列配列と同一である。T N V 1 4 8 及び T N V 1 9 6 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)。

【0310】

4 つの m A b の推定アミノ酸配列は、実際の m A b の関連性を明らかにした。4 つの m A b は、4 つの別個の重鎖を含有するが (図 4)、別個の軽鎖は 2 つのみである (図 5)。T N V m A b 配列と生殖系列配列との間の差異は、大半は C D R ドメインに限定されていたが、m A b 重鎖のうちの 3 つもまた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)。D P - 4 6 生殖系列コード A b フレームワーク領域と比較して、

T N V 1 4 は同一であり、T N V 1 5 は1つのアミノ酸が異なり、T N V 1 4 8 は2つのアミノ酸が異なり、T N V 1 9 6 は3つのアミノ酸が異なっていた。

【0311】

c D N A のクローニング、部位特異的突然変異誘発、及び最終発現プラスミドのアセンブリ。c D N A のクローニング。P C R 増幅可変領域の D N A 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で、新しいオリゴヌクレオチドは別の P C R 増幅を行うように命じられた。重鎖の場合、この2回目の P C R の生成物は制限酵素 B s i W I 及び B s t B I で消化され、プラスミドベクター L 2 8 (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 P C R 生成物は S a l I 及び A f l I I で消化され、プラスミドベクター p B C 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 P C R 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。

10

【0312】

T N V 1 4 8 を変更するための部位特異的突然変異誘発。m A b T N V 1 4 8 及び T N V 1 9 6 は、T N F α 生理活性の中和において、次に最良の m A b (T N V 1 4) 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、T N V 1 4 8 及び T N V 1 9 6 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。T N V 1 4 8 重鎖配列と他のヒト抗体との比較は、多くの他のヒト m A b がフレームワーク1の位置28で I l e 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 P r o 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。

20

【0313】

T N V 1 9 6 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 m A b 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、T N V 1 4 8 及び T N V 1 9 6 を免疫原性にする可能性があった。T N V 1 4 8 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 T N F α 結合に重要ではないと考えられているため、部位特異的突然変異誘発技術を使用して、生殖系列 S e r 残基が位置75で P r o 残基の代わりにコード化されるように、T N V 1 4 8 重鎖コード配列(プラスミド p 1 7 5 3 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 p 1 7 6 0 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 m A b は、それを元の T N V 1 4 8 遺伝子及び m A b と区別するために T N V 1 4 8 B と呼ばれた(図5を参照のこと)。

30

【0314】

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 1 2 B 7 5 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 T N V 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、プロモーター、及びイントロンエンハンサーは、それぞれの 1 2 B 7 5 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 1 2 B 7 5 の軽鎖遺伝子に由来した。最終生成細胞株(p 1 7 8 1 及び p 1 7 8 3、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 I g G 1 定常領域コード配列は、前に使用された C e n t o c o r の発現ベクター(p 1 0 4)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 T N V m A b (G 1 m (z))とは異なるアロタイプ(G m (f+))の T N V m A b を発現する。これは、G e n P h a r m マウスに由来する 1 2 B 7 5 重鎖遺伝子は C H 1 ドメインの C 末端部で A r g 残基をコード化するが、C e n t o c o r の I g G 1 発現ベクター p 1 0 4 はその位置で L y s 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 1 2 B 7 5 重鎖遺伝子に由来する他の重鎖発現プラスミド(例えば、p 1 7 8 6、p 1 7 8 8)が調製されたが、これらの遺伝子でトランスフェクトされた細胞株は、生成細胞株として選択されなかった。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 P C R 増幅 V 領域

40

50

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。

【0315】

PCR増幅可変領域cDNAは、L28又はpBCベクターから、プロモーター領域及び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'半分を含む制限断片を、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。

【0316】

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マウス骨髓腫細胞は、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が行われ、そのほとんどはAbで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。

【0317】

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。

【0318】

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」）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。

【0319】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4. 細胞トランスフェクションの要約。

トランスフェクション 番号 mAb	プラスミド HC/LC/gpt	HC		DNA	
		ベクター	フォーマット	Sp2/0	653
rTNV148B	1783/1776	旧	線状	1	2
rTNV14	1781/1775	旧	線状	3	—
rTNV148B	1788/1776/13	新	インサート	4, 6	5, 7
rTNV14	1786/1775/13	新	インサート	8, 10	9, 11
rTNV148	1787/1776/13	新	インサート	12	17
rH1/L2	1786/1776/13	新	インサート	13	14
rTNV148B	1801/1776	旧	線状	16	

10

【0320】

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回目のサブクローニングが全て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ニングに対して少なくとも2倍の増加であった。これらの653細胞株に、表5に示されるように、Cコード表記を割り当てた。

【0321】

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細胞株をC467Aと表記した（表5）。

20

【0322】

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。この細胞株をC476Aと表記した（表5）。

【0323】

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。

30

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。

【0324】

【表 6】

mAb	元の クローン名	Cコード	使用済の24ウェル	
			宿主細胞	生成量
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

40

【0325】

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 $1.0 \times 10^6 \sim 1.25 \times 10^6$ 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、

50

生成が最高の S p 2 / 0 サブクローン C 4 6 7 A は、 2.0×10^6 細胞 / mL のピーク細胞密度及び $25 : g / mL$ の最大 m A b 蓄積レベルに達した (図 7)。成長曲線分析は、r T N V 1 4 生成細胞株 C 4 7 6 A に対して行われなかった。

【0326】

更なる成長曲線分析を行って、異なる M H X 選択物濃度における成長速度を比較した。この比較は、M H X の不在下で培養された C 4 6 6 細胞が、通常量の M H X (1 X) 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数桁の大きさ以上に測定される傾向にあるため、より低い濃度の M H X を使用することにより、m A b 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 C 4 6 6 A 及び C 4 6 6 B は、M H X なし、0.2 X M H X、又は 1 X M H X 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、M H X 濃度依存性細胞成長率が明らかになった (図 8)。細胞株 C 4 6 6 A は、1 X M H X において 25.0 時間の倍加時間を示したが、M H X 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 C 4 6 6 B は、1 X M H X において 32.4 時間の倍加時間を示したが、M H X 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、0.2 X M H X における両細胞株の倍加時間は、1 X M H X よりも M H X なしで観測されたものより類似していた (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クターにおいて、増強された細胞性能がより少ない M H X 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 C 4 6 6 D が M H X の不在下でも少なくとも 60 日間、r T N V 1 4 8 B 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、M H X の不在と比較して、細胞が M H X の存在下で培養されたとき、より高い m A b 生成レベルも示した。

【0327】

約 60 日の期間にわたって様々な細胞株からの m A b の生成を評価するために、M H X 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。細胞株の全てが高い m A b 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 C 4 6 6 A の生成は研究開始時よりも約 45% 少なかった。クローン C 4 6 6 B 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 C 4 6 6 C 及び C 4 6 6 D は、かなり安定した生成を維持し、C 4 6 6 D は最も高い絶対生成レベルを示した (図 9)。

【0328】

結論

ヒト T N F α に対する 8 つのヒト m A b の初期パネルから、タンパク質配列及び T N F 中和効力を含むいくつかの基準に基づいて、T N V 1 4 8 B が、T N V 1 4 と同様に好ましいものとして選ばれた。100 : g / mL 超の r T N V 1 4 8 B 及び 19 : g / mL 超の r T N V 1 4 を生成する細胞株を調製した。

【0329】

実施例 5 : 単回ボーラス注射を使用した抗 T N F 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 T g 1 9 7 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、D u l b e c c o の P B S (D - P B S)、又は $1 mg / kg$ 若しくは $10 mg / kg$ のいずれかの本発明の抗 T N F 抗体 (T N V 1 4、T N V 1 4 8、又は T N V 1 9 6) の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。

【0330】

結果 : 体重を投与前からの変化として分析したとき、 $10 mg / kg$ の c A 2 で処置した動物は、研究を通して D - P B S 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、第 3 ~ 第 7 週目で有意であった。 $10 mg / kg$ の T N V 1 4 8 で処置した動物も、研究の第 7 週目に有意な体重増加を達成した。(図 10 を参照されたい)。

【0331】

図 11 A ~ 図 11 C は、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。 $10 mg / kg$

g の c A 2 で処置した群の関節炎指数は、第 3 週目から始まり、残りの研究の間中（第 7 週目）継続して D - P B S 対照群よりも低かった。1 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物及び 1 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、D - P B S 処置群と比較したとき、第 3 週目以降の A I 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（1 0 m g / k g の T N V 1 4、1 4 8 及び 1 9 6 と比較した 1 0 m g / k g の c A 2）、1 0 m g / k g の処置群の間に有意差はなかった。1 m g / k g の処置群を比較したとき、1 m g / k g の T N V 1 4 8 は、1 m g / k g の c A 2 よりも第 3、第 4 及び第 7 週目で有意に低い A I を示した。1 m g / k g の T N V 1 4 8 も、1 m g / k g の T N V 1 4 処置群よりも第 3 及び第 4 週目で有意に低かった。T N V 1 9 6 は研究の第 6 週目まで A I において有意な減少を示したが（D - P B S 処置群と比較したとき）、T N V 1 4 8 はこの研究の終了時に有意のままであった唯一の 1 m g / k g 処置群であった。

10

【 0 3 3 2 】

実施例 6：複数ボーラス投与として抗 T N F 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 T g 1 9 7 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 - P B S）、又は 3 m g / k g の抗体（T N V 1 4、T N V 1 4 8）（第 0 週目）の腹腔内ボーラス投与で処置した。注射は第 1、第 2、第 3 及び第 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、第 2、第 3 及び第 4 週目の T N V 1 4 又は T N V 1 4 8 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。

20

【 0 3 3 3 】

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。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、研究を通して D - P B S 処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。（図 1 2 を参照されたい）。

【 0 3 3 4 】

図 1 3 A ~ 図 1 3 C は、関節炎指数に基づく疾患の重症度の進行を表す。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した群の関節炎指数は、第 2 週目から始まり、残りの研究の間中（第 5 週目）継続して D - P B S 対照群よりも有意に低かった。1 m g / k g 又は 3 m g / k g の c A 2 で処置した動物及び 3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物は、d - P B S 対照群と比較したときに、研究を通して任意の時点で A I 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。3 m g / k g の T N V 1 4 8 で処置した動物は、d - P B S 処置群と比較したとき、第 3 週目から始まり、第 5 週目まで継続する有意な減少を示した。1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物は、研究の第 4 及び第 5 週目でより低い用量の両方の c A 2（1 m g / k g 及び 3 m g / k g）と比較したとき、A I において有意な減少を示し、また第 3 ~ 第 5 週目で T N V 1 4 で処置した動物よりも有意に低かった。3 m g / k g の処置群のいずれかの間に有意差はなかったようだが、3 m g / k g の T N V 1 4 で処置した動物に関する A I は、いくつかの時点で 1 0 m g / k g よりも有意に高く、一方 T N V 1 4 8 で処置した動物は、1 0 m g / k g の c A 2 で処置した動物と有意に異ならなかった。

30

【 0 3 3 5 】

実施例 7：単回腹腔内ボーラス投与として抗 T N F 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 T g 1 9 7 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、3 m g / k g 又は 5 m g / k g のいずれかの抗体（c A 2 又は T N V 1 4 8）の単回腹腔内ボーラス投与で処置した。この研究は、D - P B S 及び 1 0 m g / k g の c A 2 対照群を利用した。

【 0 3 3 6 】

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 若しくは 5 m g / k g の T N V 1 4 8 又は 5 m g / k g の c A 2 のいずれかで処置した動物は、研究の早期（第 2 及び第 3 週目）に体重量が有意に増加した。T N V 1 4

50

8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、第7週目で有意を示し、3mg/kgのTNV148で処置した動物は注射後の第8週目になおも有意に上昇した。(図14を参照されたい)。

【0337】

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作用を示し、5mg/kgのcA2及び5mg/kgのTNV148は、第1～第3週目にAIにおいて有意な減少を示し、全ての処置群が第2週目で有意な減少を示した。研究の後期に、5mg/kgのcA2で処置した動物は多少の保護作用を示し、第4、第6及び第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、第6週目で有意な減少を示し、全ての処置群が第7週目で有意な減少を示した。研究の終わりで(第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。

【0338】

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=SのPBS(D-PBS)又は1mg/kgの抗体(TNV148、rTNV148B)の単回腹腔内ボラス投与で処置した。

【0339】

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、第1週目及び第3～第8週目で有意であった。1mg/kgのTNV148で処置した動物も、研究の第5、第6、及び第8週目に有意な体重増加を達成した。(図16を参照されたい)。

【0340】

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、第4週目から始まり、残りの研究の間中(第8週目)継続して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、第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(第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、第7及び第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。

【0341】

実施例9：GO-VIVA：メトトレキサート療法にもかかわらず、活動性の多関節型若年性特発性関節炎を有する小児被験者における静脈内ゴリムマブ(ヒト抗TNF α 抗体)の多施設共同非盲検試験

プロトコル番号：CNT0148JIA3003

概要

ゴリムマブは、高い親和性及び特異性でヒト腫瘍壊死因子 α (TNF α)に結合し、TNF α の生物活性を中和する完全ヒトモノクローナル抗体(mAb)である。TNF α は主要な炎症メディエーターであり、リウマチ性関節炎(RA)及び若年性特発性関節炎(JIA)などの疾患の病態生理学に高レベルのTNF α の関与が示されている。静脈内(IV)投与用のSIMPONI(登録商標)(ゴリムマブ)が、多関節型JIA(pJIA

10

20

30

40

50

A) を有する患者における代替的な投与経路 (他の入手可能な抗TNF α 剤と比較して) 及び便宜のよい投与レジメン (すなわち、8週毎の投与 [q 8 w]) を与えるものとして治験依頼者により開発されている。

【0342】

目的及び仮説

主目的

この研究の主目的は、2ヶ月以上にわたるメトトレキサート (MTX) 療法にもかかわらず、5つ以上の関節が活動性の関節炎を有することによって発現されるpJIAを有する被験者 (年齢2歳~18歳未満) へのゴリムマブの静脈内投与後の薬物動態 (PK) を評価することである。

10

【0343】

副次的目的

この研究の副次的目的は、PK、有効性 (徴候及び症状の緩和、物理的機能、及び生活の質)、安全性 (有害事象 [AE]、重篤なAE [SAE]、及び検査パラメータの評価)、並びに免疫原性 (ゴリムマブに対する抗体) に関して、pJIAを有する被験者におけるゴリムマブの静脈内投与 (IV) を評価することである。

【0344】

仮説

この研究では、公式な仮説の検証は計画されていない。

【0345】

研究設計の概要

これは、MTXによる現在の治療にもかかわらず、活動性のpJIAを有する被験者におけるIVゴリムマブのPK、安全性、及び有効性を評価するための第3相非盲検単群多施設共同研究である。研究対象母集団は、MTXを投与中の、年齢2歳~18歳未満、少なくとも3ヶ月のpJIA歴を有し、5つ以上の関節に活動性関節炎を有するpJIAを有する被験者を含む。約120人の被験者を第0週目に組み入れて第52週目に約100人の被験者が研究に残るようにする。組み入れパターンは、約10%が2歳~6歳以下、約20%が6歳~12歳以下、及び約70%が12歳~18歳未満の被験者集団を与えることが期待される。

20

【0346】

全ての被験者は、第0週目、第4週目、第28週目まではq 8 w (± 3 日)、その後はq 8 w (± 1 週間) で、 $80\text{ mg}/\text{m}^2$ のゴリムマブをIV注入 (30 ± 10 分間かけて) として投与される (最大1回用量 240 mg [最大体表面積 (BSA) $3.0\text{ m}^2 \times 80\text{ mg}/\text{m}^2$])。市販のMTXは、第28週目まで、 $\text{BSA} < 1.67\text{ m}^2$ の被験者では $10 \sim 30\text{ mg}/\text{m}^2$ /週の安定用量で、又は $\text{BSA} \geq 1.67\text{ m}^2$ の被験者では $15\text{ mg}/\text{週}$ の安定最小用量で投与する (文書化された安全上の理由からより低い用量のMTXが投与されない限り、又は文書化された国又は施設の規制が、 $\text{BSA} \geq 1.67\text{ m}^2$ の被験者において $15\text{ mg}/\text{週}$ 以上の用量を禁止していない限り)。第52週目で研究を完了する被験者には、研究の長期延長 (LTE) 相に入る選択肢を与える。LTEの間、全ての被験者は引き続き、第244週目まで $80\text{ mg}/\text{m}^2$ のIVゴリムマブをq 8 w (± 1 週間、最大単回用量 240 mg) で投与される。第244週目の来院を完了した全ての被験者は、第252週目の安全性フォローアップ来院に参加することが期待される。第252週目以降のゴリムマブ (pJIA兆候に適応される薬剤商品化が行われる前に完全な252週間の研究を完了した被験者について) は、被験者の国においてpJIAに対する薬剤の使用が承認及び販売されるまで、又は小児にとって有益であることが証明されている限りにおいて (被験者が市販薬を入手できない場合) 提供される。

30

40

【0347】

この研究は、全ての被験者が同じBSAベース用量のIVゴリムマブを投与される非盲検試験であるため、外部のデータ監視委員会は設置されない。

【0348】

50

研究の終了は、L T E の最後の被験者の最後のフォローアップ評価として定義される。

【0349】

被験者集団

研究の被験者は、組み入れ時に体重が15 kgを超えており年齢は2～18歳未満でなければならない。

【0350】

疾患の発症が被験者の16回目の誕生日の前である必要があり、少なくとも3ヶ月の期間にわたるものでなければならず、以下のサブタイプのうちの1つの活動性p J I Aでなければならない。すなわち、リウマチ因子陽性又は陰性のp J I A；3ヶ月以上にわたる全身症状がないが、3ヶ月以上にわたる多関節炎を伴う全身性J I A；長期化したオリゴ関節性J I A；付着部炎関連関節炎又は多関節型若年性乾癬性関節炎（P s A）。

10

【0351】

被験者は、スクリーニング及び組み入れ時に米国リウマチ学会（American College of Rheumatology、A C R）基準によって定義される活動性関節炎を有する5つ以上の関節を有している必要がある。被験者は、週用量10 mg / m²以上の（スクリーニングの前2ヶ月以上にわたる）経口、筋肉内、又は皮下M T Xを現在使用中にもかかわらず、活動性p J I Aを有していなければならない。

【0352】

投与量及び投与

ゴリムマブ

20

本研究は1つの能動的治療群を有し、全ての被験者は80 mg / m²のゴリムマブI V注入を、第0週目、第4週目、並びに第28週目まではq 8 w（±3日）、及びその後、第244週目まではq 8 w（±1週）で投与される。B S Aを各来院時に計算し、ゴリムマブの用量を必要に応じて調整して用量を80 mg / m²に維持する。B S Aは、M o s t e l l e r の式： $B S A (m^2) = ([身長 (cm) \times 体重 (kg)] / 3600)^{1/2}$ を用いて計算される。最大単回用量は、ゴリムマブ240 mgである。

【0353】

メトトレキサート

被験者は、市販のM T Xを、研究組み入れの時点と同じB S Aベースの用量（B S A < 1.67 m²の被験者には1週当たり10～30 mg / m²、又はB S A ≥ 1.67 m²の被験者には少なくとも15 mg / 週）で少なくとも第28週目まで投与される。M T Xによる不耐性又はA Eが発生しない限り、第28週目の来院まで被験者が同じM T Xの用量及び投与経路を維持するようにあらゆる努力を払わなければならない。

30

【0354】

被験者はまた、週1回、5 mg以上の市販の葉酸又は週1回のM T X投与の翌日にフォリン酸（M T Xの用量の半分）も投与される。12歳未満の小児では、葉酸又はフォリン酸の投与は、医師の判断による。

【0355】

有効性評価及びエンドポイント

有効性評価は、以下を含む。

40

- 関節の評価（活動性関節の数及び可動域が制限された関節の数）
- 医師の疾患活動性の全般的評価
- 小児健康調査評価質問票（C H A Q；全体的な健康状態の親／被験者による評価、及び疼痛の親／被験者による評価を含む）。

● C R P

【0356】

一次有効性エンドポイント又は主要二次エンドポイントは計画されていない。他の有効性エンドポイントとしては以下が挙げられる。

- J I A A C R 30、50、70、及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- C H A Qのベースラインからの経時的変化

50

- 経時的なCRP濃度
- 非活動性疾患を有する被験者の経時的割合
- PJIAに対する薬剤を投与中の臨床的寛解にある被験者の経時的割合
- 各来院時に設定されたPJIAコアのベースラインからの改善
- 第52週目までの疾患サブタイプ及び／又は年齢によるJIA ACR30、JIA ACR50、JIA ACR70及びJIA ACR90レスポnderである被験者の経時的割合

● 若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）10、27、及び71のベースラインからの経時変化

- JADAS10、27、及び71の最小疾患活動性を達成する被験者の経時的割合【0357】

薬物動態評価及びエンドポイント

血清ゴリムマブ濃度を、第0、第4、第8、第12、第20、第28、第52、第100、第148、第196及び第244週目に評価し、経時的に要約する。第28週目までのデータを用いて母集団のPK分析を行ってゴリムマブのPKを特徴付けるとともに、pJIAを有する小児集団におけるPKの重要な共変数を特定する。

【0358】

第52週目まで及びLTEを通じてゴリムマブ濃度を要約し、PK曝露を評価する。

【0359】

本研究における一次エンドポイントは、第28週目のPK曝露（第28週目におけるトラフ濃度）及び8週間の1回投与間隔にわたる定常状態のベイズ法による曲線下面積[AUCss]（母集団のPKモデリング及びシミュレーションから）である。

【0360】

主要二次エンドポイントは以下の通りである。

- 第52週目のPK曝露（第52週目におけるトラフ濃度）及び第52週目のベイズ法によるAUCss（母集団のPKモデリング及びシミュレーションから）。

【0361】

安全性の評価

安全評価には以下の評価が含まれる。AE；注入反応；アレルギー反応；臨床検査（血液学、化学、及び妊娠検査）；バイタルサイン；身体検査；身長及び体重；ブドウ膜炎；及び結核の早期検出。

【0362】

免疫原性評価

ゴリムマブに対する抗体を、第0、第4、第8、第12、第28、第52、第100、第148、第196週目及び第244週目に全ての被験者から採取した血清試料で評価する。

【0363】

統計的方法

被験者情報

人口統計学及びベースライン疾患特性及び以前の服薬データを、試験薬剤が投与されているか否かに関わらず、研究に組み入れられた全ての被験者について要約する。試験薬剤の少なくとも1回の投与を受けた全ての被験者について薬物動態データを要約する。有効性分析を、研究に組み入れられた全ての被験者について要約する。安全性評価を治療を行った全ての被験者について要約する。

【0364】

試料サイズ

試料サイズの決定は、統計的考慮事項に基づくものではない。目標は、母集団PKモデルを構築するのに十分であり、かつ実行可能であれば、曝露応答モデルを構築するのに十分な試料サイズを得ることである。更に、妥当な安全性評価を与える試料サイズもまた考慮した。これらの考慮事項により、20人の被験者が脱落するか又はPK試料を提供しな

10

20

30

40

50

い場合に約100人の被験者の試料サイズが第52週目で研究に留まっていると仮定して、約120人の被験者の試料サイズを選択した。この試料サイズは、PK時点の疎なサンプリング、並びに約100人の被験者からの1年の安全性データを提供することを考慮して、母集団PKモデルを構築するのに十分であると考えられる。

【0365】

有効性分析

一次有効性エンドポイント分析も主要二次有効性エンドポイント分析も計画されていない。

【0366】

研究に組み入れられた全ての被験者について以下を要約する。

- JIA ACR30、50、70、及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- CHAQのベースラインからの経時的変化
- 経時的なCRP濃度
- 非活動性疾患を有する被験者の経時的割合
- PJIA（ACR基準）に対する薬剤を投与中の臨床的寛解にある被験者の経時的割合

- 設定されたPJIAコアのベースラインからの経時的改善

- 第52週目までの疾患サブタイプ及び／又は年齢によるJIA ACR30、50、70及び90レスポnderである被験者の経時的割合

- JADAS10、27、及び71のベースラインからの経時的変化

- JADAS10、27、及び71最小疾患活動性を経時的に達成する被験者の割合

【0367】

薬物動態の分析

本研究の主要目的は、JIA集団におけるゴリムマブPK曝露（第28週目のトラフ濃度及び母集団のPKモデリング及びシミュレーションからの8週間の投与間隔にわたるベイズ法によるAUCss）を特徴付けることである。

【0368】

血清ゴリムマブ濃度を経時的に要約する。更に、第28週目までのデータに対する母集団のPK分析を行ってゴリムマブのPKを特徴付けるとともに、JIAを有する小児集団におけるPKの重要な共変数を特定及び定量化する。クリアランス及び分布容積は、非線形混合効果モデリング（NONMEM）アプローチを用いて推定される。

【0369】

安全性分析

安全性は、第252週目までのAE、臨床検査、及びバイタルサインの所見の要約を評価することによって評価される。

【0370】

免疫原性の分析

ゴリムマブが投与され、ゴリムマブに対する抗体を検出するために適当な試料を採取した全ての被験者（すなわち、最初のゴリムマブ投与後に少なくとも1つの試料を採取した被験者）について、研究中のゴリムマブに対する抗体の生成及び力価を経時的に要約する。

【0371】

薬物動態／薬力学分析

血清ゴリムマブ濃度と有効性との関係を調べる。適当なPK／薬物動態（PD）モデルを調査し、曝露応答関係を記述するために開発する。

【0372】

時間及びイベントのスケジュール

【0373】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表6: 第52週目までのスクリーニング													
	スクリーニング 期間 (-6週間)	第0 週目*	第4 週目*	第8 週目*	第12 週目*	第16 週目*	第20 週目*	第24 週目*	第28 週目*	第36 週目*	第44 週目*	第52 週目*	最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^b
手順及び評価													
管理													
インフォームド コンセント/ 同意	X												
医療履歴/ 人口統計データ	X												
併用薬コレクション	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
組み入れ/ 除外基準	X	X											
試験薬剤													
試験薬剤のIV投与		X	X		X		X		X	X	X	X	
安全性													
システムレビュー	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
物理的検査 ^c	X			X			X			X			
体重測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
身長測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
バイタルサイン	X	X ^d	X ^d	X	X ^d	X	X ^d	X	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X
日常検査分析	X	X	X		X		X		X	X	X	X	X
B型肝炎 ウイルス スクリーニング	X												
C型肝炎 ウイルス スクリーニング	X												

10

【 0 3 7 4】

【表 7 - 2】

(上記表の続き)

表6: 第52週目までのスクリーニング													
	スクリーニング 期間 (-6週間)	第0 週目*	第4 週目*	第8 週目*	第12 週目*	第16 週目*	第20 週目*	第24 週目*	第28 週目*	第36 週目*	第44 週目*	第52 週目*	最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^b
QuantiFERON (登録商標) - TBゴールド検査 ^a	X											X ^f	
TB評価(質問票)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
胸部X線 ^e	X												
ブドウ膜炎評価 ^h	X						X				X		X
リウマチ因子	X												
ANA/ 抗dsDNA抗体	X							X				X	X
妊娠検査(血清) ⁱ	X												
妊娠検査(尿) ^j		X	X		X		X		X	X	X	X	
注入反応評価 ^j		X	X		X		X		X	X	X	X	
有害事象	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
有効性													
関節評価	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
JIAの評価 ^{k, l}		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
薬物動態													
ゴリムマブ濃度 ^{m, n}		2X	2X	X	2X		X		X			X	X
集団PK ^o		← X ^o →											
免疫原性													
ゴリムマブに対する 抗体 ⁿ		X	X	X	X				X			X	X

20

30

【 0 3 7 5】

40

50

【表 7－3】

(上記表の続き)

表6: 第52週目までのスクリーニング

	スクリーニング 期間 (－6週間)	第0 週目*	第4 週目*	第8 週目*	第12 週目*	第16 週目*	第20 週目*	第24 週目*	第28 週目*	第36 週目*	第44 週目*	第52 週目*	最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^a
a. 全ての計画された来院は、第28週目までは予定された来院の前後3日以内、及び第28週目後～第52週目までは前後1週間以内に行われなければならない。 b. 第52週目の前に試験薬剤投与を中止した^aが同意を撤回していない全ての被験者は、最後の注入の約8週間後に、最終的な安全性来院のために研究施設に 戻らなければならない(セクション10. 2)。 c. 全ての物理的検査での皮膚検査、及びおよそ6ヶ月毎のタナー分類を含む。 d. バイタルサインは、注入前、15分及び30分(注入中、15分間隔)、並びに60分及び90分(注入後の1時間の観察期間中)に測定されなければならない。 e. QuantiFERON(登録商標)－TBゴールド検査がその国で承認／登録されていないか、又はツベルクリン皮膚検査が現地の健康機関によって義務付けられている国では ツベルクリン皮膚検査も実施されるべきである。 f. 潜在性TBの履歴を有する、及び潜在性TBの治療を継続中であるか、又は十分な治療を完了したとの文書がある被験者では、検査は必要ではない。 g. TBのリスクを有するJIAの小児における免疫抑制剤の開始についての現地及び国の規制に従った胸部X線スクリーニング。 h. 評価(物理的検査及び面談に基づく)は、全ての被験者において少なくとも6ヶ月毎に治験責任医師によって実施されなければならない。加えて、全ての被験者は、指定の 間隔(JIAのサブタイプ、ANAの検査結果、JIA発症時の年齢、及びJIAの期間に基づく)で研究中に眼科医／検眼医によって実施される細隙灯評価を行う必要がある。 i. 妊娠の可能性を有する(すなわち、初経後)の全ての女性被験者は、スクリーニング中、及び試験薬の投与前の全ての来院において妊娠について陰性でなければならない。 j. 被験者は、注入反応の症状について試験薬剤の投与後、少なくとも60分間観察される。 k. JIAの評価は、以下を含む。小児健康調査質問票(Physician Global Assessment of Disease Activity, Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ)、及び 朝のこばわりの持続時間。CHAQは、被験者の認識への影響を防止するため、その来院における任意の検査、手順、又は他の相談の前に記入されなければならない。 l. CHAQは、親又は介護者によって記入され、好ましくは、全ての来院で同じ親又は介護者が記入すべきである。研究組み入れ時に15歳以上18歳未満の被験者は、 親／介護者と一緒に評価を完了してもよい。 m. 第0、第4及び第12週目の来院時に血清ゴリムマブ濃度の2つの試料(上記のスケジュール中、「2×」で示される)を採取する。注入の直前に1つの試料を採取し、 注入の終了の約1時間後(例えば、±10分)にもう一方を採取する。残りの来院のそれぞれでは、血清ゴリムマブの試料を1つのみ採取するが、これはその来院で試験薬剤の 注入が投与される場合には注入の直前に採取されなければならない。注入後試料は、IV注入ラインとは異なる腕から抜き取るか、あるいは薬剤投与に使用されるものと同じ アクセスラインを使用する場合には、IV注入ラインをフラッシュして残留している可能性のある残留薬剤を除去し、試料を得る前に1mLの血液を引き込んでから捨てる 必要がある。 n. 同じ血清試料を、ゴリムマブの濃度の測定及びゴリムマブに対する抗体の検出に使用することができる。試験薬剤投与が行われる来院において、ゴリムマブ濃度及び ゴリムマブに対する抗体を評価するための全ての血液試料は、試験薬剤の投与前に採取しなければならない。 o. 母集団PKの血清ゴリムマブ濃度の1つの追加の試料を、第0週目、第4週目、及び第8週目の来院時以外の第0週目～第8週目の任意の時点で全ての被験者から 採取する。この試料は、試験薬剤投与の少なくとも24時間前又は後に採取されなければならない。定期計画された来院(例えば、第8週目)で採取してはならない。 略語: ANA＝抗核抗体; CHAQ＝小児健康調査質問票 (Childhood Health Assessment Questionnaire); CRP＝C反応性タンパク質; dsDNA＝二本鎖デオキシリボ核酸; IV＝静脈内; PK＝薬物動態; TB＝結核。													

10

【0 3 7 6】

【表 8－1】

表7: 第60週目～第156週目(長期延長)

	第60 週目*	第68 週目*	第76 週目*	第84 週目*	第92 週目*	第100 週目*	第108 週目*	第116 週目*	第124 週目*	第132 週目*	第140 週目*	第148 週目*	第156 週目*	最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^a
手順及び評価														
管理														
併用薬コレクション	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
試験薬剤														
試験薬剤のIV投与	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
安全性														
システムレビュー	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
物理的検査 ^a	X			X			X			X			X	
体重測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
身長測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
バイタルサイン	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X
日常検査分析			X			X			X			X		X
ANA／抗dsDNA抗体			X			X			X			X		X
QuantiFERON (登録商標)－ TBゴールド検査 ^a						X ^f						X ^f		
TB評価(質問票)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
胸部X線 ^a	X													
ブドウ膜炎評価 ^b		X			X			X			X			X
妊娠検査(尿) ⁱ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
注入反応評価 ^j	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
有害事象	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
有効性														
関節評価		X		X		X		X		X		X		X
JIAの評価 ^{k, l}		X		X		X		X		X		X		X
CRP		X		X		X		X		X		X		X

30

【0 3 7 7】

40

50

【表 8－2】

(上記表の続き)

表7: 第60週目～第156週目(長期延長)															最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^b
	第60 週目 ^a	第68 週目 ^a	第76 週目 ^a	第84 週目 ^a	第92 週目 ^a	第100 週目 ^a	第108 週目 ^a	第116 週目 ^a	第124 週目 ^a	第132 週目 ^a	第140 週目 ^a	第148 週目 ^a	第156 週目 ^a		
薬物動態															
ゴリムマブ濃度 ^m						X						X		X	
免疫原性															
ゴリムマブに対する抗体 ^m						X						X		X	
a. 全ての計画された来院は、予定された来院の前1週間に行われなければならない。															
b. 第156週目の前に試験薬剤投与を中止したが同意を撤回していない全ての被験者は、最後の注入の約8週間後に、最終的な安全性来院のために研究施設に戻らなければならない(セクション10.2)。															
c. 全ての物理的検査での皮膚検査、及びおよそ6ヶ月毎のタナー分類を含む。															
d. バイタルサインは、注入前、15分及び30分(注入中、15分間隔)、並びに60分及び90分(注入後の1時間の観察期間中)に測定されなければならない。															
e. QuantiFERON(登録商標)－TBゴールド検査が承認／登録されていないか、又はツベルクリン皮膚検査が現地の健康機関によって義務付けられている国ではツベルクリン皮膚検査も実施されるべきである。															
f. 潜在性TBの履歴を有する、及び潜在性TBの治療を継続中であるか、又は十分な治療を完了したとの文書がある被験者では、検査は必要ではない。															
g. TBのリスクを有するJIAの小児における免疫抑制剤の開始についての現地及び国の規制に従った胸部X線スクリーニング。															
h. 評価(物理的検査及び面談に基づく)は、全ての被験者において少なくとも6ヶ月毎に治験責任医師によって実施されなければならない。加えて、全ての被験者は、指定の間隔(JIAのサブタイプ、ANAの検査結果、JIA発症時の年齢、及びJIAの期間に基づく)で研究中に眼科医／検眼医によって実施される細隙灯評価を行うことが求められる。															
i. 妊娠の可能性を有する(すなわち、初経後)の全ての女性被験者は、試験薬の投与前の全ての来院において妊娠について陰性でなければならない。															
j. 被験者は、注入反応の症状について試験薬剤の投与後、少なくとも60分間観察される。															
k. JIAの評価は、以下を含む。小児健康調査質問票(Physician Global Assessment of Disease Activity, Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ))、及び朝のこわばりの持続時間。CHAQは、被験者の認識への影響を防止するため、その来院における任意の検査、手順、又は他の相談の前に記入されなければならない。															
l. CHAQは、親又は介護者によって記入され、好ましくは、全ての来院で同じ親又は介護者が記入すべきである。研究組み入れ時に15歳以上18歳未満の被験者は、親／介護者と一緒に評価を完了してもよい。															
m. 同じ血清試料を、ゴリムマブの濃度の測定及びゴリムマブに対する抗体の検出に使用することができる。試験薬剤投与が行われる来院において、ゴリムマブ濃度及びゴリムマブに対する抗体を評価するための全ての血液試料は、試験薬剤の投与前に採取しなければならない。															
略語: ANA＝抗核抗体; CHAQ＝小児健康調査質問票(Childhood Health Assessment Questionnaire); CRP＝C反応性タンパク質; dsDNA＝二本鎖デオキシリボ核酸; IV＝静脈内; TB＝結核。															

10

【0378】

【表 9－1】

表8: 第164週目～第252週目(長期延長の続き)														
	第164 週目 ^a	第172 週目 ^a	第180 週目 ^a	第188 週目 ^a	第196 週目 ^a	第204 週目 ^a	第212 週目 ^a	第220 週目 ^a	第228 週目 ^a	第236 週目 ^a	第244 週目 ^a	第252 週目 ^a	最終的な 安全性 フォロー アップ来院 ^b	
手順及び評価														
管理														
併用薬コレクション	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
試験薬剤														
試験薬剤のIV投与	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
安全性														
システムレビュー	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
物理的検査 ^a			X			X			X			X		
体重測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
身長測定値	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
バイタルサイン	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X		X
日常検査分析		X			X			X			X			X
ANA／抗dsDNA抗体		X			X			X			X			
QuantiFERON(登録商標)－ TBゴールド検査 ^a					X ^f						X ^f			
TB評価(質問票)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
胸部X線 ^a	X													
ブドウ膜炎評価 ^b	X			X			X			X		X		X
妊娠検査(尿) ¹	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
注入反応評価 ⁱ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
有害事象	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
有効性														
関節評価	X		X		X		X		X		X			X
JIAの評価 ^{k, 1}	X		X		X		X		X		X			X
CRP	X		X		X		X		X		X			X
薬物動態														
ゴリムマブ濃度 ^m					X						X			X

20

30

40

【0379】

50

【表 9 - 2】

(上記表の続き)

表 8: 第 164 週目～第 252 週目 (長期延長の続き)													
	第 164 週目*	第 172 週目*	第 180 週目*	第 188 週目*	第 196 週目*	第 204 週目*	第 212 週目*	第 220 週目*	第 228 週目*	第 236 週目*	第 244 週目*	第 252 週目*	最終的な安全性フォローアップ来院 ^b
免疫原性													
ゴリムマブに対する抗体 ^m					X						X		X
a. 全ての計画された来院は、予定された来院の前後 1 週間に行われなければならない。 b. 第 244 週目の前に試験薬剤投与を中止したが同意を撤回していない全ての被験者は、最後の注入の約 8 週間後に、最終的な安全性来院のために研究施設に戻らなければならない(セッション 10. 2)。 c. 皮膚検査及びタナー分類を含む。 d. バイタルサインは、注入前、15 分及び 30 分(注入中、15 分間隔)、並びに 60 分及び 90 分(注入後の 1 時間の観察期間中)に測定されなければならない。 e. QuantIFERON(登録商標)-TBゴールド検査が承認/登録されていないか、又はツベルクリン皮膚検査が現地の健康機関によって義務付けられている国ではツベルクリン皮膚検査も実施されるべきである。 f. 潜在性 TB の履歴を有する、及び潜在性 TB の治療を継続中であるか、又は十分な治療を完了したとの文書がある被験者では、検査は必要ではない。 g. TB のリスクを有する JIA の小児における免疫抑制剤の開始についての現地及び国の規制に従った胸部 X 線スクリーニング。 h. 評価(物理的検査及び面談に基づく)は、全ての被験者において少なくとも 6 ヶ月毎に治療責任医師によって実施されなければならない。加えて、全ての被験者は、指定の間隔(JIA のサブタイプ、ANA の検査結果、JIA 発症時の年齢、及び JIA の期間に基づく)で研究中に眼科医/検眼医によって実施される細隙灯評価を行うことが求められる。 i. 妊娠の可能性を有する(すなわち、初経後)の全ての女性被験者は、試験薬の投与前の全ての来院において妊娠について陰性でなければならない。 j. 被験者は、注入反応の症状について試験薬剤の投与後、少なくとも 60 分間観察される。 k. JIA の評価は、以下を含む。小児健康調査質問票(Physician Global Assessment of Disease Activity, Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ)、及び朝のこわばりの持続時間。CHAQ は、被験者の認識への影響を防止するため、その来院における任意の検査、手順、又は他の相談の前に記入されなければならない。 l. CHAQ は、親又は介護者によって記入され、好ましくは、全ての来院で同じ親又は介護者が記入すべきである。研究組み入れ時に 15 歳以上 18 歳未満の被験者は、親/介護者と一緒に評価を完了してもよい。 m. 同じ血清試料を、ゴリムマブの濃度の測定及びゴリムマブに対する抗体の検出に使用することができる。試験薬剤投与が行われる来院において、ゴリムマブ濃度及びゴリムマブに対する抗体を評価するための全ての血液試料は、試験薬剤の投与前に採取しなければならない。 略語: ANA=抗核抗体; CHAQ=小児健康調査質問票(Childhood Health Assessment Questionnaire); CRP=C 反応性タンパク質; dsDNA=二本鎖デオキシリボ核酸; IV=静脈内; TB=結核。													

10

【0 3 8 0】

略語:

A C R 米国リウマチ学会

A E 有害事象

A L T アラニンアミノトランスフェラーゼ

A N A 抗核抗体

A R C 予測される事象の評価委員会

A S 強直性脊椎炎

A S T アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

B C G カルメット・ゲラン桿菌

 β -h C G β -ヒト線毛性性腺刺激ホルモン

B S A 体表面積

C H A Q 小児健康調査質問票

C L / B S A 体表面積正規化薬物クリアランス

C L / F 見かけ上の全身クリアランス

C R F 症例報告書

C R P C 反応性タンパク質

D A S 疾患活動性指数スコア

D M A R D 疾患修飾性抗リウマチ薬

D N A デオキシリボ核酸

D R C データ検証委員会

d s D N A 二本鎖デオキシリボ核酸

e D C 電子データ収集

F D A 米国食品医薬品局

G C P 医薬品の臨床試験の実施基準

H A Q 健康評価質問票

H A Q - D I 健康評価質問表障害指数

H B s A g H B V 表面抗原

H B V B 型肝炎ウイルス

H I V ヒト免疫不全ウイルス

H L A - B 2 7 ヒト白血球抗原 B 2 7

H L A - D R 4 ヒト白血球抗原 D R 4

H L A - D R 5 ヒト白血球抗原 D R 5

20

30

40

50

H L A - D R 8	ヒト白血球抗原 D R 8	
I C H	医薬品規制調和国際会議	
I E C	独立倫理委員会	
I L - 1 β	インターロイキン - 1 β	
I L - 6	インターロイキン - 6	
I R B	治験審査委員会	
J A D A S	若年性関節炎疾患活動性スコア	
J I A	若年性特発性関節炎	
L F T	肝臓機能検査	
L T E	長期延長	10
m A b	モノクローナル抗体	
M e d D R A	医薬規制用語集	
M T X	メトトレキサート	
N S A I D	非ステロイド性抗炎症薬	
P D	薬力学	
P E D	小児科	
p J I A	多関節型若年性特発性関節炎	
P K	薬物動態	
P Q C	製品品質への苦情	
P P D	精製タンパク質誘導体	20
P R C S G	小児リウマチ共同研究グループ	
P R I N T O	小児リウマチ国際研究機関	
P R O	患者報告アウトカム	
P s A	乾癬性関節炎	
q 4 w	4 週間毎	
q 8 w	8 週間毎	
R A	関節リウマチ	
R B C	赤血球	
R F	リウマチ因子	
S A E	重篤な有害事象	30
S C	皮下	
S F - 3 6	3 6 項目略式健康調査	
S I	国際単位系	
S O C	系／器官分類	
T B	結核	
T N F α	腫瘍壊死因子 α	
U R T I	上気道感染症	
U S	米国	
V A S	視覚的アナログスケール	
v d H - S	ファン・デル・ハイデ改変シャープ法	40
V / F	見かけの分布容積	
V s s	定常状態における分布容積	
W B C	白血球	
【 0 3 8 1 】		
1. 序論		
S I M P O N I (登録商標) (ゴリムマブ) は、免疫グロブリン G 1 の重鎖アイソタイプ (G 1 m [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 (m A b) である。ゴリムマブの分子量は、1 4 9 , 8 0 2 ~ 1 5 1 , 0 6 4 ダルトンの範囲である。ゴリムマブは、配列番号 3 6 を含む重鎖 (H C) 及び配列番号 3 7 を含む軽鎖 (L C) を有する。ゴリムマブの分子量は、1 4 9 , 8 0 2 ~ 1 5 1 , 0 6 4 ダル		

トンの範囲である。

【0382】

ゴリムマブは、高い親和性及び特異性を有し、ヒト腫瘍壊死因子 α (TNF α)の可溶性の形態及び膜貫通型の生物活性形態の両方を有する高親和性の安定な複合体を形成し、この複合体は、TNF α の受容体への結合を防止し、TNF α の生理活性を中和する。他のTNF α 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。具体的には、ゴリムマブは、ヒトリンパ球に結合しない、又は中和しない。TNF α 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、主として活性化された単球、マクロファージ及びT細胞により合成される。TNF α のp55又はp75 TNF受容体のいずれかへの結合により、受容体細胞質ドメインがクラスター化し、シグナル伝達を開始される。腫瘍壊死因子は、様々な刺激に応答して生成され、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)- κ B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 α はまた、胚中心での免疫細胞の組織化における役割を介して免疫応答を調節する。TNF α の発現の上昇は、リウマチ性関節炎(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いる。TNF α は、これらの疾患に特徴的な関節性炎症及び構造的損傷の重要なメディエーターである。

10

【0383】

抗TNF α 剤の臨床研究で実証されているように、TNF α 活性を遮断することで、過剰なTNF α によって引き起こされる有害な作用を防止することができる。静脈内(IV)投与用のSIMPONI(登録商標)(ゴリムマブ)が、多関節型JIA(pJIA)を有する患者における代替的な投与経路(他の入手可能な抗TNF α 剤と比較して)及び便宜のよい投与レジメン(すなわち、8週毎の投与[q8w])を与えるものとして開発されている。

20

【0384】

1.1. 背景

1.1.1. 若年性特発性関節炎

若年性特発性関節炎は、16歳未満で発症し、6週間を超えて持続する原因不明の関節炎の全ての形態を包含する除外診断である¹⁸。これは小児における最も一般的な慢性リウマチ疾患であり、国際リウマチ学会(ILAR)分類に従って、別個の臨床所見及び特性により特徴付けられる7つのサブタイプ(全身性関節炎、オリゴ関節炎、リウマチ因子[RF]陰性多発性関節炎、RF陽性多発性関節炎、付着部炎関連関節炎、乾癬性関節炎、未分化型関節炎)に分類される¹⁶。

30

【0385】

JIAの不均質性は、複数の因子が疾患の病因及び発病機序に寄与していることを示しており、遺伝因子及び環境因子の両方の関与が示されている。これらには、誘発機構としての感染症の関与、ヒト白血球抗原(HLA)及び非HLA分子と疾患発症との間のリンク、並びに組織炎症及び関節破壊につながる免疫異常が挙げられる。疾患発症における感染の役割は依然、証明されていない¹⁸。しかしながらJIAでは、HLA-DR5及びHLA-DR8遺伝子座抗原が、オリゴ関節性関節炎を有する若年女子における関連寄与因子としての関与が示されているのに対して、HLA-DR4は、より年長の小児におけるRF陽性多関節型関節炎への関与が示されており、HLA-B27は、オリゴ関節性疾患を有するより年長の男子における関与が示されている^{15, 17}。

40

【0386】

JIAの病因及び発病機序は依然として明らかではないが、成人RAの進行に役割を担っているものと同じ細胞型及び基礎となる機構が恐らくは関与していると考えられる¹⁵。関与する細胞実体としては、多くの炎症性サイトカイン及び炎症のメディエーターを生成するマクロファージが含まれる。TNF α などのマクロファージ由来サイトカインは、RAを有する患者の関節における慢性炎症プロセスの誘導及び持続において、また、この

50

疾患の全身性の発現⁶において極めて重要な役割を果たしているようであるが、全身性 J I A における T N F α の役割についてはそれほど確証はない³。

【0387】

いくつかの研究は、R A を有する成人において上昇した炎症性サイトカイン（例えば、インターロイキン-1 β [I L - 1 β、インターロイキン-6 [I L - 6]、及び T N F α）のレベルは、J I A を有する患者の滑液及び血清中においても上昇していることが示されている^{9、19、12、3、20}。これらの研究により、様々な J I A のサブグループを有する患者間で異なるサイトカインプロファイルも見出されている。

【0388】

若年性特発性関節炎は、小児における短期及び長期の障害の重要な原因である¹⁴が、療法における新たな進歩によって臨床的に重要な前進が示されてきた。過去10年では、患者の40%～60%が、フォローアップにおける J I A の薬剤の投与期間中に非活動性の疾患又は臨床的寛解を有することが研究により示されている。機能的転帰は過去10年間で改善され、重度の機能的障害を有する患者は2.5%～10%となっている¹⁸。しかしながら、特に重篤な J I A の合併症として、直線的増殖抑制、骨粗鬆症、局所成長障害、マクロファージ活性化症候群、及び虹彩毛様体炎がある¹⁸。

【0389】

J I A における治療の目的は、疾患を完全に制御すること、小児の物理的及び心理的完全性を維持すること、並びに、疾患又はその療法に関連する任意の長期的な結果を予防することである。J I A の治療薬の主なものとしては、N S A I D、関節内及び全身性コルチコステロイド、メトトレキサート (M T X)、及び他の D M A R D があった。生物学的薬剤の導入により、従来の抗リウマチ剤に耐性を有する J I A 患者の治療の重要な新たな治療選択肢が提供された¹⁸。現在、p J I A の治療用に承認されている生物学的療法としては、エタネルセプト、アダリムマブ、アバタセプト、及びトシリズマブがあり、カナキマブ及びトシリズマブが全身性 J I A に対して承認されている。

【0390】

1. 1. 2. リウマチ性関節炎及び若年性特発性関節炎におけるゴリムマブ臨床研究 S C 注射として投与されるゴリムマブは、R A、P s A、強直性脊椎炎 (A S)、及び潰瘍性大腸炎を有する成人において有効であることが実証されている。静脈内ゴリムマブもまた、R A を有する成人において有効であることが証明されている。他の抗 T N F α 剤は、J I A による被験者の治療に有効であった。治験依頼者は、S C ゴリムマブの B S A ベースの投与量の研究を実施して (C N T O 1 4 8 J I A 3 0 0 1)、若年性 P s A を含む複数の J I A のサブタイプの治療における S C ゴリムマブの使用に伴う利益及びリスクを評価した。

【0391】

成人における I V ゴリムマブの C N T O 1 4 8 A R T 3 0 0 1 研究の結果、及び J I A を有する被験者における S C ゴリムマブの C N T O 1 4 8 J I A 3 0 0 1 研究の結果を以下に記載する。

【0392】

1. 1. 2. 1. 成人リウマチ性関節炎における静脈内ゴリムマブ
無作為化プラセボ対照多施設二重盲検試験である C N T O 1 4 8 A R T 3 0 0 1 の主要目的は、M T X 療法にもかかわらず活動性 R A を有する成人被験者における、M T X 単独と比較したゴリムマブ 2 m g / k g + M T X の I V 投与の臨床的有效性を評価することであった。およそ 5 6 4 人の被験者を計画し、5 9 2 人を無作為化した。

【0393】

被験者は、併用 M T X 療法にもかかわらず、スクリーニング及びベースライン時に 6 個以上の圧痛関節及び 6 個以上の腫脹関節として定義される活動性 R A を有しており、スクリーニング前の少なくとも 3 ヶ月間、R A の診断を有した 1 8 歳以上の男女とした。スクリーニング時に、被験者は、C 反応性タンパク質 (C R P) 測定値が ≥ 1.0 m g / d L (正常値の上限 = 1.0 m g / d L) でなければならず、かつ R F 陽性でなければならな

い。

【0394】

ゴリムマブに対して無作為化した被験者に、 30 ± 10 分間の注入時間にわたって $2 \text{ mg} / \text{kg}$ のゴリムマブを静脈内投与した。更に、被験者を研究全体を通じて安定した用量の市販のMTX ($15 \text{ mg} \sim 25 \text{ mg} / \text{週}$) に維持した。

【0395】

無作為化は、 $1.5 \text{ mg} / \text{dL}$ 未満又は $1.5 \text{ mg} / \text{dL}$ 以上のスクリーニングCRPに基づいて階層化した。被験者を、第0週目、第4週目、その後、8週毎 (q8w) にゴリムマブ+MTX又はプラセボ+MTXに対して2:1で無作為化した。研究全体の治療期間は、12週間の安全性フォローアップ期間を伴う100週間とした。

【0396】

全体で592人の被験者のうちの570人 (96%) が24週の研究を完了した。残りの22人 (4%) の被験者は、第24週目の前に研究を中止した。最も多くの中止はAEによるものであった (ゴリムマブ+MTX群の9人 [2.3%] の被験者及びプラセボ+MTX群における2人 [1.0%] の被験者)。

【0397】

プラセボ+MTX群の被験者 (24.9%、 $p < 0.001$) と比較して、ゴリムマブ+MTX群の被験者の有意に大きな割合 (58.5%) が第1のエンドポイント、すなわち第14週目のACR20応答を達成した。治療効果は、スクリーニング時に $\text{CRP} \geq 1.5 \text{ mg} / \text{dL}$ 又は $< 1.5 \text{ mg} / \text{dL}$ のいずれかを有した被験者で一貫していた。ゴリムマブ+MTX群とプラセボ+MTX群との間で、ACR20レスポンスの割合に有意な差が早くも第2週目に観察された。主要二次有効性エンドポイントも達成された。プラセボ+MTX群の被験者 (40.1%、 $p < 0.001$) と比較して、第14週目 (81.3%) でゴリムマブ+MTX群の被験者の有意に大きい割合が、良好な、又は中程度の疾病活動性指数スコア (DAS) 28応答 (CRPを用いた) を有した。

【0398】

プラセボ+MTX群 (0.125、 $p < 0.001$) の被験者と比較して、ゴリムマブ+MTX群 (0.500) の被験者では、第14週目における健康評価質問票の機能障害指数 (HAQ-DI) の障害スコアが有意に高かった。また、第14週目 (それぞれ43.1%と比較して68.4%、 $p < 0.001$) 及び第24週目 (それぞれ45.2%と比較して67.6%、 $p < 0.001$) の両方で、プラセボ+MTX群と比較してゴリムマブ+MTX群で、HAQ-DIの臨床的に関連した改善率 (0.25以上) に有意差が認められた。ゴリムマブ+MTXを投与された被験者は、プラセボ+MTXを投与した被験者 (13.2%、 $p < 0.001$) と比較して、第24週目に有意に高いACR50応答率 (34.9%) を示した。

【0399】

小さい母集団サイズ (すなわち、15人未満の被験者) のサブグループを除いて、人口統計学、ベースライン臨床特性、及びRAに対する薬剤への以前の曝露のサブグループ内で一貫した治療利益が観察された。

【0400】

36項目のショートフォーム健康調査 (SF-36) の精神的及び身体的要素のサマリースコア並びにSF-36フォームの8つのスケール全ての統計的に有意に高い改善が、第12週目のプラセボ+MTX治療に対して、ゴリムマブ+MTX治療で観察された (全ての比較で $p < 0.001$)。これらの改善は第24週目まで維持された。

【0401】

CNT0148ART3001では第16週目 (早期離脱前のプラセボ対照期間) までプラセボ群の被験者の43.7%及びゴリムマブ群の47.3%がAEを有し、最も高いAEの発生率は、感染症及び寄生虫症の器官別大分類 (SOC) におけるものであり、それぞれプラセボ群及びゴリムマブ群で20.8%及び24.3%であり、上気道感染症 (URTI) が最も頻繁に報告されたAEであった (それぞれプラセボ群及びゴリムマブ群

10

20

30

40

50

で5.6%及び5.1%)。第112週目まで、ゴリムマブ治療被験者の79.1%がAEを有し、最も高いAEの発生率は、感染症及び寄生虫症SOCであり(50.5%)、URTIが最も頻繁に報告されたAEであった(11.5%)。

【0402】

CNT0148ART3001の第16週目まで、プラセボ群の被験者の1.0%及びゴリムマブ群の被験者の3.8%がSAEを有した。各SOC内のSAEの発生率は1.0%未満であり、複数の被験者でSAEは発生しなかった。第112週目まで、ゴリムマブ治療被験者の18.2%がSAEを有した。最も高いSAEの発生率は、感染症及び寄生虫症SOC(5.5%)及び筋骨格系及び結合組織障害SOC(3.4%)で生じ、最も頻繁に報告されたSAEはRA(2.1%)であった。

【0403】

第24週目までに、CNT0148ART3001研究で患者1人が死亡した。この被験者は、プラセボ+MTXによる治療に対して無作為化され、ゴリムマブの投与を受けず、推定される脳血管発作(脳卒中)により死亡した。第112週目までに、更に5人の被験者がCNT0148ART3001研究で死亡した。プラセボ+MTXによる治療に対して無作為化された2人の被験者が、いずれもゴリムマブ2mg/kg+MTXに切り替えた後に死亡した。死亡原因は突然死であり(n=1)、重度の脱水、クロストリジウム・ディフィシル大腸炎、及び心房細動(n=1)の合併症であった。2mg/kgのゴリムマブ+MTXによる治療に対して無作為化された3人の被験者が研究中に死亡した。報告された死亡原因は、急性腹部症候群(後に腹膜結核[TB]、n=1と診断)、推定心筋梗塞(MI、n=1)、及びアシネトバクター・バウマニによる化膿性肺膿瘍に続発する敗血症性ショック(n=1)であった。

【0404】

研究CNT0148ART3001の第16週目までに悪性腫瘍は報告されなかった。試験薬剤の投与前にプラセボ+MTX群で治療以外の原因による肺腺癌の1症例が報告された。プラセボ対照期間(第24週目)を通じてゴリムマブ群で1例の悪性腫瘍(乳癌)が報告された。第112週目までに、基底細胞癌、慢性リンパ性白血病の家族歴を有する被験者における慢性リンパ性白血病、子宮頸部上皮内癌、ボーエン病、及び基底細胞癌を含む5例の更なる悪性腫瘍が報告された。第112週目までリンパ腫の症例は報告されなかった。

【0405】

CNT0148ART3001の第16週目までに、ゴリムマブ群の被験者の0.8%が、虫垂炎、菌血症、及び間質肺疾患(の合併症)を含む重篤な感染症を有した。プラセボ群に重篤な感染を有した被験者はいなかった。第112週目までに、ゴリムマブ治療被験者の6.2%が重篤な感染症を有した。複数の被験者で生じた重篤な感染症として、肺炎(n=5)、UTI(n=4)、及び丹毒(n=2)があった。

【0406】

CNT0148ART3001における第16週目まで、プラセボ群の被験者の0.5%及びゴリムマブ群における被験者の2.5%が注入反応を有した。第112週目まで、ゴリムマブ治療被験者の3.9%が注入反応を有し、注入の0.4%で注入反応の合併症がみられた。全てのプラセボ注入は、真のマッチングさせたプラセボではなく、0.9%の通常の生理食塩水のみで構成されたものである点に留意されたい。試験薬剤の中断を必要とする重篤な注入反応は認められなかった。試験薬との関連のないアナフィラキシーの例があった。

【0407】

41.56µg/mLの血清ゴリムマブピーク濃度中央値(すなわち、注入後ゴリムマブ濃度)が、第0週目、第4週目、その後のq8w(±1週間)投与の2mg/kgゴリムマブのIV投与後の第4週目に観察された。このピークは、4週間毎(q4w)の50mgのSCゴリムマブ投与について報告されたものよりも高い。MTXと共に2mg/kgのIVゴリムマブをq8wで投与した被験者の血清ゴリムマブトラフ濃度中央値は、第

10

20

30

40

50

12週目で $0.28 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、第20週目で $0.22 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらのレベルは、SCゴリムマブ 50mg で報告されたものと同様である。ゴリムマブへの全体的な曝露量は、同様の曝露期間にわたるSCゴリムマブ 50mg の曝露量の約3倍である。

【0408】

IVゴリムマブプログラムからのデータは、プラセボを投与した被験者と比較して、ゴリムマブで治療した被験者においてより低い放射線学的進行を示した。ゴリムマブ+MTX治療群とプラセボ+MTXとの間で第24週目に合計ファン・デル・ハイデ改変シャープ(vdH-S)スコアのベースラインからの変化に有意な差が認められた(プラセボ+MTX: 1.09 ± 3.194 、ゴリムマブ $2\text{mg}/\text{kg}$ +MTX: 0.03 ± 1.899 [$P < 0.001$])。IVゴリムマブに有利な有意差はまた、びらん及び関節裂隙狭小化スコアのベースラインからの変化においても観察された。最小の検出可能な変化に基づく放射線学的進行を有する被験者の割合は、合計vdH-Sスコア($p < 0.001$)並びにびらん($p = 0.001$)及び関節裂隙狭小化測定値($p = 0.01$)の両方についてプラセボ+MTXと比較した場合にゴリムマブ+MTXで治療した被験者で有意に低かった。

【0409】

1.1.2.2. 若年性特発性関節炎における皮下ゴリムマブ

CNT0148JIA3001は、MTXによる現在の治療にもかかわらず活動性pJIAを有する小児被験者における4週間毎(q4w)に投与したBSAベースの $30\text{mg}/\text{m}^2$ (最大 $50\text{mg}/\text{用量}$ まで)のSCゴリムマブの無作為化治療中止二重盲検プラセボ対照並行群多施設研究であった。研究対象母集団は、MTXを投与中の、年齢2歳~18歳未満、少なくとも6ヶ月のpJIA歴を有し、5つ以上の関節に活動性関節炎を有するpJIAを有する被験者を含む。全ての被験者に、第0週目~第16週目までの研究の能動的治療部分においてSCゴリムマブを投与した。第16週目にJIAACR30レスポnderを無作為化して、プラセボ又はゴリムマブを32週間投与した。この32週間の期間中にフレアを経験した、プラセボに対して無作為化した被験者でゴリムマブ療法を再開した。プラセボ対照期間は第48週目までとし、第48週目~第248週目まで長期延長を計画した。

【0410】

約170人の被験者を計画し、173人の被験者を研究に組み入れた。173人の被験者の全てを、第48週目の有効性及び安全性分析に含めた。173人の被験者のうち、19人が第16週目までに試験薬剤を中止し(有効性がみられなかった [$n = 14$]、AE [$n = 4$]、同意の撤回 [$n = 1$])、154人の被験者が無作為化治療中止試験に入った(76人がプラセボに、78人がゴリムマブを継続した)。

【0411】

組み入れられた173人の被験者のベースライン疾患特性は、CNT0148JIA3001における数値的に低いCRP/ESRレベルの平均及び中央値を除いて、pJIAにおける抗TNF α 剤の他の臨床研究と同等の中等度~重度のJIAを有する集団から構成された。

【0412】

第16週目にJIAACR30レスポnderであった被験者の割合は、87.3%であった。更に、第16週目のJIAACR50、JIAACR70、及びJIAACR90レスポnderの割合は、それぞれ79.2%、65.9%、及び36.4%であった。

【0413】

この研究は、第16週目でJIAACR30レスポnderであり、かつ第16週目~第48週目の間に疾患のフレアを経験しなかった被験者の割合が、第16週目~第48週目の間にプラセボの投与に対して無作為化された被験者と比較して、第16週目~第48週目の間に継続したゴリムマブ治療に対して無作為化された被験者で有意に異ならなかったため(52.6%に対して59%、 $p = 0.41$)、一次及び主要二次エンドポイント

を満たさなかった。全ての感度分析及び主要二次エンドポイントは、治療群間で統計的に有意な差がないことを示した。治験依頼者は、予め指定された有効性エンドポイントが満たされなかったため、研究の長期延長を早期に中止した。

【0414】

0.1～1.0 mg/dLの範囲の第0週目のCRPレベルに基づいてフレア率を評価した事後解析によれば、一般に、より高いベースラインCRPレベルを有する被験者間では、継続したゴリムマブ療法を受けた被験者で、第16週目にプラセボに対して無作為化された被験者よりもフレアエピソードが有意に少なかったことが示された。

【0415】

第48週目までの観察されたデータに基づいてJIA ACR応答率を分析したところ（第0週目をベースラインとして使用し、第48週目までの各来院時の薬剤／プラセボ効果を比較した）、89%～95.9%のJIA ACR30応答率及び53.4%～56.2%のJIA ACR90応答速度が第48週目に得られた。第48週目までのコアセットの改善は、第16週目にプラセボに対して無作為化された被験者と比較して、第16週目にゴリムマブに無作為化された被験者において全ての来院で同様であり、いずれも疾患における臨床的に有意な改善を示し、例えば、医師による疾患活動性の全般的評価（Physician Global Assessment of Disease Activity）における94.6%及び95.1%の改善率中央値、及び活動性関節の数における90.9%及び100%の改善率中央値を示した。

【0416】

薬物動態（PK）及び免疫原性データを、CNT0148 JIA3001の第48週目まで収集した。ゴリムマブ30 mg/m²をSCで投与し、能動的治療の継続に対して無作為化されたpJIAを有する被験者では、第12週目、第24週目、及び第48週目におけるゴリムマブのトラフ濃度中央値はそれぞれ1.16 µg/mL、1.12 µg/mL、及び0.95 µg/mLであり、定常状態レベルが第48週目まで維持されたことを示した。更に、定常状態のゴリムマブのトラフ濃度は、pJIAを有する被験者の異なる年齢群、体重四分位群、ボディマス指数四分位群、及び体重分類群にわたって同様であった。全体として、これらの濃度は、SCゴリムマブで治療したC0524 T06の成人活動性RA集団（MTXにもかかわらず）で観察されたPK曝露量と同様であり、したがって、30 mg/m² SC、q4wのBSAベースのゴリムマブレジメンが、ゴリムマブ50 mgをSC、q4wで投与した成人RA集団でみられる濃度と同等の濃度を生じるのに十分であったという仮説を支持した。更に、PK及び有効性分析は、定常状態のゴリムマブのトラフ濃度四分位群の4つのサブグループにおけるpJIAを有する被験者で、同様の有効性（JIA ACR30応答及びフレア率により測定される）がみられたことを示した。更に、フレアを経験した被験者としなかった被験者との間で明らかなPKの差は認められなかった。

【0417】

免疫原性に関して、最近開発された薬剤耐性イムノアッセイ分析を使用したところ、被験者の40.1%でゴリムマブに対する抗体が生じていた。新しい薬剤耐性イムノアッセイは、成人ゴリムマブRA研究で以前に使用されているアッセイと比較してより感度が高く、検出可能な血清ゴリムマブレベルにもかかわらず、ゴリムマブに対する抗体を検出することができる。ゴリムマブ30 mg/m² SC+MTXに無作為化され、これを継続した被験者のうち、30.8%がゴリムマブに対する抗体を生じたが、抗体の力価は低くなる傾向があった。PK、有効性、及び安全性に対する免疫原性の効果を評価したところ、抗ゴリムマブ抗体の陽性状態は、力価レベルが1：100より大きい場合に定常状態のゴリムマブのトラフ濃度を低下させることが見出された。しかしながら、有効性に対する抗体の効果は感度が低く、見かけの有効性の低下と相関させるには1：1000超のより高い力価を必要とする。1：1000より大きい力価の抗ゴリムマブ抗体を生じたのはJIAを有する被験者のわずかに約5%であったため、免疫原性はCNT0148 JIA3001で一次エンドポイントが達成されなかったことに寄与する因子ではないものと判断さ

10

20

30

40

50

れた。更に、抗ゴリムマブ抗体の陽性状態は、注射部位反応の高い発生率とは関連していないようであった。

【0418】

第48週目までにAEを報告した被験者の割合は87.9%であった。最も一般的に報告されているAEの器官別大分類は、感染症及び寄生虫症(67.1%)であり、主に上気道感染及び鼻咽頭炎であった。プラセボに対して無作為化された被験者(82.9%)及び継続したゴリムマブ治療に対して無作為化された被験者(78.2%)で第16週目～第48週目に報告されたAEに顕著な差はなかった。しかしながら、研究の無作為化治療中止部分の全ての被験者を、再無作為化の前16週間にわたってゴリムマブに曝露した点に留意されたい。重篤な有害事象が被験者の13.3%で報告された。最も一般的に報告されたSAEは、JIA(6.4%)の悪化であった。被験者の2.9%で重篤な感染(肺炎、尿路感染症、带状疱疹、上気道感染症、及び腎盂腎炎)が報告され、第48週目までに死亡、悪性腫瘍、又は脱髄事象はみられなかった。活動性TBの報告はなく、重篤な日和見感染症も報告されなかった。第48週目までに、異常なアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)測定値を有する(かつ肝機能検査[LFT]に影響を及ぼし得る潜在性TBに対する併用治療を行っていない)被験者の数は29.5%(51/167)であり、51人の被験者のうち、39人が3×ULN未満の上昇を示した。

10

【0419】

2人の被験者でALT上昇が8×ULNを上回ったが、いずれの被験者も肝毒性と一致するHy's Lawの基準を満たさなかった。被験者はTB予防薬を投与されておらず、被験者のうちの1人は、既に異常なベースラインALTを有していた。LFT異常を有する全ての被験者は、MTX投与量を変えて保存的な管理を行ったが、1人の被験者は高いLFTのために中止した。

20

【0420】

第48週目までの注射部位反応を伴う注射の発生率は0.8%であり、ゴリムマブ処理を再開したプラセボに対して無作為化された被験者で血清病様反応のSAE報告が1例あった。

【0421】

CNT0148JIA3001研究はそのエンドポイントを満たさなかったものの、JIAACR応答速度を第48週目までに観察されたデータとして分析した場合(第0週目をベースラインとして使用し、第48週目までの各来院時の薬剤/プラセボ効果を比較)、研究は、pJIAを有する小児においてSCゴリムマブにより得られるかもしれない有効性の可能性を示した。したがって、これは、MTXに対して不適切な応答を有するpJIAを有する被験者におけるIVゴリムマブの研究に対する支持を与えるものである。

30

【0422】

1.2. 研究の全体的な理論的根拠

静脈内ゴリムマブは、RAを有する成人の治療において有効であることが実証されている(セクション1.1.2.1)。抗TNF α 剤をはじめとする他の生物製剤が、pJIAを有する被験者の治療に有効であることが示されている。pJIAの治療には生物学的注入療法があるが、現在、この状態に対して承認されている静脈内投与による抗TNF α 剤は存在しない。小児についてこの研究で提案され、RAを有する成人で研究された、8週毎の30分間の注入による方法は、薬物療法の更なる医師による精査が必要とされるか又は求められる患者の集団に適切であり得る。特に小児集団では、他の生物学的薬剤と比較して、薬物投与の回数の減少(すなわち、8週毎の維持スケジュールとする)は利便性を高め、苦痛を減らす(より少ない回数のIV投与による)ことができる。更に、従来の抗TNF α 剤が有効でない患者において異なる抗TNF α 剤に切り替えることで、疾患の更なる症状緩和をもたらす得る。

40

【0423】

本研究の主目的は、pJIAにおけるIVゴリムマブのPKを特徴付けるとともに、これらの被験者におけるIVゴリムマブの安全性及び有効性を評価することである。本研究

50

は、若年性 P s A を含む J I A の複数のサブタイプを有する被験者、並びに以前に抗 T N F α 投与歴のある被験者（研究対象母集団の最大 30%）を含む。

【0424】

この研究は、M T X 治療、並びに非ステロイド性抗炎症剤、コルチコステロイド、及び／又は抗 T N F α 剤による以前の治療に不十分な応答を有する p J I A を有する被験者における B S A ベース（ 80 mg/m^2 ；体重 70 kg の成人 R A 患者における 2 mg/kg 用量と同等であると予想される）の I V ゴリムマブに応じた P K データを得るように設計されたものであり、その意図は、M T X 治療に対して不十分な応答を有する成人 R A 被験者における体重ベースの（ 2 mg/kg ）用量の I V ゴリムマブでみられる応答との類似性を実証することである。p J I A を有する被験者における 80 mg/m^2 の用量は、成人 R A 集団における C N T O 1 4 8 A R T 3 0 0 1 で研究した 2 mg/kg の用量に基づいたものである。

10

【0425】

2. 目的及び仮説

2.1. 目的

主目的

この研究の主目的は、2ヶ月以上にわたる M T X 療法にもかかわらず、5つ以上の関節が活動性の関節炎を有することによって発現される p J I A を有する被験者（年齢 2 歳～18 歳未満）へのゴリムマブの静脈内投与後の P K を評価することである。

【0426】

副次的目的

この研究の副次的目的は、P K、有効性（徴候及び症状の緩和、物理的機能、及び生活の質）、安全性（A E、S A E、及び検査パラメータの評価）、並びに免疫原性（ゴリムマブに対する抗体）に関して、p J I A を有する被験者におけるゴリムマブの静脈内投与（I V）を評価することである。

20

【0427】

2.2. 仮説

この研究では、公式な仮説の検証は計画されていない。

【0428】

3. 研究設計及び理論的根拠

3.1. 研究設計の概要

これは、M T X による現在の治療にもかかわらず、活動性の p J I A を有する被験者における I V ゴリムマブの P K、安全性、及び有効性を評価するための第 3 相非盲検単群多施設共同研究である。研究対象母集団は、M T X を投与中の、年齢 2 歳～18 歳未満、少なくとも 3 ヶ月の p J I A 歴を有し、5つ以上の関節に活動性関節炎を有する p J I A を有する被験者を含む。約 120 人の被験者を第 0 週目に組み入れて第 52 週目に約 100 人の被験者が研究に残るようにする。組み入れパターンは、約 10% が 2 歳～6 歳以下、約 20% が 6 歳～12 歳以下、及び約 70% が 12 歳～18 歳未満の被験者集団を与えることが期待される。

30

【0429】

全ての被験者は、第 0 週目、第 4 週目、第 28 週目までは 8 週間毎（q 8 w； ± 3 日）、その後は第 244 週目まで q 8 w（ ± 1 週間）で、 80 mg/m^2 （最大 1 回用量 240 mg ）のゴリムマブを I V 注入として 30 ± 10 分間かけて投与される。体表面積は、各来院で測定された被験者の身長及び体重に基づいて計算し、必要に応じてゴリムマブの B S A ベースの用量を調節して 80 mg/m^2 の用量を維持する。被験者はまた、市販の M T X も、セクション 6.2 に概説されるように研究組み入れの時点と同じ B S A ベースの用量（B S A $< 1.67\text{ m}^2$ の被験者には 1 週当たり $10 \sim 30\text{ mg/m}^2$ の M T X、又は B S A $\geq 1.67\text{ m}^2$ の被験者には最小で 15 mg/週 ）で第 28 週目まで週 1 回投与される。

40

【0430】

50

被験者がBSAに基づいて 80 mg/m^2 のゴリムマブの用量に維持されるようにあらゆる努力が払われるべきであり、 80 mg/m^2 を下回る量への減少若しくはそれを上回る量への増加、又は投与間隔の短縮（例えば8週間から6週間への）はいずれの来院においても許可されない。

【0431】

この研究は、全ての被験者に同じBSAベース用量のIVゴリムマブを投与する非盲検試験である。安全性データは、研究の医療監視員によって常法により評価される。したがって、外部のデータ監視委員会は設置されない。

【0432】

図18に、研究設計の図を示す。

【0433】

3.1.1. 第0週目～第28週目

第28週目までは、4週間毎に治験実施施設で被験者を監視し、疾患活動性及び安全性を評価する。

【0434】

研究対象母集団の50%超が、第28週目に治療に対する適切な応答（米国リウマチ学会の小児30%改善率（American College of Rheumatology Pediatric 30%）[JIA ACR 30]の応答）を達成した場合、研究を中止する。

【0435】

全ての被験者が第28週目の来院を完了した後、データベースをロックしてPK、安全性、及び有効性を評価する。更なる安全性、有効性、及びPKデータベースのロックは、現在、第52週目に計画されている。最後のデータベースのロックは、第252週目に行われる。

【0436】

バックグラウンド薬剤への変更が必要となる安全性の懸念（例えば、肝機能検査の上昇）がない限り、セクション8に示されるパラメータを超える用量（例えば、 10 mg/日 以下のプレドニゾン、又は 0.20 mg/kg/日 以下のいずれか低い方）の増加又は減少及び／又は第0週目～第28週目の間の投与経路に関してバックグラウンド薬剤（すなわち、MTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及びNSAID）に変更を行って

【0437】

被験者がフォローアップ不能となった場合、研究施設担当者により、被験者と連絡を取って中止／離脱の理由を決定するためのあらゆる可能な取り組みが行われなければならない。フォローアップのために取られた措置は文書化されなければならない。

【0438】

被験者が研究を完了する前に離脱する場合、離脱の理由をCRF及びソースドキュメントに文書化する。離脱した被験者に割り当てられた試験薬は、別の被験者に割り当てられなくてもよい。離脱する被験者は交代されない。

【0439】

3.1.2. 第28週目～第52週目

第28週目～第52週目までは、8週間毎（±1週間）に注入を継続して行う。しかしながら、被験者を治験実施施設で能動的に監視し、疾患の活動及び安全性を第0週目～第28週目における4週間毎ではなく8週間毎に治験実施施設で評価する。上述したように、第28週目の後、被験者に、セクション8で概説されるように、MTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及びNSAIDを変更／追加することを許可する。

【0440】

3.1.3. 第52週目～第252週目（長期延長）

第52週目で研究を完了する被験者には、この研究の長期延長（LTE）相に入る選択肢を与える。長期延長に入らないことを選んだ被験者は、試験薬剤の最後の投与後に更に

10

20

30

40

50

8週間の安全性フォローアップ来院を完了することを奨励される。

【0441】

長期延長の間、全ての被験者に第244週目までゴリムマブの投与をq8w（±1週間）で継続する。252週間の全治験期間を完了し、薬剤が有益であることが証明されているが、薬剤がpJIA兆候への適応用に市販されていない子供（又は患者が薬物の支払いをするための保険資格を有さない場合）には、IVゴリムマブは、治験依頼者によって引き続き提供される。第52週目～第252週目の間、疾患活動性を監視及び評価し、16週間毎にCRFに文書化し、注入及び安全測定は治験実施施設において8週間毎に行う。

【0442】

上述のように、第28週目の後、被験者にMTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及びNSAID（セクション8に概説されるような、これらのクラスの薬剤のBSAベースの用量の増加又は減少を含む）を変更／追加することを許可する（適切な場合）。

【0443】

第244週目の来院を完了した全ての被験者は、第252週目の安全性フォローアップ来院に参加することが期待される。第244週目の前の任意の時点で試験薬剤を中止する被験者も、試験薬剤の最後の投与の約8週間後に安全性フォローアップ来院のために戻ることが期待される。

【0444】

最後のデータベースのロックは、第252週目に行われる。

【0445】

3.1.4. 研究終了の定義

研究の終了は、長期延長の最後の被験者の最後のフォローアップ評価として定義される。

【0446】

3.2. 研究設計の理論的根拠

3.2.1. 盲検、対照、研究相／期間、治療群

これは、pJIAを有する被験者におけるIVゴリムマブのPKを評価するための単群非盲検試験であり、全ての被験者に第52週目まで同じBSAベースの用量のIVゴリムマブを投与する。第52週目で研究を完了する被験者には、第252週目までこの研究の長期延長相に入る選択肢を与える。

【0447】

3.2.2. 用量の選択

成人用の薬剤用量と異なり、小児用の薬剤用量（非経口）は、小児の成熟する臓器系において変化が生じることから、異なる年齢の子供で観察されるPKの変動を管理するために、一般的に体重ベース（mg/kg）又はBSAベース（mg/m²）の用量として個々に計算される^{10, 22}。他の承認された抗TNFα剤（例えば、アダリムマブ及びエタネルセプト）に対する体重ベース又はBSAベースの用量の正規化による成人から小児被験者への用量の外挿の効果的な結果は、リウマチ疾患における抗TNFα剤に対する臨床応答は成人と小児とで似ているという仮定を支持するものである。すなわち、成人と子供の間で固有のPK差が考慮された後では、成人及び子供の両方で同様の薬物曝露により同様の薬物応答が予想される。

【0448】

24週間にわたる、RAを有する成人における第3相IV研究（CNT0148ART3001）からのデータは、第0週目、第4週目、及びその後のq8w（±1週間）のゴリムマブ2mg/kgが、ほとんどの成人のRAの治療用の最適用量レジメンであることを示している。小児の場合、ゴリムマブ80mg/m²（2mg/kg/1.73m²）は、体重70kgの成人被験者（1.73m²のBSAを有する）における2mg/kgに概ね相当する。したがって、今回の研究（CNT0148JIA3003）では、ゴリムマブ80mg/m²の用量が、pJIA集団におけるゴリムマブの安全性及び有効性を評価するために選択されている。

【0449】

10

20

30

40

50

3. 2. 3. 原理

p J I A 集団における I V ゴリムマブの非盲検試験設計は、成人 R A 及び p J I A における他の抗 T N F α 剤の研究からのデータ、成人 R A における I V ゴリムマブの治験依頼者の研究 (C N T O 1 4 8 A R T 3 0 0 1) からの P K 及び有効性データ、p J I A における S C ゴリムマブを用いた治験依頼者の経験 (C N T O 1 4 8 J I A 3 0 0 1)、並びに小児リウマチ国際研究機関 (Pediatric Rheumatology International Trials Organisation、P R I N T O) 及び小児リウマチ共同研究グループ (The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group、P R C S G) からのフィードバックに基づく。

【0450】

治験依頼者は、R A を有する成人患者用の I V ゴリムマブ (静脈内使用用の S I M P O N I A R I A / S I M P O N I) の承認の根拠となったピボタル研究であった、提案された非盲検 C N T O 1 4 8 J I A 3 0 0 3 研究から得られた P K データを利用して、R A における C N T O 1 4 8 A R T 3 0 0 1 研究からの成人 P K データに対して外挿する。更に、有効性 (P D) データを収集して、対症的な曝露応答の評価を調べる。

【0451】

4. 被験者集団

適格な被験者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。

【0452】

この研究に被験者を登録するための組み入れ基準及び除外基準は、以下の 2 つのサブセクションに記述される。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、この研究に被験者を組み入れ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。

【0453】

被験者選択の統計的考慮事項の考察については、セクション 1 1 . 2 の試料サイズ決定を参照されたい。

【0454】

組み入れ及び除外基準からの逸脱は、研究の科学的完全性、規制の許容性、又は被験者の安全性を損なう可能性があるため、容認されない。したがって、プロトコルで指定される基準の遵守は不可欠である。

【0455】

約 1 2 0 人の被験者がこの研究に組み入れられる。試験治療を中止するか又は研究参加から離脱する組み入れ被験者は、新たな被験者と交代されない。

【0456】

除外につながる異常スクリーニング値の再試験は、適格性を再評価するために、スクリーニング期間中に計画されていない来院を用いて 1 回のみ許可される。これは、被験者の安全性に予想される影響がない場合にのみ考慮されるべきである。

【0457】

4. 1. 組み入れ基準

各可能性のある被験者は、この研究に登録されるために、下記の基準全てを満たす必要がある。

【0458】

1. 被験者は、スクリーニング時及び第 0 週目に年齢 2 歳 ~ 1 8 歳未満、体重 1 5 k g 超でなければならない。

【0459】

2. 診断は、J I A I L A R 診断基準に従って行わなければならない、疾患の発症は、被験者の 1 6 回目の誕生日の前でなければならない。

【0460】

3. 以下のサブタイプのうちの 1 つの活動性 J I A :

a. スクリーニング前に 3 ヶ月以上のリウマチ因子陽性又は陰性の p J I A、又は

b. 3 ヶ月以上にわたる全身症状がないが、スクリーニング前に 3 ヶ月以上の多発性関

10

20

30

40

50

節炎を有する全身性 J I A、又は

- c. スクリーニング前に 3 ヶ月以上の拡張オリゴ関節 J I A、又は
- d. スクリーニング前に 3 ヶ月以上の多関節型若年性乾癬性関節炎、又は、
- e. スクリーニング前に 3 ヶ月以上の付着部炎関連関節炎。

【0461】

- 4. スクリーニング前の少なくとも 2 ヶ月間の M T X に対する不応答又は不適切な応答。

【0462】

5. 被験者は、A C R 基準（すなわち、腫脹がある、又は腫脹がない場合には、運動痛又は圧痛を伴う可動域の制限を有する関節）により定義される活動性関節炎を有する 5 つ以上の関節をスクリーニング時及び第 0 週目に有さなければならない。

【0463】

6. 被験者は、研究対象母集団の約 30 %を除いて、0.1 mg / d L 以上のスクリーニング C R P を有さなければならない。

【0464】

7. 被験者は、スクリーニングの前 2 ヶ月以上にわたる経口、筋肉内、又は皮下 M T X を現在使用中にもかかわらず、活動性 p J I A を有していなければならない。B S A < 1.67 m² の被験者では、M T X 用量は、1 週当たり 10 ~ 30 mg / m² でなければならない。スクリーニング前の 4 週間以上にわたって安定でなければならない。B S A ≥ 1.67 m² の被験者では、M T X 用量は、最低 15 mg / 週でなければならない。スクリーニング前の 4 週間以上にわたって安定でなければならない。1 週当たり 10 mg / m² 超（B S A < 1.67 m² の被験者の場合）又は 15 mg / 週以上（B S A ≥ 1.67 m² の被験者の場合）の用量の不耐性が文書化されている場合、又は文書化された国又は治験実施施設の規制によって B S A ≥ 1.67 m² の被験者における 1 週当たり 15 mg 以上の M T X の使用が禁止されている場合には、被験者は低用量の M T X を投与した状態で試験に入ることができる。

【0465】

8. コルチコステロイドを使用する場合、試験薬剤の初回投与前の 2 週間以上にわたり 10 mg / 日以下のプレドニゾン等価物又は 0.20 mg / k g / 日（いずれか低い方）の安定用量でなければならない。コルチコステロイドを現在使用していない場合、その被験者に初回用量投与の少なくとも 2 週間前にコルチコステロイドが投与されていなければならない。全身性に発症した J I A を有するが全身性症状のない被験者には、スクリーニング前の少なくとも 3 日間にわたって安定した用量のコルチコステロイドが投与されなければならない。

【0466】

9. N S A I D を使用する場合、スクリーニング前の 2 週間以上にわたって安定した用量が投与されなければならない。N S A I D を現在使用していない場合、スクリーニング前の少なくとも 2 週間は服用されていなければならない。

【0467】

- 10. 被験者は、以下の T B スクリーニング基準に従って適格とみなされる。

a. スクリーニング前に、潜在性又は活動性 T B の病歴がないこと。活動性 T B の兆候がない潜在性 T B のための治療を現在受けている被験者、又は潜在性 T B の履歴を有し、かつ試験薬剤の初回投与前 3 年以内に潜在性 T B 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被験者については、例外が認められる。過去の抗結核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。

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

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

- d. 試験薬剤の初回投与前 6 週間以内に、陰性の Q u a n t i F E R O N（登録商標）

(T B ゴールド検査) 結果を有するか、又は活動性 T B が除外され、潜在性 T B のための適切な治療 (セクション 9 . 1 . 2) が試験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 Q u a n t i F E R O N (登録商標) (T B ゴールド検査) 結果を有すること。Q u a n t i F E R O N (登録商標) (T B ゴールド検査) がその国で承認／登録されていないか、又はツベルクリン皮膚検査が現地の健康機関によって義務付けられている場合には、試験薬剤の初回投与前 6 週間以内に、ツベルクリン皮膚検査陰性、又は活動性 T B が除外され、潜在性 T B に対する適切な治療が試験薬剤の初回投与の前に開始された、新たに同定されたツベルクリン皮膚検査陽性が更に必要とされる。

e . 不確定結果は、セクション 9 . 1 . 2 に概説される指示に従って取り扱うべきである。活動性 T B が除外され、その胸部 X 線写真が T B (活動性又は古い、非活動性 T B) を示唆する異常を示しておらず、被験者が治験責任医師によって判定される T B についての更なる危険因子を有しない場合、継続的に不確定な Q u a n t i F E R O N (登録商標) (T B ゴールド検査) の結果を有する被験者は、潜在性 T B の治療を受けずに組み入れることができる。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、被験者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。

f . Q u a n t i F E R O N (登録商標) (T B ゴールド検査) 及びツベルクリン皮膚検査は、潜在性 T B の履歴及び潜在性 T B 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被験者に対しては、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の文書がある被験者は、潜在性 T B のための更なる治療を開始する必要はない。

g . 国又は現地のガイドラインが、抗 T N F α 療法の開始前の必要なスクリーニングプロセスとして胸部 X 線検査を推奨していない場合を除き、胸部 X 線写真 (後前方向像) を試験薬剤の初回投与前 3 ヶ月以内に撮影し、有資格の放射線医が読影しなければならない。現時点での活動性 T B 又は過去の非活動性 T B のエビデンスがあってはならない。胸部 X 線写真 (後前方向像と横方向像の両方) は、T B についてのツベルクリン皮膚検査及び／又は Q u a n t i F E R O N (登録商標) (T B ゴールド検査) のいずれかが陽性である全ての場合で、スクリーニングプロセスの一環として行われなければならない。

【 0 4 6 8 】

1 1 . 被験者は、スクリーニング時に行われる身体検査、病歴、バイタルサインに基づいて医学的に安定していなければならない。異常がある場合、それらは研究対象母集団における基礎疾患と一致しなければならない。

【 0 4 6 9 】

1 2 . 女子は、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場合：初経前；永久的に不妊であること (例えば、卵管閉塞、子宮摘出、両側卵管切除) ；若しくはそれら以外で、妊娠できない、又は

●妊娠する可能性があり、かつ性的に活発である場合、臨床研究に参加している被験者に対する避妊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 (intrauterine device、I U D) 又は子宮内システム (intrauterine system、I U S) の配置；バリア方法：殺精子フォーム／ジェル／フィルム／クリーム／座薬を有する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／座薬を有する閉塞キャップ (横隔膜又は頸部／ボルトキャップ)、男性パートナーの断種 (精管切除したパートナーは、その被験者の唯一のパートナーであるべきである) ；真の禁欲 (これが被験者の好みの通常の生活様式と一致している場合、治験責任医師の判断による／現地の規制に従う)。妊娠可能性のある女子は、研究中、及び試験薬の最後の用量を受けた後 6 ヶ月間、生殖補助の目的で卵 (卵子、卵母細胞) を提供しないと同意しなければならない。

注：研究開始後に妊娠の可能性が変わる場合 (例えば、異性と性的関係を持たない女子

10

20

30

40

50

が性的に活動的になる、初経前の女子が初経を経験するなど）、女子は、上述のように、高度に有効な避妊方法を開始しなければならない。

【0470】

13. 妊娠の可能性がある女子は、スクリーニング時の血清β-ヒト線毛性性腺刺激ホルモン[β-hCG]検査が陰性でなければならず、ゴリムマブ注入が行われる各研究来院時の尿妊娠検査が陰性でなければならない。

【0471】

14. 男子は禁欲を実施するか、又は、妊娠可能性のある女子と性的に活発であり、精管切除を受けていない場合は、研究中及び試験薬の最後の投薬後6ヶ月間は、例えば、殺精子剤フォーム／ジェル／フィルム／クリーム／座薬付きのコンドーム又はパートナーによる殺精子剤フォーム／ジェル／フィルム／クリーム／座薬付きの閉塞キャップ（隔壁又は頸管／ボルトキャップ）の使用といった、受胎調節の障壁法を使用することに同意する必要がある、また全ての男子は、精子の提供をしてはならない。

【0472】

15. 被験者のスクリーニング臨床検査は、以下の基準を満たさなければならない。

a. ヘモグロビン： $\geq 8.0 \text{ g/dL}$ （SI： $\geq 80 \text{ g/L}$ ；女子及び男子、2～11歳）

$\geq 8.5 \text{ g/dL}$ （SI： $\geq 85 \text{ g/L}$ ；女子、12～18歳）

$\geq 9.0 \text{ g/dL}$ （SI： $\geq 90 \text{ g/L}$ ；男子、12～18歳）

b. 白血球（WBC） $\geq 3.0 \times 10^3 \text{ 細胞}/\mu\text{L}$ （SI： $\geq 3.0 \times 10^9 \text{ 細胞}/\text{L}$ ）

c. 好中球 $\geq 1.5 \times 10^3 \text{ 細胞}/\mu\text{L}$ （SI： $\geq 1.5 \times 10^9 \text{ 細胞}/\text{L}$ ）

d. 血小板 $\geq 140 \times 10^3 \text{ 細胞}/\mu\text{L}$ （SI： $\geq 140 \times 10^9 \text{ 細胞}/\text{L}$ ）

e. 血清トランスミナーゼ濃度は中央検査室の正常値上限の1.2倍を超えない：

－アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）

○ $\leq 67 \text{ IU/L}$ （女子、2～4歳未満）

○ $\leq 58 \text{ IU/L}$ （女子、4～7歳未満）

○ $\leq 48 \text{ IU/L}$ （女子、7～18歳）

○ $\leq 83 \text{ IU/L}$ （男子、2～4歳未満）

○ $\leq 71 \text{ IU/L}$ （男子、4～7歳未満）

○ $\leq 48 \text{ IU/L}$ （男子、7～18歳）

－アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）

○ $\leq 41 \text{ IU/L}$ （女子、2～18歳）

○ $\leq 41 \text{ IU/L}$ （男子、2～10歳未満）

○ $\leq 52 \text{ IU/L}$ （男子、10～18歳）

f. 血清クレアチニンは以下を超えない。

－ 0.5 mg/dL （SI： $44 \mu\text{mol/L}$ ；2～5歳）

－ 0.7 mg/dL （SI： $62 \mu\text{mol/L}$ ；6～10歳）

－ 1.0 mg/dL （SI： $88 \mu\text{mol/L}$ ；11～12歳）

－ 1.2 mg/dL （SI： $106 \mu\text{mol/L}$ ；13歳以上）

【0473】

16. 被験者は、第0週目の前に免疫抑制被験者に対する現行の現地の免疫化ガイドラインと一致して、全ての免疫化を最新の状態にしている必要がある。

【0474】

17. 被験者が18歳になるまで、親又は保護者が各研究来院に被験者に付き添わなければならない。

【0475】

18. 被験者及び被験者の親（該当する場合）は、研究来院スケジュールを遵守することができ、他のプロトコル要件を理解の上、遵守できなければならない。

【0476】

19. 被験者は、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

10

20

30

40

50

、それが可能でなければならない。

【0477】

20. 各被験者（又は被験者の法的代理人）は、被験者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ICFに署名する必要がある。また、セクション16.2.3.「インフォームドコンセント」に記載されているように、研究の性質を理解することができる子供（一般的には7歳以上及び現地の規制に従う）は、その同意も必要とされる。

【0478】

4.2. 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被験者は、この研究の参加から除外される：

【0479】

投与された併用薬物療法又は過去の薬物療法：

1. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の4週間以内に、DMARD及び／又は免疫抑制療法を開始している。

【0480】

2. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の4週間の間に関節内、筋肉内又は静脈内コルチコステロイド（筋肉内コルチコトロピンを含む）による治療を受けている。

【0481】

3. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の3ヶ月以内に、ウステキヌマブ及びABT-874を含むがこれらに限定されない、IL-12又はIL-23の低減を目的としたいずれかの治療薬による治療を受けている。

【0482】

4. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の12ヶ月の間にナタリズマブ、エファリズマブ、又はB細胞若しくはT細胞を枯渇させる治療薬（例えば、リツキシマブ、アレムツズマブ、又はビシリズマブ）による治療を受けているか、又はこれらの薬剤のいずれかを投与した後の標的リンパ球の持続的枯渇のエビデンスをスクリーニング時に有する。

【0483】

5. 被験者が、第1の試験薬剤投与前の3ヶ月以内にアルファセプトによる治療を受けている。

【0484】

6. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の8週間以内にアバタセプトによる治療を受けている。

【0485】

7. 被験者が、最初の試験薬剤投与前の4週間以内にレフルノミドによる治療を受けている（薬物排出処置を受けているかに関係なく）か、又は最初の試験薬剤投与前の4～12週間にレフルノミドが投与され、薬物排出処置を受けていない。

【0486】

8. 被験者が、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、又は他のアルキル化剤を含む細胞毒性剤による治療を受けている。

【0487】

9. 被験者が、最初の試験薬剤投与の3ヶ月前から最後の試験薬剤投与の3ヶ月後までに、生ウイルスワクチン又は生菌ワクチンの接種を受けているか、又は受けることが予想される。

【0488】

10. 被験者が、スクリーニングの12ヶ月以内にBCGワクチン接種を受けているか、又は最後の試験薬剤投与後の12ヶ月以内にBCGワクチン接種を受ける予定がある。

【0489】

11. 被験者が、最初の試験薬剤投与の1週間以内にIL-1ra（アナキンラ）の投与を受けている。

10

20

30

40

50

【0490】

12. 被験者が、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、又はセルトリズマブ・ペゴールを含むがこれらに限定されないTNF α の減少を目的とする2種より多い治療薬による治療を以前に受けている。

【0491】

13. 被験者が抗TNF α 剤による治療を以前に受けている場合、抗TNF α 剤の中断の理由が、その抗TNF α 剤のクラスと一致する重度の又は重篤な有害事象であってはならない。

【0492】

14. 被験者が、試験薬剤の最初の投与の6週間以内にアダリムマブ又はセルトリズマブ・ペゴールの投与を受けているか、又は4週間以内にエタネルセプトの投与を受けている。

10

【0493】

15. 被験者が、試験薬剤の最初の投与の8週間以内にインフリキシマブ又はトシリズマブの投与を受けている。

【0494】

16. 被験者が、IV又はSCゴリムマブ投与をこれまでに受けている。

【0495】

17. 被験者が、試験薬剤の最初の投与の2週間以内に、トファシチニブを含むがこれらに限定されないヤーヌスキナーゼ（JAK）阻害剤の投与を受けている。

20

【0496】

18. 被験者が、最初の試験薬投与前の4ヶ月以内にカナキヌマブの投与を受けている。

【0497】

19. 被験者が、肝硬変、肝線維症、ALT及びASTの持続的上昇（6ヶ月以内の5回の検査のうちの3回よりも多くで上昇）、MTX肺炎、重症粘膜潰瘍、難治性の吐き気、嘔吐／下痢、臨床的に有意な骨髄抑制のエビデンス、重度の頭痛、重度の骨痛、又は外傷性骨折を含むがこれらに限定されない、MTXに関連する現在の副作用、又はMTXによる治療を除外する状態を有する。

【0498】

20. 被験者が、計画された最初の試験薬投与前の3ヶ月又は5半減期（いずれか長い方）以内に治験薬（治験ワクチンを含む）の投与を受けているか若しくは侵襲性の治験医療装置を使用したか、又は治験に現在組み込まれている。

30

【0499】

感染症、又は感染しやすい素質：

21. 被験者が、スクリーニングの前に、ヒストプラズマ症又はコクシジオイデス症を含む活発な肉芽腫性感染症の病歴を有する。潜在的TBの病歴の適格性に関する情報は、組み入れ基準（セクション4.1）を参照されたい。

【0500】

22. 被験者が、B型肝炎ウイルスについて陽性である。

【0501】

23. 被験者が、C型肝炎ウイルス（HCV）に対する抗体について血清反応陽性である。

40

【0502】

24. 被験者が、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）による感染の既知の履歴を有する。

【0503】

25. 被験者が、スクリーニング前の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）を有している。

【0504】

26. 被験者が、感染した関節プロテアーゼの病歴を有するか、又はそのプロテアーゼが取

50

り外されていない、若しくは交換されていないならば、関節プロテアーゼの疑わしい感染に対する抗生物質の投与を受けている。

【0505】

27. 被験者が、重篤な感染症（肝炎、肺炎、若しくは腎盂腎炎を含むが、これらに限定されない）を有している若しくは有していたか、又は最初の試験薬剤投与前の2ヶ月間に感染のために入院したか若しくはIV抗生物質の投与を受けている。

【0506】

28. 被験者が、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。

10

【0507】

29. 被験者が、TBを含む悪性疾患又は現在の活動性感染症の異常な示唆を示す、試験薬剤の初回投与前の3ヶ月以内の胸部X線写真を有する（適用可能な場合）。

【0508】

悪性腫瘍、又は高い悪性腫瘍の可能性：

30. 被験者が、既知の悪性腫瘍又は悪性腫瘍の病歴を有する。

【0509】

31. 被験者が、リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患の病歴、又は異常な大きさ若しくは位置のリンパ節腫脹などのリンパ増殖性疾患を示唆する徴候、又はpJIA若しくは全身症状を伴わずに全身性に発症するJIAと一致しない臨床的に有意な脾腫を有する。

20

【0510】

合併する医学的状态又は過去の医療履歴：

32. 被験者が、重度の進行性又は制御不能な肝不全若しくは腎不全の病歴を有するか、又は顕著な心臓、血管、肺、胃腸、内分泌、神経学的、血液学的、精神的、又は代謝的な障害を有する。

【0511】

33. 被験者が、ゴリムマブ又はその賦形剤に対する既知のアレルギー、過敏症、若しくは不耐性を有するか、又は被験者が、免疫グロブリンに対する既知のアレルギー、過敏症、若しくは不耐性を有する。

30

【0512】

34. 被験者が、物質乱用（薬物又はアルコール）の問題を有しているか、又は有していた。

【0513】

35. 被験者が、マクロファージ活性化症候群の病歴を有する。

【0514】

36. 被験者が、全身性エリテマトーデス、又はライム病を含むがこれらに限定されない、ゴリムマブ療法による利益の評価を混乱させる可能性がある別の炎症性疾患を有する。

【0515】

37. 被験者が、動けないか、ほとんど若しくは完全に寝たきりか、又は車椅子が必須であるか、又は年齢に応じたセルフケアの能力をほとんど若しくはまったく有していない。

40

【0516】

38. 被験者が、多発性硬化症などの脱髄疾患の既知の病歴を有する。

【0517】

39. 被験者が、うっ血性心不全の病歴、又は同時診断を有する。

【0518】

その他

40. 被験者が、治験責任医師の意見によって、参加が被験者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なんらかの状況を有する。

50

【0519】

41. 被験者が、この研究に組み込まれている間、妊娠している若しくは母乳を与えている、又は試験薬の最後の投薬後6カ月以内に妊娠する計画をしている女子である。

【0520】

42. 被験者が、この研究に組み込まれている間、又は試験薬の最後の投与の後6ヶ月以内に、父親となる計画をしている男子である。

【0521】

43. 被験者が、低い忍容性又はアクセスが困難であるために、複数回の静脈穿刺を行うことができない、又は行う意思がない。

【0522】

44. 被験者が、治験責任医師又は研究施設の被雇用者であり、治験責任医師又は研究施設の指示の下で提示された研究又は他の研究に直接的に関与している者、あるいはそのような被雇用者又は治験責任医師の家族である。

【0523】

45. 被験者が、スクリーニング前の3ヶ月以内に活動性のブドウ膜炎を有する。

【0524】

46. 被験者が $B S A > 3.0 m^2$ である。

【0525】

注記：治験責任医師は、全ての研究組み入れ基準がスクリーニング時に満たされていることを確実にするべきである。スクリーニング後であるが、第1の用量の試験薬が投与される前に、被験者の状態が変化（検査結果又は追加の医療記録の受領を含む）して、全ての適格性基準を満たすことができなくなった場合、被験者は、研究への参加から除外されるべきである。セクション17.4「文書」は、組み入れ基準を満たすことを支援するための必要な文書を記載している。

【0526】

4.3. 禁止事項及び制限事項

潜在的な被験者は、参加のために適格であるために、研究期間中に以下の禁止及び制限を遵守する意思があり、遵守することができなければならない。

1. 被験者は、スクリーニング前の3ヶ月、研究中、又は試験薬剤の最後の投与後の3ヶ月以内に、生ウイルスワクチン又は生菌ワクチンの接種を受けてはならない。

【0527】

2. 被験者は、スクリーニング前の12ヶ月、研究中、又は試験薬剤の最後の投与後の12ヶ月以内に、BCGワクチン接種を受けてはならない。

【0528】

3. 女子は、性的に活発で妊娠可能性がある場合は、研究中及び研究のLTE段階を含む最後の試験薬剤の投与後の6ヶ月間は、高度に有効な避妊方法を継続しなければならない。女子は、研究中及び研究のLTE段階を含む最後の試験薬剤の投与後の6ヶ月間は、生殖補助の目的で卵（卵子、卵母細胞）を提供してはならない。

【0529】

4. 男子は、妊娠可能性がある女子との性行為に活動的であり、精管切除を受けていない場合、研究中及び研究のLTE段階を含む最後の試験薬剤の投与後の6ヶ月間は、受胎調節の二重障壁法を使用しなければならない。男子は、研究中及び研究のLTE段階を含む最後の試験薬剤の投与後の6ヶ月間は精子を提供してはならず、妊娠又は子作りを計画しないことに同意しなければならない。

【0530】

5. pJIAの治療のためのコルチコステロイドの筋肉内投与は、研究の間は許可されない。pJIA以外の状態の治療のために気管支又は鼻吸入によって投与されるコルチコステロイドは、研究期間の全体を通じて必要に応じて投与されてもよい。更なる詳細については、セクション8を参照されたい。

【0531】

6. 被験者は、研究中、治験薬、他の免疫抑制剤（限定するものではないが、シクロホスファミドなど）、又はpJIAに対する他の生物製剤を服用してはならない。

【0532】

5. 治療割付及び盲検化

これは、非盲検試験である。全ての被験者は、ゴリムマブ $80\text{ mg}/\text{m}^2$ を、第0週目、第4週目、並びに第28週目まではq8w（±3日）、及び第244週目まではq8w（±1週間）で投与される。

【0533】

これは非盲検試験であるため、盲検手順は適用可能ではない。

【0534】

6. 投与量及び投与

6.1. ゴリムマブ

本研究は1つの能動的治療群を有し、全ての被験者は $80\text{ mg}/\text{m}^2$ （最大単回用量 240 mg ）のゴリムマブIV注入を、第0週目、第4週目、並びに第28週目まではq8w（±3日）、及びその後、第244週目まではq8w（±1週）で投与される。ゴリムマブ注入は、バイアル中のゴリムマブの $50\text{ mg}/4\text{ mL}$ 液と、0.9%生理食塩水の 100 mL 注入バッグを使用して、滅菌条件下で薬剤師によって調製される。被験者は、 $80\text{ mg}/\text{m}^2$ のゴリムマブIV注入を 30 ± 10 分かけて投与される。注入は、治験責任医師によって適切と見なされる場合、注入反応のエビデンスがあれば減速することができるが、注入速度の全ての変化は、CRFに記録しなければならない。体表面積を各来院時に計算し、ゴリムマブの用量を必要に応じて調整して用量を $80\text{ mg}/\text{m}^2$ に維持する。体表面積は、Mostellerの式： $BSA(\text{m}^2) = ([\text{身長}(\text{cm}) \times \text{体重}(\text{kg})] / 3600)^{1/2}$ を用いて計算される。更なる詳細については、治験実施施設IPマニュアル（Site IP Manual）を参照されたい。

【0535】

6.2. メトトレキサート

被験者は、市販のMTXを、研究組み入れの時点と同じBSAベースの用量（ $BSA < 1.67\text{ m}^2$ の被験者には1週当たり $10\sim30\text{ mg}/\text{m}^2$ 、又は $BSA \geq 1.67\text{ m}^2$ の被験者には少なくとも $15\text{ mg}/\text{週}$ ）で第28週目まで投与される。絶対用量は、第28週目までベースラインから安定した状態に維持されなければならない。

【0536】

MTXによる不耐性又はAEが発生しない限り、第28週目の来院まで被験者が同じMTXの用量及び投与経路を維持するようにあらゆる努力を払わなければならない（セクション8）。MTX毒性が生じた場合にMTXの用量を調整するガイドラインは、治験センターファイル（Trial Center File）に含まれる。

【0537】

被験者には、週1回、総用量 5 mg 以上の市販の葉酸又は週1回のMTX投与の翌日にフォリン酸（MTXの用量の半分）も投与する。12歳未満の小児では、葉酸又はフォリン酸の投与は、医師の判断による。

【0538】

第28週目の後、MTX投与の変更が許可される（例えば、用量の増加又は減少、投与経路の変更、又は中止）。

【0539】

7. 治療コンプライアンス

研究施設担当者は、割り付けられた治療が確実に遵守されるようにする。治験実施施設の担当者は、各来院時に試験注入を投与し、投与された注入量を記録する。

【0540】

全ての被験者は、治験依頼者によって指定された施設監視担当者によって監視される。これらのモニタリング来院の間、全ての手順はプロトコルを遵守しているかについて評価される。計画された時間帯（window）の外で投与された治療、並びに行われなかった来

10

20

30

40

50

院をCRFに記録する。被験者のチャートを見直し、CRFに以前入力されたデータと比較して正確性を担保する。

【0541】

8. 研究前及び併用療法

試験薬剤の最初の用量の前に投与される研究前JIA薬はスクリーニング時に記録されなければならない。全ての併用療法は、試験薬の最初の用量の投与から開始して研究全体を通じて記録されなければならない。

【0542】

試験薬とは異なる全ての療法（ワクチン、ビタミン、ハーブ栄養補助食品を含む処方薬又は市販薬、電気刺激及び鍼治療などの非薬理療法）は、CRFに記録されなければならない。記録される情報には、薬物の種類の説明、治療期間、投与レジメン、投与経路、及びその適応が含まれる。有効な既存の療法の改変は、被験者が研究に入る明示的な目的で行われるべきではない。

【0543】

コルチコステロイド又はNSAIDsを使用する場合、被験者には、組み入れ基準8及び9（セクション4.1）に従った研究組み入れの前に、これらの薬剤の安定な用量が投与されていなければならない。被験者は、除外基準12（セクション4.2）に従った研究組み入れの前に、TNF α を減少させることを目的とした2つ以下の治療薬で以前に治療されていてもよい。被験者は、除外基準1～20（セクション4.2）に概説されるような禁止された治療薬を開始していなくともよく、これにより治療されていなくともよい。

【0544】

被験者には、スクリーニング前の2ヶ月以上にわたってMTXが投与されていなければならない。BSA<1.67m²の被験者では、MTX用量は、1週当たり10～30mg/m²でなければならない。スクリーニング前の4週間以上にわたって安定でなければならない。BSA $\geq$ 1.67m²の被験者では、MTX用量は、最低15mg/週のMTXでなければならない。スクリーニング前の4週間以上にわたって安定でなければならない。この規則の例外については、組み入れ基準7を参照されたい。研究組み入れの時点でコルチコステロイドを投与している被験者（sJIAを有する者を除く）は、スクリーニング前の2週間以上にわたって安定な用量が投与されていなければならない。その用量は、10mg/日以下のプレドニゾン又はプレドニゾン等価物又は0.20mg/kg/日（いずれか低い方）でなければならない。全身性に発症したJIAを有するが3ヶ月以上の全身性症状のない被験者には、スクリーニング前の3日間にわたって安定したコルチコステロイドが投与されなければならない。全身症状を呈してはならない。NSAID療法を受けている場合、用量は、スクリーニング前の2週間以上にわたって安定していなければならない。

【0545】

バックグラウンド薬剤への変更が必要となる安全性の懸念（例えば、肝機能検査の上昇）がない限り、用量（例えば、10mg/日以下のプレドニゾン、又は0.20mg/kg/日以下のいずれか低い方）の増加又は減少及び／又は第0週目～第28週目の間の投与経路に関してバックグラウンド薬剤（すなわち、MTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及びNSAID）に変更を行ってはならない。第28週目の後、被験者は、投与量の増加若しくは減少、投与経路の変化、又はこれらのクラスの薬剤の中止を含む、MTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及びNSAIDの変更／追加を許可される。

【0546】

pJIAの治療のためのコルチコステロイドの筋肉内投与は、この研究中は許可されない。pJIA以外の状態の治療のために気管支又は鼻吸入によって投与されるコルチコステロイドは、研究期間の全体を通じて必要に応じて投与されてもよい。

【0547】

IVコルチコステロイドの使用を避けるためにあらゆる努力が払われなければならない。外科手術前の予防的療法（ストレス用量コルチコステロイド）又は限定的感染症、喘息の憎悪、若しくはpJIA以外の任意の状態の治療などの理由から、短期間（2週間以下

) の経口又は I V コルチコステロイドを必要とする被験者の場合、コルチコステロイド療法は、治療に当たる医師の意見に基づき、適切な代替治療がない状況に限定されるべきであり、C R F に文書化されなければならない。

【0548】

被験者は、第 5 2 週目までの研究中に、臨床的に必要とされる場合、コルチコステロイドの関節内注射を受けてもよい。しかしながら、関節内注射の回数は、任意の 2 4 週の期間で 2 回に制限されるべきである。すなわち、被験者が 2 回の関節内注射を受け、2 4 週間よりも長い時間が経過したならば、被験者は、別の 2 4 週の期間の間に最大 2 回の更なる関節内注射を受けてもよい。

【0549】

第 5 2 週目の後では、注射される関節の数は、2 4 週間当たり 2 回の注射に限定されない。治験依頼者には、禁止療法が投与されるいかなる事例も事前に（又はその後できるだけ早く）通知されなければならない（セクション 4. 3）。

【0550】

9. 研究の評価

9. 1. 研究の手順

9. 1. 1. 概論

「時間及びイベントスケジュール」に、この研究に適用可能な有効性、P K、免疫原性、及び安全性の測定の頻度及びタイミングを要約する（表、表 7 及び表）。全ての計画された研究来院は、第 2 8 週目までは予定された来院の前後 3 日以内、及び第 2 8 週目～第 2 4 4 週目までは前後 1 週間以内に行われなければならない。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、来院を予定に入れる前に連絡しなければならない。

【0551】

小児健康調査質問票（C H A Q）は、その来院に対して任意の試験、手順、又は他の相談前に実施されて、被験者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、P R O ユーザマニュアルを参照する。

【0552】

全ての計画されていなかった来院において、治験責任医師は以下の評価を行う。

- システムレビュー
- バイタルサイン
- T B 質問票
- 有害事象
- 併用薬物の検証
- 安全性検査評価

【0553】

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検査が実施されて、被験者の研究への参加中の任意の時点で妊娠がないことを確認することができる。

【0554】

研究のために各被験者から採取される全血量は、約 1 4 9 . 4 m L である（表 1）。反復又は計画されていなかった試料は、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てもよい。

【0555】

10

20

30

40

50

【表 10】

表1：第252週目までに各被験者から採取されるおよその血液の量

試料の種類	試料当たりのおよその容量 (mL)	被験者 当たりの 試料数	血液の およその 総容量 (mL) ^{a, b}
安全性(スクリーニング及び治療後評価を含む)			
ー血液学	1.2	17	20.4
ー血清化学	1.1	17	18.7
血清学(B型肝炎及びC型肝炎)	2.0	1	2.0
血清β-hCG妊娠検査	1.1	1	1.1
ーQuantiFERON(登録商標)(TBゴールド検査)	3.0	6	18.0
ーリウマチ因子	1.1	1	1.1
ー抗dsDNA抗体	1.1	11	12.1
ーARNA抗体	1.1	11	12.1
有効性(CRP)	1.1	24	26.4
PK及び免疫原性(ゴリムマブに対する抗体)	2.5	15	37.5
およその合計			149.4
a. 試料当たりの血液の量を乗じた試料の数として計算される。			
b. 安全上の理由で、又は試料に関する技術的問題のために、反復試料又は計画されていなかった試料を採取してもよい。			
注：血液試料採取に留置静脈内カニューレを使用してもよい。			
略語：ANA＝抗核抗体、β-hCG＝β-ヒト線毛性性腺刺激ホルモン、CRP＝C反応性タンパク質、dsDNA＝二本鎖デオキシリボ核酸、PK＝薬物動態、TB＝結核。			

【0556】

9.1.2. スクリーニング段階

書面によるインフォームドコンセント／同意が得られた後、かつ第0週目の前6週間の期間内に、被験者の適格性を確立する全てのスクリーニング評価が行われる。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被験者が、試験に組み入れられる。各被験者について、研究の「時間及びイベントスケジュール」を遵守するためにあらゆる努力が払われなければならない（表）。

【0557】

妊娠する可能性のある女子は、スクリーニング時に陰性の血清β-hCG妊娠検査、及び試験薬剤の各投与の前に陰性の尿妊娠検査を有さなければならない。性的に活発な被験者は、高度に効果的な避妊方法を使用し、研究期間中にわたって、及び試験薬剤の最後の投与後6ヶ月間にわたって避妊法の使用を継続することに同意しなければならない。各被験者によって使用される避妊法は、文書化されなければならない。

【0558】

被験者は、スクリーニング時にTBの検査を受けなければならない、被験者の病歴評価は、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。被験者は、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（セクション4.1）。

【0559】

QuantiFERON(登録商標)(TBゴールド検査)の陰性結果(及びQuantiFERON(登録商標)(TBゴールド検査)が承認／登録されていないか、又はツベルクリン皮膚試験が現地の保健機関によって義務付けられている国においては、ツベルクリン皮膚試験の陰性結果)を有する被験者は、スクリーニング手順を継続するのに適格である。新たに同定されたQuantiFERON(登録商標)ーTBゴールド(及び／又はツベルクリン皮膚検査)の結果の陽性結果を有する被験者は、活動性TBを除外するための評価を受け、潜在性TBに対する適切な治療を開始しなければならない。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、あるいは被験者は研究から除外される。

【0560】

最初のQuant i F E R O N（登録商標）（TBゴールド検査）結果が不明確である被験者は、試験を繰り返さなければならない。2回目のQuant i F E R O N（登録商標）（TBゴールド検査）の結果も不明確である場合、被験者は、活動性TBが除外され、胸部X線写真がTB（活動性又は古い、非活動性TB）を示唆する異常を示さず、被験者が治験責任医師によって判断されるTBの更なるリスク因子を有しない場合、潜在性TBの治療なしで組み入れることができる。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、被験者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。

【0561】

除外につながる異常スクリーニング値の再試験は、適格性を再評価するために、スクリーニング期間中に計画されていない来院を用いて1回のみ許可される。これは、被験者の安全性に予想される影響がない場合にのみ考慮されるべきである。

【0562】

9. 1. 3. 治療段階：第0週目～第28週目

第0週目に開始して、適格被験者は、第0週目、第4週目、及び第28週目まではq 8 w（±3日）で80mg/m²のゴリムマブをIV注入として30±10分間かけて投与される（セクション6.1）。被験者は更に、市販のMTXを研究組み入れの時点と同じBSAベースの用量で少なくとも第28週目まで週1回、及び市販の葉酸5mg以上を週1回またはフォリン酸（MTXの用量の半分）をMTX投与の翌日に投与される（セクション6.2）。12歳未満の小児では、葉酸又はフォリン酸の投与は、医師の判断による。

【0563】

被験者は、「時間及びイベントスケジュール」に従って安全性、有効性、PK、及び免疫原性の評価が行われる（表）。母集団PKの血清ゴリムマブ濃度の1つの追加の試料を、第0週目、第4週目、及び第8週目の来院時以外の第0週目～第8週目の任意の時点で全ての被験者から採取する。この試料は、試験薬剤投与の少なくとも24時間前又は後に採取されなければならない、定期計画された来院（例えば、第8週目）で採取してはならない。

【0564】

9. 1. 4. 治療段階：第28週目後～第52週目

第28週目の後、被験者は、第52週目までq 8 w（±1週）で80mg/m²のゴリムマブをIV注入として30±10分間かけて引き続き投与される（セクション6.1）。被験者はまた、市販のMTXを研究組み入れの時点と同じBSAベースの用量で週1回、及び市販の葉酸5mg以上を週1回または投与される場合にはフォリン酸をMTX投与の翌日に投与されてもよい（MTXの用量の半分；セクション6.2）が、第28週目の後はMTX、他のDMARD、コルチコステロイド、及び／又はNSAIDの増加、減少又は中断が許容される。これらの薬剤の全ての変更及び変更の理由は、eCRFに文書化されなければならない。

【0565】

被験者は、「時間及びイベントスケジュール」に従って安全性、有効性、PK、及び免疫原性の評価が行われる（表）。

【0566】

治療の終了／早期離脱

被験者が、第52週目の前に試験薬剤を中止する場合、被験者は、試験薬剤の最後の投与の約8週間後に最終的な安全性フォローアップ来院のために戻らなければならない（セクション10.2）。被験者が、第52週目の前に研究参加から離脱する場合、被験者の同意の撤回の前に治療終了時の評価を得るためにあらゆる努力が払われなければならない。

【0567】

9. 1. 5. 長期延長段階：第52週目の後～第252週目

第52週目の来院後に長期延長に入った被験者は、第244週目まで80mg/m²の

10

20

30

40

50

ゴリムマブをIV注入としてq 8 w (±1週)で30±10分間かけて引き続き投与される。

【0568】

被験者は、「時間及びイベントスケジュール」に従って安全性、有効性、PK、及び免疫原性の評価が行われる(表7及び表)。同意を撤回することなく、第244週目の前に試験薬剤の投与を中止した被験者は、最後の試験薬注入の約8週間後に最終的な安全性フォローアップ来院のために戻らなければならない(セクション10.2)。

【0569】

被験者は、TBの兆候及び症状について引き続き評価されなければならない(セクション9.4)。

【0570】

9.2. 有効性

9.2.1. 評価

「時間及びイベントスケジュール」に、この研究に適用可能な有効性測定の頻度及びタイミングを要約する(表、表7及び表)。

【0571】

9.2.1.1. 関節の評価

標準的なPRINTO/PRCSG関節評価法に従って、75個の関節のそれぞれを圧痛について評価し、68個の関節を腫脹及び疼痛、並びに運動制限について評価する。関節評価の実施に少なくとも1年の経験を有する一貫した関節評価者が各試験センターにおいて指定され、全ての関節評価を行う。

【0572】

被験者組み入れの開始前に各治験実施施設から1名の一貫した関節評価者に訓練が行われるが、この訓練は、治験実施施設の関節評価者がPRINTO又はPRCSGによって提供される認定訓練を受けていない場合には必須である。以前の臨床研究において一貫した関節評価者が治験依頼者によって訓練されている場合、関節評価者はこの訓練を免除されてもよい。治験依頼者又はPRINTO/PRCSGトレーニングの文書は、治験センターのファイルに維持される。可能であれば、研究の一貫した関節評価者は、研究に変更されるべきではない。しかしながら、治験依頼者によって提供される、一貫した関節評価者の訓練トレーニングに参加した各治験実施施設からの評価者は、評価者の欠席時に代わりを務めるための1名の追加の評価者を訓練することができる。

【0573】

訓練される追加の一貫した関節評価者も、関節評価者として1年以上の経験を有するか、又は治験依頼者によって承認されていることが期待される。治験実施施設から指定された一貫した関節評価者が治験実施施設の追加の評価者を訓練する場合、訓練を文書化した書面を治験実施施設の治験センターファイルに保管しなければならない。更に、治験実施施設において複数人の一貫した関節評価者が研究中に関節評価を実施する場合、各来院においてその治験実施施設で関節評価を実施する全ての一貫した関節評価者の氏名を治験センターファイルに記載し、ソースドキュメントに文書化しなければならない。

【0574】

被験者のベースライン関節評価を実施する一貫した関節評価者が、第244週目の最後の有効性評価までの全ての後続の来院におけるその被験者の関節評価も実施することが好ましい。

【0575】

評価不能な関節

臨床診療においては過去に、又は研究参加中に外科的に改変された(すなわち、プロテーゼ配置)、又は医学的に治療された(すなわち、関節内注射)関節を「評価不能」と特定することは妥当かもしれないが、本試験の目的における「評価不能」の指定は若干異なる。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(すなわち、ギプスによってアクセス不可能な関節、切断により存在しない関節、アクセスが不可能であるよ

10

20

30

40

50

うに変形した関節)、一貫した関節評価者によってePRO装置において「評価不可能」として指定されるべきである。

【0576】

9.2.1.2. 米国リウマチ学会応答

JIA ACR30 応答基準⁵は、以下の6つの項目のうちの少なくとも3つにおけるベースラインからの30%の改善(すなわち、スコアの減少)、及び以下の項目のうちの1つ以下における30%以上の悪化として定義される。

- 医師による疾患活動性の全般的評価
- 全体的な健康状態の親／被験者による評価
- 活動性関節の数(腫脹、又は腫脹がない場合には、運動痛又は圧痛を伴う可動域の制限として定義される)

10

- 可動域が制限された関節の数

- CHAQによる物理的機能

- CRP

【0577】

JIA ACR50 応答、JIA ACR70 応答、及びJIA ACR90 応答は、上記の6つの項目の少なくとも3つにおけるベースラインからのそれぞれ50%の改善、70%の改善、及び90%の改善、及び上記の項目のうちの1つ以下における30%以上の悪化として定義される。

20

【0578】

非活動性疾患

非活動性疾患は、以下の全ての存在によって示される。

- 活動性関節炎を有する関節がない
- JIAに起因する発熱、発疹、漿膜炎、脾腫、肝肥大、又は全身性リンパ節疾患がない
- 活動性ブドウ膜炎なし
- 正常なCRP(基礎炎症性疾患を有さない被験者では0.287mg/dL以下)
- 医師による活動性疾患を示さない疾患活動性の全般的評価(5mm未満)
- 朝のこわばりの持続時間が15分間未満

【0579】

JIA薬剤投与中の臨床的寛解

JIA薬剤投与中の臨床的寛解は、薬剤投与中の6ヶ月以上の期間にわたる各来院における非活動性疾患として定義される。

30

【0580】

9.2.1.3. 医師による疾患活動性の全般的評価

医師による疾患活動性の全般的評価は100mmVASである。医師は、患者の現在の関節炎活動を評価したVASを記入しなければならない。スケールのアンカーは、「関節炎活性がない」～「極めて活動的な関節炎」である。スコアが低いほど疾患活性が低いことを示す。小児の評価のための変数のコアセットにこの尺度を含めるためのプロセスは、文献に記載されている⁵。

【0581】

9.2.1.4. 小児健康調査質問票

被験者の機能状態のCHAQによる評価を行う²¹。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)における作業を行ううえで被験者が有する困難の程度を評価するために、親／被験者がこの質問票を記入する。各機能領域における応答は、0(困難を伴わない)、1(いくらかの困難を伴う)、2(大きな困難を伴う)、3(作業を行えない)、又は4(該当せず)としてスコア付けされる。より低いスコアは、特定の機能領域における改善された機能及び作業成果を示す。

40

【0582】

更に、CHAQは2つのVAS質問を含み、1つが被験者の痛みのレベルを評価するために使用され、1つが被験者の全体的な健康状態を評価するために使用される。CHAQ

50

の特性は評価されており、その有効性は検証されている^{2 1}。CHAQは疾患の変化に
 答性を示すことが示されている^{2 1}。0.188の減少が、有意な臨床的改善であるとさ
 れている¹。

【0583】

親／被験者による痛みの評価

痛みは、「痛みなし」（0mm）～「非常に重度の痛み」（100mm）までの範囲の
 VASスケールを使用して、前の週において被験者が経験した平均の痛みとして評価され
 る。この評価は、圧痛及び膨潤した関節検査の前に、親（介護者）／被験者によって記入
 されなければならない。

【0584】

全体的な健康状態の親／被験者による評価

全体的な健康状態の親／被験者による評価は、0～100mm VASである。親／被
 験者は、関節炎が子供／自身に及ぼすあらゆる影響を検討し、次いで被験者の健康状態を
 示すことを求めるVASを記入する。スケールのアンカーは、「非常によい」（0mm）
 ～「非常に悪い」（100mm）である。スコアが低いほど、健康状態がより良いことを
 示す。小児の評価のための変数のコアセットにこの尺度を含めるためのプロセスは、文献
 に記載されている⁵。

【0585】

研究組み入れ時に15歳～18歳未満の被験者は、親／介護者と一緒にCHAQを記入
 してもよい。好ましくは、試験開始時の評価を記入するのと同じ人（例えば、親、介護人
 、又は被験者）が試験全体を通じて評価を記入するべきである。

【0586】

9.2.1.5. C反応性タンパク質

C反応性タンパク質は、pJIAを有する患者における炎症のマーカーとして有用であ
 ることが示されており、JIA ACR30コア評価の一部となっている。C反応性タン
 パク質は、検証済みの高感度CRPアッセイを使用して中央検査機関によってアッセイさ
 れる。

【0587】

9.2.1.6. 若年性関節炎疾患活動性スコア（JADAS）

近年、pJIAの複合的疾患活動性スコアとして、若年性関節炎疾患活動性スコア（J
 uvenile Arthritis Disease Activity Score；
 JADAS）が開発された。検証分析においてJADASは、疾患転帰を予測する能力を
 含む、良好な計測特性を有することが見出された。JADAS（CRPを使用するために
 改変された）は、以下の変数を評価することによって計算される。すなわち、（1）10
 0mmの水平VAS上で測定される、医師による疾患活動性の全般的評価（いずれもVAS
 で0＝活動性なし、100＝最大活動性）。（2）21個の数字が付けられた円及び1
 00ミリメートルの水平線の視覚的アナログスケール⁴で測定される健康状態及び痛みの
 親／子供による評価、（3）71、27、又は10個の関節で評価される活動性関節の数
 （それぞれJADAS71、JADAS27、及びJADAS10）、及び、（4）CR
 Pは、JADAS－ESRで使用される切り捨てESRと同様、次式：（CRP [mg／
 L]－10／10）に従って0スケールに切り捨てた。計算に先立ち、10mg／L未満
 のCRP値を10に変換し、110mg／Lよりも大きいCRP値を110に変換する^{1 3}
 。

【0588】

JADASは4つの項目のスコアの合計として計算され、JADAS71、及びJAD
 AS27、及びJADAS10について、それぞれ0～101、0～57、及び0～40
 の全般スコアを与える。

【0589】

JADAS10、27、及び71最少疾患活動性の状態^{2、11}を、以下の全てが存在す
 るものとして定義した。すなわち、多発性関節炎を患う患者において、医師による疾患活

10

20

30

40

50

動性の全般的評価 ≤ 3.5 、親による健康状態の全般的評価 ≤ 2.5 、及び腫脹関節数 ≤ 1 。

【0590】

JADAS非活動性疾患の基準は、合計JADASスコアが1以下として定義される。

【0591】

9.2.2. エンドポイント

一次エンドポイント

本試験における一次エンドポイントは、第28週目のPK曝露（第28週目におけるトラフ濃度）及び8週間の1回投与間隔にわたる定常状態のベイズ法によるAUCss（母集団のPKモデリング及びシミュレーションから）である。

【0592】

主要二次エンドポイント

主要二次エンドポイントは以下を含む。

第52週目のPK曝露（第52週目におけるトラフ濃度）及び第52週目のベイズ法によるAUCss（母集団のPKモデリング及びシミュレーションから）。

【0593】

他のエンドポイント

他のエンドポイントは以下を含む。

- JIA ACR30、50、70、及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- CHAQのベースラインからの経時的変化
- 経時的なCRP濃度
- 非活動性疾患を有する被験者の経時的割合
- PJIAに対する薬剤を投与中の臨床的寛解にある被験者の経時的割合
- 各来院時に設定されたPJIAコアのベースラインからの改善
- 第52週目までの疾患サブタイプ及び／又は年齢によるJIA ACR30、50、70及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- JADAS10、27、及び71のベースラインからの経時的変化
- JADAS10、27、及び71最小疾患活動性を経時的に達成する被験者の割合

【0594】

9.3. 薬物動態及び免疫原性

9.3.1. 評価

血清試料を使用してゴリムマブのPK、並びに免疫原性（ゴリムマブに対する抗体）を評価する。静脈血液試料を採取し、各血清試料を3つのアリコートに分割する（薬物動態、試験薬に対する抗体、及びバックアップに各1つつ）。被験者の機密は保持される。試料は、IVラインとは異なる腕から抜き取るか、あるいは薬剤投与に使用されるものと同じIVラインを使用する場合には、ラインをフラッシュして各PK試料を抜き取る前に残留している可能性のある残留薬剤を除去しなければならない。PK試料を抜き取るためにIVラインを使用する場合、試料を得る前に最初の1mLの血液を抜き取って廃棄するべきである。静脈内ラインのメンテナンスは、標準的なケアに従って行われなければならない。血清濃度及びゴリムマブに対する抗体が評価される各来院において、十分な量の1回分の採血を使用することができる。

【0595】

9.3.2. 分析手順

薬物動態

治験依頼者により、又は治験依頼者の監督下で、検証済みの特異的かつ高感度の方法を用いて血清試料を分析してゴリムマブの濃度を決定する。

【0596】

免疫原性

治験依頼者により、又は治験依頼者の監督下で検証済みのアッセイ法を用いてゴリムマブに対する抗体の検出及び特性決定を行う。ゴリムマブに対する抗体を検出するために採

10

20

30

40

50

取された全ての試料をゴリムマブの血清濃度についても評価することで抗体データの解釈が可能となる。

【0597】

9.3.3. 薬物動態パラメータ

血清ゴリムマブ濃度を、第0、4、8、12、20、28、52、100、148、196及び244週目に評価し、経時的に要約する。

【0598】

注入前（注入直前）及び注入後（注入の1時間後）試料を、第0週目、第4週目、及び第12週目に採取し、追加の無作為母集団PK試料を、第0週目、第4週目、及び第8週目の来院時以外の第0週目～第8週目の任意の時点で採取し、試験薬剤投与の少なくとも24時間前又は後に採取する。残りの来院のそれぞれでは、血清ゴリムマブの試料を1つのみ採取するが、これはその来院で試験薬剤の注入が投与される場合には注入の直前に採取されなければならない。注入後試料は、IV注入ラインとは異なる腕から抜き取るか、あるいは薬剤投与に使用されたものと同じアクセスラインを使用する場合には、IV注入ラインをフラッシュして残留している可能性のある残留薬剤を除去し、試料を得る前に1mLの血液を引き込んでから捨てる必要がある。

【0599】

第28週目までのデータを用いて母集団のPK分析を行ってゴリムマブのPKを特徴付けるとともに、pJIAを有する小児集団におけるPKの重要な共変数を特定する。更に、母集団PKモデルを使用して、小児及び成人におけるPKの類似性を評価する。クリアランス及び分布容積は、NONMEMアプローチを用いて推定される。更に、曝露応答分析を行って曝露量と有効性との間の関係を調査し特徴付ける。

【0600】

9.3.4. 免疫原性評価（ゴリムマブに対する抗体）

ゴリムマブに対する抗体を、「時間及びイベントスケジュール」に従って（すなわち、第0、第4、第8、第12、第28、第52、第100、第148、第196週目及び第244週目に）全ての被験者から採取した血清試料で評価する。更に、血液試料はまた、治療を中止するか、又は研究から離脱した被験者からも最終来院時に採取する必要がある。これらの試料は、治験依頼者又は治験依頼者の指定担当者により検査される。

【0601】

血清試料は、ゴリムマブに結合する抗体についてスクリーニングされ、確認された陽性試料の力価を報告する。他の分析を行って、ゴリムマブに対する抗体の安定性を検証し、及び／又は、ゴリムマブの免疫原性を更に特徴付けることができる。

【0602】

研究中のゴリムマブに対する抗体の生成率を決定する。

【0603】

9.4. 安全性の評価

研究中に発生するあらゆる臨床に関連する変化は、CRFの有害事象のセクションに記録されなければならない。

【0604】

研究の最後に／早期離脱時に持続しているあらゆる臨床上の有意な異常は、解決まで又は臨床安定したエンドポイントに達するまで、治験責任医師によってフォローされる。

【0605】

本研究は、「時間及びイベントスケジュール」に示される時点に従って、安全性及び忍容性の以下の評価を含む。

【0606】

有害事象

有害事象は、研究の持続期間にわたって、被験者（又は、適切な場合、介護人、代理人、又は被験者の法的に認められる代表者）によって報告される。有害事象は、セクション12、「有害事象の報告」に指定されるように、治験責任医師によってフォローされる。

【0607】

臨床検査

血清化学検査及び血液学用の血液試料を収集する。治験責任医師は、検査報告を検討し、この検討内容を文書化し、研究の間に生じたあらゆる臨床的に関連する変化をCRFの有害事象のセクションに記録しなければならない。検査報告は、ソースドキュメントと共に提出しなければならない。

【0608】

以下の検査が各中央検査機関によって行われる。

【0609】

【表11】

●血液学パネル

－ヘモグロビン

－ヘマトクリット値

－RBC

－平均赤血球ヘモグロビン量

－RBC形態

－WBC(好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球[%、絶対])

－血小板数

－平均赤血球容積

－平均赤血球ヘモグロビン濃度

－WBC形態(存在する場合)

●血清化学的パネル

－ナトリウム

－カリウム

－尿素窒素

－クレアチニン

－グルコース

－AST

－ALT

－アルカリホスファターゼ

－重炭酸塩

－総ビリルビン

－ビリルビン(直接及び間接)

－カルシウム

－リン

－アルブミン

－総タンパク質

－尿酸

－塩化物

●妊娠可能性を有する女子の血清妊娠検査をスクリーニング時に行う。

●妊娠可能性を有する女子の尿妊娠検査を「時間及びイベントスケジュール」に従って行う。

●治験責任医師によって必要と判断されるか、又は現地規制によって求められる場合、追加の血清又は尿妊娠検査を行って研究全体を通じて妊娠がないことを確認することができる。

●スクリーニング時のB型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎表面抗体(抗HBs)、及びB型肝炎コア抗体(全抗HBc)の血清学。

●スクリーニング時のHCV抗体の血清学。

【0610】

バイタルサイン

脈拍/心拍数、呼吸数、温度、及び血圧測定を、「時間及びイベントスケジュール」に従って行う(表、表7、及び表)。

【0611】

バイタルサインは、注入前、15分及び30分(注入中、15分間隔)、並びに60分及び90分(注入後の1時間の観察期間中)に測定されなければならない。

【0612】

身体検査

毎回の身体検査における皮膚検査及び性成熟度についての少なくとも6ヶ月毎のタナー分類を含む身体検査を、「時間及びイベントスケジュール」に従って実施する。システムレビューを全ての来院で実施して新たな症状を評価し、必要に応じて治験責任医師の判断で完全な身体検査を行ってもよい。研究終了時に持続しているあらゆる临床上重要な異常は、解消まで又は临床上安定したエンドポイントに達するまで、治験責任医師によってフォローされる。

10

20

30

40

50

【0613】

身長及び体重

スクリーニング時、並びに「時間及びイベントスケジュール」で指定された全ての時点で身長を測定する。体重は、各体重測定で較正されたスケールを使用して、「時間及びイベントスケジュール」で指定された時点で測定される。被験者は、靴並びに屋外用衣類及び装具を外すよう指示される。

【0614】

ブドウ膜炎の評価

全ての被験者は、スクリーニング時に、及びその後は少なくとも6ヶ月毎に、身体検査及び面談に基づいて治験責任医師により新たに発症したブドウ膜炎について評価される。これは、眼の充血、光感受性、視力の変化、及び飛蚊症を含むがこれらに限定されないブドウ膜炎の兆候及び症状の評価からなる。臨床標準の変化に基づいて、検査をより頻回に行うことができる。

10

【0615】

加えて、全ての被験者は、指定の間隔（JIAのサブタイプ、ANAの検査結果、JIA発症時の年齢、及びJIAの期間に基づく）で研究中に眼科医／検眼医によって実施される細隙灯評価を行うことが求められる。

【0616】

被験者が研究中にブドウ膜炎を発症した場合、被験者の研究への継続的な参加は、治験責任医師及び治験依頼者の判断による。

20

【0617】

注入反応の評価

注入が開始される前に、適切な担当者、薬剤（例えば、エピネフリン、吸入型β-アゴニスト、抗ヒスタミン剤、及びコルチコステロイド）、及びアナフィラキシーを治療するための他の要件が提供されなければならない。被験者は、治験責任医師の判断に基づいて注入を開始する前に予防薬（例えば、ジフェンヒドラミン）を予め投与することができるが、これは必須ではない。しかしながら、予防用のコルチコステロイドは許容されない。前投薬はeCRFに記録しなければならない。

【0618】

治験責任医師又は有資格の被指名者が「時間及びイベントスケジュール」に従って注入反応について被験者を評価する。

30

【0619】

注入反応は、注入中、又は注入の完了の1時間以内に生じる、なんらかの好ましくない又は意図されない徴候である。全ての被験者は、注入反応の症状について慎重に観察されなければならない。被験者は、注入反応の症状について試験薬剤のIV投与の完了後、少なくとも60分間観察される。注入反応が観察された場合、被験者は治験責任医師の判断で治療されなければならない。

【0620】

治験責任医師は、AEページに注入反応を記録する。注入反応が観察されない場合、治験責任医師はそのことを被験者の医療記録（ソースデータ）に記載する。

40

【0621】

アレルギー反応

研究の全体を通じて、全ての被験者は、注入の完了後少なくとも60分間にわたって、アレルギー反応（例えば、じん麻疹、痒み、発疹）の症状について慎重に観察されなければならない。軽度又は中度のアレルギー反応が観察された場合、承認された小児用量でアセトアミノフェン又はNSAID及びジフェンヒドラミンを投与することができる。

【0622】

喘鳴及び／又は呼吸困難を伴う気管支痙攣を引き起こし、補助換気を必要とする注入後の重度の反応、又は40mm水銀（Hg）よりも大きい収縮期血圧の低下を伴う症候性低血圧を有する被験者は、追加の試験薬剤の注入を投与することは許可されない。かかる反

50

応の場合、適切な医療処置を投与する必要がある。

【0623】

活動性結核の早期検出

研究参加中のTB、再活性化又は新規TB感染の早期検出を助けるため、被験者は、計画された来院時（「時間及びイベントスケジュール」を参照）に、又は約8～12週間毎に電話連絡によって、活動性TBの徴候及び症状について評価されなくてはならない。評価において使用するために、以下の一連の質問が提案される。

●「あなたの子供に14日より長い期間の新たな咳、又は慢性的な咳の変化がありましたか？」

●「あなたの子供は以下のいずれかの症状を有していましたか？」、すなわち

－持続する熱？

－意図的でない体重減少？

－寝汗？

●「あなたの子供は活動性TBを有する個人と密接な接触をしましたか？」（接触が「密接」と見なされるべきかに関して不確実性が存在する場合、TB専門医に相談すべきである）。

【0624】

評価により、被験者がTBの再活性化又は新たなTB感染を有する疑いが生じた場合、試験薬剤の投与を中断しなければならず、可能な場合はTB専門医への相談を含む速やかな徹底した調査が行われるべきである。

【0625】

治験責任医師は、免疫不全を有する被験者におけるTBの再活性化は、播腫性疾患として、又は肺外特徴（extrapulmonary features）を伴って発現することがあると認識するべきである。活動性TBのエビデンスを有する被験者は、試験薬剤を直ちに中止しなければならず、適切な治療を仰がなければならない。

【0626】

年に1回のQuantiferon（登録商標）-TBゴールド検査（及びツベルクリン皮膚検査）は、潜在性TBの履歴、及び潜在性TBの進行中の治療、又はTBの適切な治療を完了したことの文書を有する被験者では求められない。

【0627】

研究の実施中に活動性TBを有する個人と密接に接触した経験を有する被験者は、被験者が活動性TBを発症するリスクを判定し、潜在性TBの治療が正当であるかどうかを判定するために、反復胸部X線検査、反復Quantiferon（登録商標）（TBゴールド検査）、Quantiferon（登録商標）（TBゴールド検査）が承認／登録されていない国においては反復ツベルクリン皮膚試験、及び、可能であれば、TB専門医への紹介を行わなければならない。Quantiferon（登録商標）（TBゴールド検査）（及びツベルクリン皮膚検査）は、潜在性TBの病歴、及び潜在性TBの進行中の治療、又はTBの適切な治療を完了したことの文書を有する被験者では反復される必要はない。Quantiferon（登録商標）（TBゴールド検査）の結果が不明確である場合、試験は、セクション9.1.2に概説されるように反復されなければならない。被験者は、プロトコルに従って計画された全ての後続の研究来院のために戻ることを奨励されなければならない。

【0628】

9.5. 試料の採取及び取り扱い

試料採取の正確な日付及び時間は、CRF又は検査請求フォームに記録されなければならない。

【0629】

全ての試料採取のタイミング及び頻度については「時間及び事象のスケジュール」を参照されたい。

【0630】

試料の採取、取り扱い、保管及び輸送に関する指示は、提供される検査室マニュアルに示される。試料の採取、取り扱い、保管、及び輸送は、検査室マニュアルに示されるように、指定された、また適用可能な場合には、制御された温度条件下で行われなければならない。

【0631】

10. 被験者の完了／離脱

10.1. 完了

被験者は、第52週目の評価を完了した場合に主研究を完了したものとみなされる。被験者は、第252週目の評価を完了した場合に長期延長を完了したものとみなされる。

【0632】

10.2. 試験治療の中止

被験者の試験治療が治療レジメンの終了前に中止されなければならない場合、これは、研究からの被験者の自動的な離脱につながらない。

【0633】

以下のいずれかが生じる場合、被験者の試験治療は、永続的に中止されなければならない。

● 治験責任医師が、安全性の理由（例えば、有害事象）で、試験治療を中止することが被験者の最良の利益であると考える。

● 被験者が妊娠した。

● 喘鳴、及び／又は補助換気を必要とする呼吸困難、及び／又は試験薬剤投与後に生じる症候性低血圧を伴う、及び伴わない、気管支痙攣を引き起こす反応（新たに発症する試験薬剤関連及び既存のぜんそくの深刻な憎悪の両方）。

● 試験薬剤の注入の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、じん麻疹、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。

● 悪性腫瘍。

● 被験者が、治験中の任意の時点でうっ血性心不全を発症する。

● 脱髄疾患。

● 被験者が、試験薬剤の投与についての同意を撤回する。

● プロトコルで禁止された薬剤の開始。

● 被験者が、以下のTBスクリーニング基準に従って不適格であるとみなされる。

－ 活動性TBの診断がなされる。

－ 被験者が、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を有する人との密接な接触が最近あり、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。

－ 評価が行われる被験者が、活動性TBが除外され得、潜在性TBの適切な治療が、試験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のエビデンスを示す胸部X線写真、及び／又は陽性のQuantiferon（登録商標）（TBゴールド）検査結果（及び／又はQuantiferon（登録商標）（TBゴールド）検査）が承認／登録されていないか、若しくはツベルクリン皮膚検査が現地の保健機関によって義務付けられている国では陽性のツベルクリン皮膚検査の結果）を有する。不確定のQuantiferon（登録商標）（TBゴールド）検査の結果は、セクション9.1.2と同様に扱われなければならない。活動性TBが除外され、その胸部X線写真がTB（活動性又は古い、非活動性TB）を示唆する異常を示しておらず、被験者が治験責任医師によって判定されるTBの更なる危険因子を有しない場合、継続的に不確定なQuantiferon（登録商標）（TBゴールド）検査の結果を有する被験者は、潜在性TBの治療を受けずに継続することができる。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、被験者のソースドキュメントに記録され、治験責任医師によ

10

20

30

40

50

て頭文字で略式署名されなければならない。

－潜在性TBの治療を受けている被験者は、この治療を早期に中断するか、又は療法に不適合である。

研究中に試験薬剤の注入を中止した全ての被験者は、最後の注入が投与された後、約8週間フォローされる。

【0634】

注：最後の試験薬剤の注入の約8週間後の来院は、「最終的な安全性フォローアップ来院」と呼ばれ、計画された又は計画されていなかった来院で行われ得る。

【0635】

試験薬剤の注入を中止するが、研究参加を終了しない被験者は、最終的な安全性フォローアップ来院において以下の評価が行われる。

●安全性評価（バイタルサイン、システムレビュー、AEの検証、TBの評価、ブドウ膜炎の評価、及び日常検査分析のための血液試料の採取、及びANA／抗二本鎖デオキシリボ核酸（dsDNA）抗体及びゴリムマブに対する抗体の存在の判定）。

●併用薬の検証。

●有効性の評価（関節評価、JIA評価、及びCRP用血液試料の採取）。

●最終的な安全性フォローアップ来院において、全ての被験者についてゴリムマブ濃度を測定するために採血された血液試料。

【0636】

研究の終了前に被験者が試験治療を中止した場合、試験薬剤の最後の注入の約8週間後に評価を行わなければならない。

【0637】

10.3. 試験からの離脱

以下の理由のいずれかの場合、被験者は試験から離脱させられる。

●フォローアップ不能

●同意の撤回

●死亡

【0638】

被験者が研究の終了前に試験治療を中止した場合、試験薬剤の最後の注入の約8週間後に最終的な安全性フォローアップ来院において治療終了時の評価を得なければならない。

【0639】

被験者がフォローアップ不能となった場合、被験者に接触し、中止／離脱の理由を決定するために、研究施設担当者によってあらゆる合理的な努力が行われなければならない。フォローアップのために取られた措置は文書化されなければならない。

【0640】

被験者が研究を完了する前に離脱する場合、離脱の理由をCRF及びソースドキュメントに文書化する。中止した被験者に割り当てられた試験薬は、別の被験者に割り当てられなくてもよい。離脱する被験者は交代されない。

【0641】

研究の終了前に被験者が研究から離脱する場合、同意の撤回前に治療終了時の評価を得なければならない。

【0642】

11. 統計的方法

統計解析は、治験依頼者によって、又は治験依頼者の権限のもとで行われる。効力及び安全性データを分析するために使用される統計的方法の一般的な記述が、下記に示される。統計解析計画には、具体的な詳細が提供される。

【0643】

概して、連続変数の平均、中央値、標準偏差、四分位内範囲、最小値及び最大値などの記述統計、並びにカテゴリー変数の数及び割合を使用してデータを要約する。

【0644】

10

20

30

40

50

11.1. 被験者情報

研究に組み入れられる全ての被験者について、ベースライン記述統計が提供される。

【0645】

被験者のベースラインデータ、人口統計学及びベースライン疾患特性を要約する。ベースライン測定値は、第0週目の試験薬剤投与の時点の前に測定された最も近い測定値として定義される。

【0646】

人口統計学及び被験者のベースライン疾患特性及び以前の服薬データを、試験薬剤が投与されているか否かに関わらず、研究に組み入れられた全ての被験者について要約する。試験薬剤の少なくとも1回の投与を受けた全の被験者について薬物動態データを要約する。特に指定されない限り、有効性分析を、研究に組み入れられた全ての被験者について要約する。安全性評価を、治療を行った全ての被験者について要約する。

【0647】

11.2. 試料サイズの決定

試料サイズは、統計的考慮事項に基づくものではない。この試験の試料サイズを決定する目的で、小児集団におけるPKの変動を考慮した。目標は、母集団PKを構築するのに十分であり、かつ実行可能であれば、曝露応答モデルを構築するのに十分な試料サイズを得ることである。更に、妥当な安全性評価を与える試料サイズも考慮した。これらの考慮事項により、20人の被験者が脱落するか又はPK試料を与えなかった場合に、PK時点の疎なサンプリングを考慮すると、約100人の被験者の試料サイズが母集団PKモデルを構築するのに十分であり、約100人の被験者から1年間の安全性データを得るのに十分であると考えられるという仮定の下で約120人の被験者の試料サイズが選択された。

【0648】

11.3. 有効性分析

主要エンドポイント分析

一次有効性エンドポイント分析は計画されていない。

【0649】

主要二次エンドポイント分析

主要二次有効性エンドポイント分析は計画されていない。

【0650】

他の有効性エンドポイント

研究に組み入れられた全ての被験者について以下を要約する。

- JIA ACR30、50、70、及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- 非活動性疾患を有する被験者の経時的割合
- PJIA（ACR基準）に対する薬剤を投与中の臨床的寛解にある被験者の経時的割合
- 設定されたPJIAコアのベースラインからの経時的改善
- 第52週目までの疾患サブタイプ及び／又は年齢によるJIA ACR30、50、70及び90レスポnderである被験者の経時的割合
- CHAQのベースラインからの経時的変化
- 経時的なCRP濃度
- JADAS10、27、及び71のベースラインからの経時的変化
- JADAS10、27、及び71最小疾患活動性を経時的に達成する被験者の割合

【0651】

11.4. 薬物動態の分析

本試験の主要目的は、PJIA集団におけるゴリムマブPK曝露（第28週目のトラフ濃度及び母集団のPKモデリング及びシミュレーションからの8週間の投与間隔にわたるベイズ法によるAUCss）を特徴付けることである。

【0652】

血清ゴリムマブ濃度を経時的に要約する。更に、第28週目までのデータに対する母集団のPK分析を行ってゴリムマブのPKを特徴付けるとともに、PJIAを有する小児集

団におけるPKの重要な共変数を特定及び定量化する。クリアランス及び分布容積は、NONMEMアプローチを用いて推定される。詳細は、母集団PK分析計画に提供され、分析の結果は別の報告書に提示される。

【0653】

PK曝露の測定を、IVゴリムマブの投与後の小児集団においてグラフで評価し（定常状態の C_{max} 、 C_{min} 、及びAUCを含むがこれらに限定されない）、CNT0148ART3001の成人からのPK曝露と比較する。小児被験者と成人被験者との間の類似性を、観察された濃度の記述統計に加えて、目視検査による母集団PKモデリングからの箱ひげ図の生成によって評価する。

【0654】

要約第52週目まで及びLTEを通じてゴリムマブ濃度を要約し、PK曝露を評価する。

【0655】

11.5. 免疫原性の分析

ゴリムマブが投与され、ゴリムマブに対する抗体を検出するために適当な試料を採取した全ての被験者（すなわち、最初のゴリムマブ投与後に少なくとも1つの試料を採取した被験者）について、試験中のゴリムマブに対する抗体の生成及び力価を経時的に要約する。

【0656】

11.6. 薬物動態／薬力学分析

血清ゴリムマブ濃度と有効性との関係を調べる。適当なPK／PDモデルを調査し、曝露応答関係を記述するために開発する。

【0657】

11.7. 安全性分析

有害事象

治験責任医師によりCRFで有害事象を特定するために使用される用語は、医薬規制用語集（MedDRA）を使用して逐語的にコード化される。治療段階中の発症を伴う全ての報告された有害事象（すなわち、治療段階中に発生した有害事象、及びベースラインから悪化した有害事象）は、分析に含まれる。各有害事象について、特定の事象の少なくとも1回の発生があった被験者の割合を治療群ごとに要約する。

【0658】

有害事象のために死亡した、治療を中止した、又は重度若しくは重篤な有害事象を有した被験者の要約、リスト、データセット、又は被験者のナラティブが適宜与えられてもよい。

【0659】

以下の分析を使用してこの治験の被験者の安全性を評価する。

- AEの発生及び種類
- SAEの発生及び種類
- 相応に関連するAEの発生及び種類
- 注入反応の発生
- ANA及び抗dsDNA抗体の発生
- ゴリムマブに対する抗体の発生
- 著しく異常な検査（血液学的及び化学的）パラメータの発生

【0660】

臨床検査

臨床検査の種類ごとに検査データをまとめる。基準範囲及び著しく異常な結果（「統計分析プラン」に示される）は、検査データの要約に使用する。ベースライン結果からの変化は、治療前対治療後のクロス集計で提示される（正常範囲よりも下、正常範囲内、及び正常範囲を超えるクラスにより）。異常の頻度集計を行う。あらゆる著しく異常な検査結果を有する被験者のリストも与えられる。

【0661】

バイタルサイン

脈拍／心拍数、呼吸数、体温、及び血圧（収縮期及び拡張期）値の記述統計、並びにベースラインからの変化を、「イベントのスケジュール」の計画された各時点で要約する。

【0662】

11.8. 暫定分析

中間分析は計画されていない。

【0663】

11.9. データ監視委員会

この試験は、全ての被験者に同じ用量のIVゴリムマブを投与する非盲検試験である。したがって、外部のデータ監視委員会は利用されない。安全性データは、試験の医療監視員及びDRCチャーターに定義される内部データ検証委員会によって常法により評価される。更に、データは治験運営委員会によって検証されてもよい。

【0664】

12. 有害事象の報告

臨床研究からの安全性情報の適時の、正確、かつ完全な報告及び分析は、被験者、治験責任医師、及び治験依頼者の保護にとって重要であり、世界中の規制機関によって命じられている。治験依頼者は、安全性情報の適切な報告を確実にするために世界的な規制要件に準拠して標準業務手順書を確立し、治験依頼者又はその関連会社によって行われる全ての臨床研究は、これらの手順書に従って行われる。

【0665】

12.1. 定義

12.1.1. 有害事象の定義及び分類

有害事象

有害事象とは、医薬品（治験用又は非治験用医薬品）を投与された臨床研究被験者における任意の好ましくない医療上の出来事である。有害事象は、必ずしも治療と因果関係を有するわけではない。したがって、有害事象とは、医薬品（治験用又は非治験用）医薬品の使用と時間的に関連のある、あらゆる好ましくない、意図しない徴候（例えば、臨床検査値の異常）、症状又は疾患のことであり得、医薬品（治験用又は非治験用）医薬品との因果関係の有無は問わない。（医薬品規制調和国際会議（[International Conference on Harmonisation、ICH]）による定義）

【0666】

これには、新たな発症又はベースライン状態からの重症度若しくは頻度における悪化である任意の発症、あるいは検査室試験の異常を含む診断手順の異常な結果が含まれる。

【0667】

注記：治験依頼者は、ICFの署名から開始して、有害事象を収集する（最後の有害事象記録の時間については、セクション12.3.1「全ての有害事象」を参照）。

【0668】

重篤な有害事象

ヒト使用のための医薬品の安全性情報監視のICH及び欧州連合ガイドライン（ICH and EU Guidelines on Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use）に基づく重篤な有害事象とは、任意の用量で、

●死に至るもの

●生命を脅かすもの（被験者は、その事象の時点で死亡のリスクがあった。「命に関わる」とは、仮により重度であれば死を招いたかもしれない事象を指すわけではない。）

●入院又は現行の入院期間の延長が必要となるもの

●永続的又は重大な障害／機能不全に至るもの

●先天異常／先天性欠損を来すもの

●医薬品を介した任意の感染因子の疑いのある伝播を来すもの

●医学的に重要な状態を来すもの*

*直ちに生命を脅かしたり、又は死や入院に至らなくとも、緊急報告が、被験者を危険にさらす恐れがあったり、又は上記の定義に挙げられている他の結果のうちの1つを防止す

10

20

30

40

50

るための介入が必要となり得る重要な医学的事象などの他の状況においても適切であるかどうかを決定する際に、医学的及び科学的判断を実行する必要がある。これらは通常、重篤であるとみなされる必要がある。

【0669】

試験薬と事象（例えば、アナフィラキシーによる死）との間の因果関係を示唆する証拠が存在する重篤かつ予期せぬ有害事象が発生した場合、それが研究エンドポイントの構成要素（例えば、総死亡率）である場合であっても、その事象は、重篤かつ予期せぬ疑われる有害反応として報告されなければならない。

【0670】

未記載の（予測できない）有害事象／安全に関する参考情報

10

性質又は重症度が適用可能な製品参照安全性情報と一致しない場合、有害事象は、記載されていないと考えられる。

【0671】

製造承認を有するMTXについては、有害事象の予測性は、その国の製薬業者によって提供されるパッケージラベルに有害事象が記載されているかどうかによって決定される。

【0672】

薬剤の使用に関連する有害事象

セクション12.1.2に記載される定義によって、因果関係が考えられるか、因果関係がおそらくあるか、又は因果関係がある可能性が極めて高い場合、有害事象は薬剤の使用に関連していると考えられる。

20

【0673】

12.1.2. 因果関係の定義

関連なし（Not Related）

薬剤の使用に関連しない有害事象。

【0674】

ほぼ関連なし（Doubtful）

代替的な説明がより可能性が高い有害事象、例えば、併用薬、併発症、又は時間の関係は、因果関係がおそらくないことを示唆する。

【0675】

可能性あり（Possible）

30

薬剤の使用に起因し得る有害事象。代替的な説明、例えば、併用薬、併発症は決定的ではない。時間の関係は合理的であり、したがって、因果関係を除外することができない。

【0676】

多分関連あり（Probable）

薬剤の使用に起因し得る有害事象。時間の関係は、示唆的である（例えば、薬剤の投与中断によって確認される）。代替的な説明、例えば、併用薬、併発症は可能性が低い。

【0677】

非常に可能性が高い（Very Likely）

有害事象は、可能性のある有害反応として記載され、代替的な説明、例えば、併用薬、併発症によって合理的に説明することができない。時間の関係は、非常に示唆的である（例えば、薬剤の投与中断及び再開によって確認される）。

40

【0678】

12.1.3. 重症度基準

重症度グレードの評価は、以下の全般的なカテゴリー記述子を使用して行われる：

軽度：容易に耐容され、最小限の不快感を引き起こし、日常活動を妨害しない症状の認識。

【0679】

中程度：普段の活動の妨害を引き起こすような十分な不快感が存在する。

【0680】

重度：機能の重大な障害又は機能不全を引き起こす、極度の苦痛。正常な日常活動が妨

50

害される。

【0681】

治験責任医師は、被験者が直接経験していない事象の重症度（例えば、検査値異常）を評価する際に臨床的判断を使用する必要がある。

【0682】

12.2. 特別な報告状況

緊急報告及び／又は安全性評価を必要とし得る治験依頼者試験薬に対する関心の安全性事象としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

- 治験依頼者試験薬の過剰投与
- 治験依頼者試験薬の乱用／誤用の疑い
- 治験依頼者試験薬への不注意又は偶発的曝露
- 治験依頼者試験薬の予想される薬理作用の不全（すなわち、効果がない）
- 治験依頼者試験薬の使用による予想外の治療的又は臨床的利益
- 治験依頼者製剤に関与する投薬エラー（治験依頼者試験薬への被験者／患者の曝露を伴うか又は伴わない、例えば、名前の混乱）

【0683】

特別な報告状況は、CRFに記録する必要がある。重篤な有害事象の基準を満たす任意の特別な報告状況は、CRFの重篤な有害事象ページに記録する必要がある。

【0684】

12.3. 手順

12.3.1. 全ての有害事象

重篤であるか重篤でないかにかかわらず、全ての有害事象及び特別な報告状況は、署名され、かつ日付を記入したICFが取得された時間から、被験者の最後の研究関連処置の完了まで（安全性フォローアップのための連絡を含み得る）報告される。試験の終了の30日以内に、治験責任医師に自発的に報告されたものを含む重篤な有害事象は、「重篤な有害事象フォーム」を使用して報告されなければならない。治験依頼者は、プロトコルに指定された時間枠を超えて、治験責任医師によって自発的に報告される任意の安全性情報を評価する。

【0685】

重篤な有害事象の定義を満たす全ての事象は、それらがプロトコルに固有の評価であるかどうかにかかわらず、重篤な有害事象として報告される。

【0686】

全ての有害事象は、重篤性、重症度、又は試験薬との推定される関係にかかわらず、医療専門用語を使用してソースドキュメントCRFに記録されなければならない。可能な場合はいつでも、徴候及び症状が、全般的な病因のために、診断を行う必要がある（例えば、咳、鼻水、くしゃみ、咽頭炎、及び鼻詰まりが「上気道感染」として報告されるべきである）。治験責任医師は、研究療法に対する有害事象の関係に関する意見をCRFに記録しなければならない。有害事象管理に必要な全ての測定は、ソースドキュメントに記録され、治験依頼者命令に従って報告されなければならない。

【0687】

治験依頼者は、規制当局への有害事象の適切な報告の責任を負う。治験依頼者はまた、治験責任医師（及び必要な場合、治験施設の所長）に、記載されておらず（予想されておらず）かつ試験薬の使用に関連する全ての重篤な有害事象を報告する。治験責任医師（又は必要な場合、治験依頼者）は、別途必要とされ、IEC／IRBによって文書化されない限り、プロトコルを承認した適切な独立倫理委員会／施設内審査委員会（Independent Ethics Committee/Institutional Review Board）（IEC／IRB）に報告しなければならない。

【0688】

非盲検試験を含む外来期を有する全ての試験では、被験者に、「ウォレット（研究）カード」が提供されなければならない、以下を示す研究の継続期間にわたってこのカードを携

10

20

30

40

50

行するように指示されなければならない。

- 研究番号
- 現地の言語による、被験者が臨床研究に参加していることの記述
- 治験責任医師の名前及び24時間の連絡先電話番号
- 現地の治験依頼者の名前及び24時間の連絡先電話番号（医療スタッフのみ）
- 施設番号
- 被験者番号
- 盲検の緊急解除を行うために必要な任意の他の情報

【0689】

12.3.2. 重大な有害事象

研究中に生じる全ての重篤な有害事象は、研究施設担当者により、その事象の認識後24時間以内に、適切な治験依頼者連絡担当者に報告されなければならない。

【0690】

重篤な有害事象に関する情報は、「重篤な有害事象フォーム」を使用して治験依頼者に送信され、これは、研究施設から医師によって全て記入及び署名され、24時間以内に治験依頼者に送信されなければならない。重篤な有害事象の初期及びフォローアップ報告は、ファクシミリ（ファックス）によって行われるべきである。

【0691】

研究の終了までに解明されていないか、又は試験における被験者の参加の中断時に解明されていない全ての重篤な有害事象は、以下のいずれかが生じるまで追跡されなければならない。

- 事象が解消すること
- 事象が安定化すること
- ベースライン値／状態が利用可能である場合、事象はベースラインにもどること
- 事象が、試験薬以外の薬剤、又は試験行為に無関係な因子に起因し得ること。
- いかなる追加情報も得られる可能性が低くなること（被験者又は医療従事者が、追加情報を提供することを断り、フォローアップの取り組みによる適切な注意の表明後にフォローアップ不能となった場合）。

【0692】

医薬品による感染因子の疑わしい伝播は、重篤な有害事象として報告される。被験者の研究参加の過程で生じる入院（又は入院の延長）を必要とするいずれの事象も、以下の入院を除いて重篤な有害事象として報告されなければならない：

●急性疾患又は有害事象を治療することを意図しない入院（例えば、長期療養施設における配置待機などの社会的理由）

●研究に入る前に計画された手術又は処置（CRFに文書化されなければならない）。
注：ICFの署名の前に計画された入院であり、入院計画目的の基礎疾患が悪化していなかった場合、重篤な有害事象とはみなされない。最初に計画された入院の延長をもたらすいかなる有害事象があれば、新しい重篤な有害事象として報告される。

【0693】

試験薬の最後の投与から2ヶ月以内の試験における被験者の死亡の原因は、事象が予測されるか、又は試験薬に関連しているかどうかにかかわらず、重篤な有害事象であると見なされる。

【0694】

12.3.3. 妊娠

全ての妊娠の最初の報告は、適切な妊娠通知フォームを使用して、その事象の認識の24時間以内に、研究施設担当者によって治験依頼者に報告されなければならない。異常な妊娠結果（例えば、自然流産、死産、及び先天異常）は、重篤な有害事象と見なされ、「重篤な有害事象フォーム」を使用して報告されなければならない。研究中に妊娠した任意の被験者は、更なる試験治療を中止しなければならない。

【0695】

10

20

30

40

50

精子に対する試験薬の影響は不明であるため、研究に含まれている男性被験者のパートナーにおける妊婦は、適切な妊娠通知フォームを使用して、その事象の認識から24時間以内に、研究施設担当者によって報告されることになる。

【0696】

妊娠の結果及び乳児のあらゆる出生後遺症の結果に関するフォローアップ情報が必要とされる。

【0697】

12.4. 特に興味深い事象

この臨床研究に参加している被験者における試験薬の最初投与後に生じる、新たに特定された悪性腫瘍又は活動性TBの症例は、セクション12.3の手順に従って、治験責任医師によって報告されなければならない。治験責任医師はまた、ほとんどの国では、活動性TBが報告可能な疾患と見なされることも助言されている。これらの事象は、重篤な有事象の定義を満たす場合にのみ重篤であると見なされるべきである。

【0698】

13. 試験薬情報

13.1. 試験薬の物理的記述

試験製品であるゴリムマブは、単回使用バイアル中で4mL（50mg、12.5mg/mL）の体積でIV注入用の滅菌液として供給される。各バイアルは、pH5.5のヒスチジン、ソルビトール、及びポリソルベート80の水性媒体中にゴリムマブを含む。防腐剤は存在しない。これは、治験依頼者の責任の下で製造及び提供される。

【0699】

MTX（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。

【0700】

13.2. 調製、取り扱い、及び保管

ガラスバイアル中の液体試験薬剤は、そのまま使用可能な状態で供給される。研究施設では、ゴリムマブ溶液のバイアルは、2℃～8℃（35.6°F～46.4°F）の範囲の調節された温度で、固定された冷蔵庫内に保管しなければならない。

【0701】

結果及び結論

多関節型若年性特発性関節炎（pJIA）を有する患者における静脈内ゴリムマブの有効性及び安全性：第3相非盲検試験による結果

目的

28週間の治療及び52週間の治療を通じた、現在のメトトレキサート（MTX）療法にもかかわらず活動性多関節型若年性特発性関節炎を有する小児患者における静脈内ゴリムマブの有効性及び安全性を評価する。

【0702】

材料及び方法

多施設第3相単群非盲検多施設試験を行って、ベースラインから第28週目まで現在のメトトレキサート（MTX）療法（中央値15mg/週（平均±SD、17.42±5.50mg/週））にもかかわらず活動性の多関節型若年性特発性関節炎を有する2～17歳の小児患者において、第0週目及び第4週目、その後は8週間毎（q8w）に80mg/m²の用量を30分間かけて投与する静脈内（IV）ゴリムマブを使用した薬物動態（PK）、安全性、及び有効性を評価した。体表面領域（BSA）は、モステラー式を使用して、各来院で測定された被験者の身長及び体重に基づいて計算した。患者は、市販のMTXを研究組み入れの時点と同じBSAベースの用量で週1回投与された。以下の結果は全て、試験薬剤を少なくとも1回投与した全ての患者を含む全分析セットに基づく。

■ベースラインから第28週目まで評価された有効性エンドポイントには以下が含まれた。

— JIA ACR（米国リウマチ学会（American College of R

10

20

30

40

50

heumatology)) 30、50、70、及び90レスポnder

●これは、以下の6つの項目のうちの3つ以上におけるそれぞれ30%、50%、70%、又は90%の改善、及び1つ以下の項目における30%以上の悪化として定義される。

－医師による全般的疾患活動性評価（PGA）（0～100mmの視覚的アナログスケール〔VAS〕）

－全体的な健康状態の親／被験者による評価（0～100mm VAS）

－活動性関節の数

－可動域が制限された関節の数

－小児健康調査質問票（CHAQ；範囲：0～3）

－C反応性タンパク質（CRP）

－以下の全てが存在することとして定義される非活動性疾患：

●活動性関節炎を有する関節がない

●JIAに起因する発熱、発疹、漿膜炎、脾腫、肝肥大、又は全身性リンパ節疾患がない

●活動性ブドウ膜炎なし

●正常なCRP（基礎炎症性疾患を有さない患者では0.287mg/dL以下）

●活動性疾患を示さない疾患活動性のPGA（5mm未満）

●朝のこわばりの持続時間が15分間未満

－以下の変数の評価に基づく、JADAS（若年性関節炎疾患活動性スコア（Arthritis Disease Activity Score）10、27、及び71のベースラインからの変化の中央値：

●疾患活動性のPGA

●全体的な健康状態の親／被験者による評価

●活動性関節の数（それぞれ評価される10、27、及び71個の関節のうちの）

●式： $(\text{CRP} [\text{mg/L}] - 10) / 10$ を用いて0～10スケールに切り捨てをしたCRP。

－以下により定義されるJADAS10、27、又は71最少疾患活動性：

●疾患活動性のPGAが3.5cm以下

●全体的な健康状態の親／被験者による評価が2.5cm以下

●腫脹関節数が1以下

■分析は全て、試験薬を少なくとも1回投与された全ての患者を含む全分析セットを用いて実施した。

■全ての項目が欠けていない限り、実施された最後の観察結果を用いて2つの複合エンドポイントの消失データを代入した。全ての項目が欠けている場合には、データは非応答とした。

【0703】

結果：

全体で180人の患者を適格性についてスクリーニングし、130人の患者を研究に組み入れ、127人に治療を行った。3人の患者が、組み入れられたものの針恐怖症、IVアクセスなし、及びMTXの中断のために治療を行わなかった。ベースラインの人口統計及び疾患特性を表9に示す。

【0704】

10

20

30

40

50

【表 12】

表 9：ベースラインの人口統計及び疾患特性

特性*	ゴリムマブ (n=127)
年齢(歳)	11.6 (3.85)
女性、n(%)	93 (73.2%)
人種、n(%)	
白色人種	85 (66.9%)
その他	28 (22.0%)
ヒスパニック又はラテンアメリカ系、n(%)	63 (49.6%)
体重(kg)	45.6 (21.12)
BSA、m ²	1.3 (0.39)
疾患の持続時間(月)	32.5 (36.88)
疾患活動性のPGA†	5.7 (1.76)
全体的な健康状態の親／被験者による評価	5.0 (2.36)
活動性関節の数	17.0 (10.52)
可動域が制限された関節の数	12.9 (11.86)
CHAQ	1.2 (0.76)
CRP、mg/dL	1.4 (3.12)
ILAR分類、n(%)	
多関節リウマチ因子－陰性	54 (42.5%)
多関節リウマチ因子－陽性	44 (34.6%)
付着部炎関連関節炎	12 (9.4%)
拡張オリゴ関節炎	8 (6.3%)
若年性乾癬性関節炎	5 (3.9%)
全身症状はないが、多関節型を有する全身性	4 (3.1%)
ILAR＝国際リウマチ学会。 * 値は、特に断りのない限り、平均(標準偏差)である。 † n=122	

【0705】

第28週目におけるJIA ACR30、50、70、及び90レスポンスの割合はそれぞれ83.5%、79.5%、70.1%、及び46.5%であった(図19)。患者の29.1%が、第28週目に非活動性疾患の基準を満たした(図20)。JADAS10、27、及び71のベースラインからの変化の中央値は、第28週目でそれぞれ-14.20、-16.60、及び-20.32であった。第28週目に患者の15%がJADAS10、27、及び71最小疾患活動性を満たした(図21)。

【0706】

第28週目までの重要な安全性事象を表10に示す。観察された有害事象(AE)は、ゴリムマブ及び他の腫瘍壊死因子阻害療法の確立された安全プロファイルと概ね一致していた。第28週目までに少なくとも1つの治療により発生したAEを経験した患者の割合は77.2%であった。最も高いAEの発生率を有するMedDRA器官別大分類は、感染症及び寄生虫症であり(57.5%[73/127])、最も一般的に報告されているAEは、上気道感染症(17.3%)、次いで鼻咽頭炎(15.0%)であった。6人の患者は、第28週目までに以下のような重篤なAEを経験した。すなわち、播種性帯状疱疹、気管支拡張症の感染性増悪、敗血症、水痘、菌状息肉症、及び希死念慮。これらの事象は、水痘を除き、静脈内ゴリムマブの永続的な中断をもたらした。

【0707】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 1 0. 第 2 8 週目までの重要な安全性事象

フォローアップの平均持続時間(週)	27.5
平均曝露(投与回数)	3.9
1つ以上のAEのために試験薬剤を中止した患者、n(%)	9 (7.1%)
1つ以上のAE、n(%)	98 (77.2%)
1つ以上の重篤なAE、n(%)	6 (4.7%)
死亡*	0
1つ以上の重度のAE、n(%)	3 (2.4%)
全体の感染症、n(%)	70 (55.1%)
1つ以上の重篤な感染症	4 (3.1%)
1つ以上の日和見感染症、n(%)	1 (0.8%)
1つ以上の注入関連反応、n(%)	2 (1.6%)
悪性腫瘍、n(%)	1 (0.8%)
活動性結核	0
* 第28週目後に1例の死亡(敗血症ショックによる)が報告された。	

10

【0 7 0 8】

薬物動態曝露量

GO-VIVA 研究における一次薬物動態(PK)エンドポイントは、第28週目に観察されたPK曝露(第28週目におけるトラフ濃度[Ctrough, ss])及び母集団PKモデリング(PPK)及びシミュレーションからの8週間の1回投与間隔にわたる定常状態の曲線下面積(AUCss)である。主要二次エンドポイントは、第52週目におけるのと同じPK曝露パラメータとした。観察されたゴリムマブのCtrough、ssを要約し、この第3相研究における疎なサンプリングにより、母集団PK(PPK)モデリングによってAUCssを決定した。

20

【0 7 0 9】

母集団PKモデル

PPKモデルの開発は、相互作用法による一次条件付き推定法を用いてNONMEMバージョン7.3で実施した。ベースモデルは、IV注入による2コンパートメントモデルで構成した。共変量モデル構築は、患者ベースライン特性、人口統計学、疾患状態、及び検査結果、並びに免疫原性状態を含む関連する共変量の変数増加法及び変数減増法からなっていた。次いで、最終PPKモデルを、pJIA(GO-VVA)及び成人RA(GO-FORWARD)について独立して確立した。PPKモデルの適合度プロットを図22に示す。

30

【0 7 1 0】

【数 1】

$$V1(L) = TVV1 \left(\frac{BWT}{70} \right)^{\theta 5}$$

$$CL \left(\frac{L}{day} \right) = TVCL \left(\frac{BWT}{70} \right)^{\theta 6} \times (1 + \theta_{11} White) \times \left(\frac{CRP}{0.471} \right)^{\theta 13} \times (1 + \theta_{14} Immune) \times \left(\frac{ALB}{4.3} \right)^{\theta 15}$$

40

$$V2(L) = TVV2 \left(\frac{BWT}{70} \right)^{\theta 8}$$

BWT=体重(kg)、CRP=C反応性タンパク質(mg/dL)、Immune=ゴリムマブに対する抗体について陽性、ALB=アルブミン(g/L)。

【0 7 1 1】

最終的に、この研究及びPPKモデリングからの結果は、成人RAにみられる有効性を

50

外挿するために、p J I A 集団と成人 R A 集団との間の曝露量の類似性を実証することによってあった。

【0712】

用量

G O - V I V A における 127 人全ての組み入れ被験者が、第 0 週目、第 4 週目、並びに第 28 週目までは 8 週間毎 (q 8 w)、及びその後は第 244 週目まで q 8 w で、 80 mg/m^2 (最大 1 回用量 240 mg) のゴリムマブを I V 注入として 30 分間かけて投与された。体表面領域 (B S A) は、モステラー式を使用して、各来院で測定された被験者の身長及び体重に基づいて計算した。被験者は、市販の M T X も、研究組み入れの時点と同じ B S A ベースの用量で第 28 週目まで週 1 回投与された。

10

【0713】

結果

第 28 週目に、 80 mg/m^2 の B S A ベースの投与レジメンにより、2 歳～6 歳未満、6 歳～12 歳未満、及び 12 歳～18 歳未満の p J I A の年齢群間で同様の C T ラフ、s s 及び A U C s s が観察され (図 23)、P K 曝露は第 52 週目まで維持された (図 24)。また、B S A ベースの投与は、体重四分位群に対して同様の P K 曝露をもたらした (図 25)。より高い C R P レベルにより低い P K 曝露に関連する傾向が観察された (図 26)。C R P が p J I A モデルでは統計的に有意な共変数であるが成人 R A モデルでは有意な共変数でないことは、組み入れ基準の違いに一部拠るものと考えられる。

20

【0714】

第 28 週目の p J I A 被験者における定常状態の血清ゴリムマブのトラフ濃度 (平均 $\pm$ S D : $0.50 \pm 0.427 \mu\text{g/mL}$) は、成人 R A で観察された範囲内であり (図 27)、また、P s A 及び A S で観察された範囲内でもあった。ゴリムマブの I V 投与後、成人 R A、P s A 及び A S における平均 $\pm$ S D の定常状態の血清ゴリムマブのトラフ濃度は、それぞれ 0.41 ± 0.52 、 0.69 ± 0.58 及び $0.74 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ であった。A U C s s は、成人の R A 被験者と比較して p J I A 被験者においてわずかに高かった (図 28) が、生物学的療法で典型的に見られる予想変動の範囲内であった。

【0715】

結論：

第 0 週目及び第 4 週目、その後、8 週間毎に 80 mg/m^2 の用量で投与される静脈内ゴリムマブは、活動性の多関節型 J I A (p J I A) を有する患者において安全かつ有効である。J I A A C R 30、50、70 及び 90 応答率について、一貫して高い J I A A C R 応答率が、血清ゴリムマブのトラフ濃度の四分位群にわたって観察され (図 29A～図 29D)、関節症状、物理的機能、並びに、医師、親、及び被験者により報告される疾患の評価に臨床的に重要な改善が認められた。第 28 週目及び第 52 週目までの安全性データは、ゴリムマブの以前の研究からの結果と一致し、多関節型 J I A A C R (p J I A) の治療における他のクラスの腫瘍壊死因子阻害剤療法で観察されたデータと同様であった。

30

以下の態様を包含し得る。

【1】 小児患者の若年性特発性関節炎 (J I A) を治療する方法であって、抗 T N F 抗体の静脈内 (I V) 用量を前記患者に投与することを含み、前記抗 T N F 抗体が、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖 (H C) と、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖 (L C) とを含み、前記抗 T N F 抗体で治療された前記患者が、4 週間の治療、8 週間の治療、12 週間の治療、16 週間の治療、20 週間の治療、24 週間の治療、又は 28 週間の治療後に非活動性疾患の基準を満たす、方法。

40

【2】 前記患者の 10% 超が、8 週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たし、前記患者の 20% 超が、16 週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たし、前記患者の 29% 超が、28 週間の治療後に前記非活動性疾患の基準を満たす、上記【1】に記載の方法。

【3】 前記小児患者が、2～17 歳である、上記【1】に記載の方法。

50

〔４〕 前記若年性特発性関節炎（ＪＩＡ）が、多関節型若年性特発性関節炎（ｐＪＩＡ）である、上記〔１〕に記載の方法。

〔５〕 前記ＩＶ用量が、第０週目、第４週目、及びその後は８週間毎に $80\text{mg}/\text{m}^2$ である、上記〔１〕に記載の方法。

〔６〕 前記方法が、メトトレキサート（ＭＴＸ）を前記小児患者に投与することを更に含む、上記〔１〕に記載の方法。

〔７〕 小児患者の若年性特発性関節炎（ＪＩＡ）を治療する方法であって、抗ＴＮＦ抗体の静脈内（ＩＶ）投与量を前記患者に投与することを含み、前記抗ＴＮＦ抗体が、配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）と、配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）とを含み、前記抗ＴＮＦ抗体で治療された前記患者が、４週間の治療、８週間の治療、１２週間の治療、１６週間の治療、２０週間の治療、２週間の治療、又は２８週間の治療後にＪＩＡ ＡＣＲ３０、ＪＩＡ ＡＣＲ５０、ＪＩＡ ＡＣＲ７０、又はＪＩＡ ＡＣＲ９０のＪＩＡ米国リウマチ学会（ＪＩＡ ＡＣＲ）応答に対応するベースラインからの改善を有する、方法。

10

〔８〕 ４週間の治療後に、前記患者の５０％超がＪＩＡ ＡＣＲ３０及びＪＩＡ ＡＣＲ５０の前記基準を満たす、上記〔７〕に記載の方法。

〔９〕 １２週間の治療後に、前記患者の５０％超がＪＩＡ ＡＣＲ３０、ＪＩＡ ＡＣＲ５０、及びＪＩＡ ＡＣＲ７０の前記基準を満たす、上記〔７〕に記載の方法。

〔１０〕 ２８週間の治療後に前記患者の８３％超が、ＪＩＡ ＡＣＲ３０の前記基準を満たし、前記患者の７９％超が、ＪＩＡ ＡＣＲ５０の前記基準を満たし、前記患者の７０％超が、ＪＩＡ ＡＣＲ７０の前記基準を満たし、前記患者の４６％超が、ＪＩＡ ＡＣＲ９０の前記基準を満たす、上記〔７〕に記載の方法。

20

〔１１〕 前記小児患者が、２～１７歳である、上記〔７〕に記載の方法。

〔１２〕 前記若年性特発性関節炎（ＪＩＡ）が、多関節型若年性特発性関節炎（ｐＪＩＡ）である、上記〔７〕に記載の方法。

〔１３〕 前記ＩＶ用量が、第０週目、第４週目、及びその後は８週間毎に $80\text{mg}/\text{m}^2$ である、上記〔７〕に記載の方法。

〔１４〕 前記方法が、メトトレキサート（ＭＴＸ）を前記小児患者に投与することを更に含む、上記〔７〕に記載の方法。

〔１５〕 小児患者の若年性特発性関節炎（ＪＩＡ）を治療する方法であって、抗ＴＮＦ抗体の静脈内（ＩＶ）用量を前記患者に投与することを含み、前記抗ＴＮＦ抗体が、配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）と、配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）とを含み、前記抗ＴＮＦ抗体で治療された前記患者が、４週間の治療、８週間の治療、１２週間の治療、１６週間の治療、２０週間の治療、２週間の治療、又は２８週間の治療後にＪＡＤＡＳ１０、ＪＡＤＡＳ２７、又はＪＡＤＡＳ７１最小疾患の若年性関節炎疾患活動性スコア（ＪＡＤＡＳ）を有する、方法。

30

〔１６〕 １２週間の治療、１６週間の治療、２０週間の治療、２４週間の治療、及び２８週間の治療後に、前記患者の１０％超が、ＪＡＤＡＳ１０、ＪＡＤＡＳ２７、及びＪＡＤＡＳ７１最少疾患活動性の疾患を有する、上記〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕 ２４週間の治療及び２８週間の治療後に、前記患者の１５％以上が、ＪＡＤＡＳ１０、ＪＡＤＡＳ２７、及びＪＡＤＡＳ７１最少疾患活動性の疾患を有する、上記〔１５〕に記載の方法。

40

〔１８〕 前記小児患者が、２～１７歳である、上記〔１５〕に記載の方法。

〔１９〕 前記若年性特発性関節炎（ＪＩＡ）が、多関節型若年性特発性関節炎（ｐＪＩＡ）である、上記〔１５〕に記載の方法。

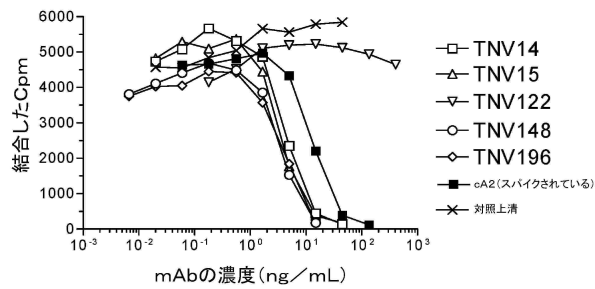
〔２０〕 前記ＩＶ用量が、第０週目、第４週目、及びその後は８週間毎に $80\text{mg}/\text{m}^2$ である、上記〔１５〕に記載の方法。

〔２１〕 前記方法が、メトトレキサート（ＭＴＸ）を前記小児患者に投与することを更に含む、上記〔１５〕に記載の方法。

50

【図面】

【図 1】



【図 2 A】

TNVs	ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGA
生殖系列	Q V Q L V E S G G G V
TNVs	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTG
TNV148 (B)	GGTGTCCAGTGT.....A.....
生殖系列	V Q P G R S L R L S C A A S G
TNVs	GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TNV14, 15	
TNV148 (B)	T.....
TNV196	C.....
生殖系列	F T F S S Y A M H W V R Q A P
TNV14, 15	TTACACCTCAGTAGCTATGCTATGCAGTGGTCCGCCAGGCTCCA
TNV148 (B)	T.....
TNV196	C.....
生殖系列	G K G L E W V A V I S Y D G S
TNV14	GGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
TNV15	A.....C.T.....
TNV148 (B)	C.....T.....T.....
TNV196	T.....G.....
生殖系列	N K Y Y A D S V K G R F T I S 配列番号7
TNV14	AATAAATACTACGAGACTCCGTGAAGGCCGATTACCATCTCC 配列番号34
TNV15	..GC..A.G....G.....A.....
TNV148 (B)	..C...A.G.....C.....
TNV196	A.G.....

10

【図 2 B】

生殖系列	R D N S K N T L Y L Q M N S L
TNV14	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV15	G.....
TNV148	C.....
TNV148B	T.....
TNV196	T.....
生殖系列	R A E D T A V Y Y C A R
TNV14, 15	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV148 (B)	GATCGAGGT
TNV196	A
生殖系列	Y Y Y Y Y G M D V W
TNV14	TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
TNV15	ATATCAGCAGGTGGAA
TNV148 (B)	G.C.....A.T..T.....
TNV196	..TGG.....A.....
生殖系列	G Q G T T V T V S S 配列番号7
TNV14	GGGCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAG 配列番号34
TNV15	..C.....
TNV148 (B)	..C.....
TNV196	..C..G.....

【図 3】

TNVs	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTC
生殖系列	E I V L T Q S P A T
TNVs	GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACC
TNV148	CCAGATACCACCGA.....
生殖系列	L S L S P G E R A T L S C R A
TNVs	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
TNV14, 15	
TNV148, 196	TA.....
生殖系列	S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
TNVs	AGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV14, 15	
TNV148, 196	
生殖系列	G Q A P R L L I Y D A S N R A
TNVs	GGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
TNV14	
TNV15	
TNV148 (B)	
TNV196	
生殖系列	T G I P A R F S G S G S G T D
TNVs	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TNV14	
TNV15	
TNV148 (B)	
TNV196	
生殖系列	F T L T I S S L E P E D F A V
TNVs	TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGGCCTGAAGATTTTGCAGTT
TNV14	
TNV15	
TNV148 (B)	
TNV196	
生殖系列	Y Y C Q Q R S N W P P F T F G 配列番号8
TNVs	TATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC 配列番号35
TNV14	A.....
TNV15	
TNV148 (B)	
TNV196	
生殖系列	P G T K V D I K R
TNVs	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
TNV14	
TNV15	
TNV148 (B)	
TNV196	

20

30

40

50

【図 4】

生殖系列 TNVs	MGFGLSWVFLVALLRGVQC	シグナル	配列番号32
生殖系列 TNVs	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS TNV148 (B) I..	FR1	配列番号7
生殖系列 TNVs	SYAMH	CDR1	配列番号1
生殖系列 TNVs	WVRQAPGKGLEWVA TNV148 (B) N.....	FR2	配列番号7
生殖系列 TNV14 I.L...S.K.....D TNV15 F.L.....K..... TNV148 (B) FM.....K..... TNV196 F.....KS.....	VISYDGSNKYYADSVKG	CDR2	配列番号2
生殖系列 TNV14 TNV15 A..... TNV148 P..... TNV148B TNV196 V.....F.....F.....	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	FR3	配列番号7
生殖系列 TNV14 -----YYYYYGMDV TNV15 DRGISAGN..... TNV148 (B) ...V...N..... TNV196 ...A...N..... G...N.....		CDR3	配列番号3
生殖系列 TNVs	WGQGTITVTVSS	J6	配列番号7

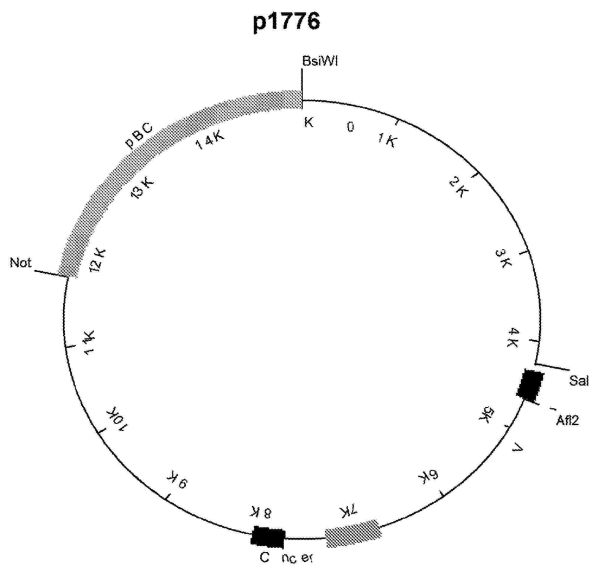
【図 5】

生殖系列 TNVs	MEAPAQLLFLLLLLWLPDPTTG	シグナル	配列番号33
生殖系列 TNVs	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1	配列番号8
生殖系列 TNV14 TNV15 TNV148 (B) Y..... TNV196 Y.....	RASQSVSSYLA	CDR1	配列番号4
生殖系列 TNVs	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2	配列番号8
生殖系列 TNVs	DASNRAT	CDR2	配列番号5
生殖系列 TNVs	GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC	FR3	配列番号8
生殖系列 TNVs	QQRSNWPPFT	CDR3	配列番号6
生殖系列 TNVs	FGPGTKVDIK	J3	配列番号8

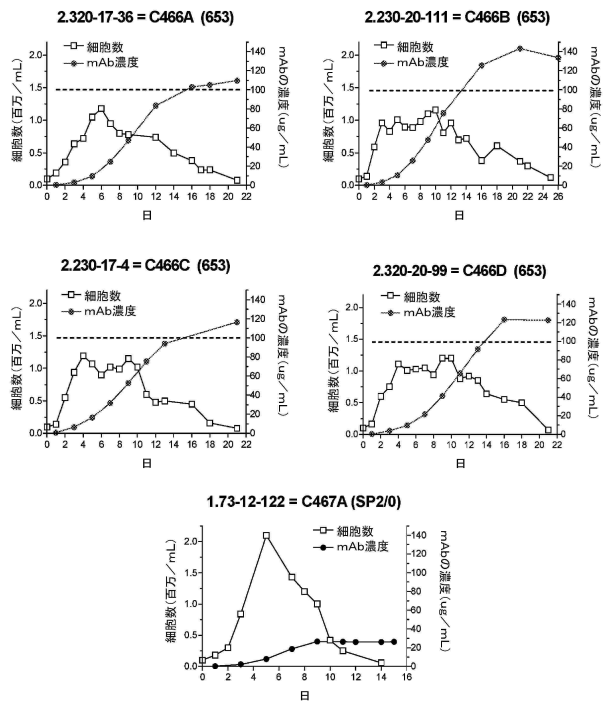
10

20

【図 6】



【図 7】

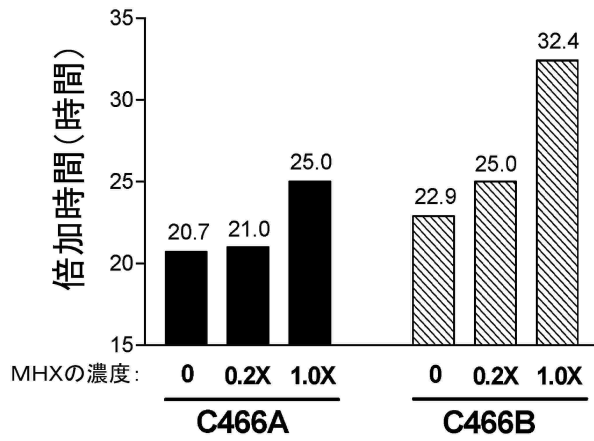


30

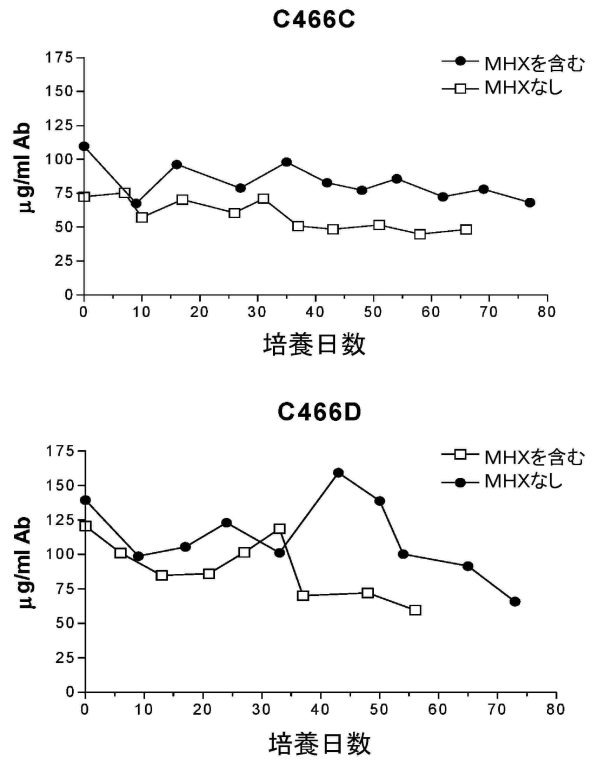
40

50

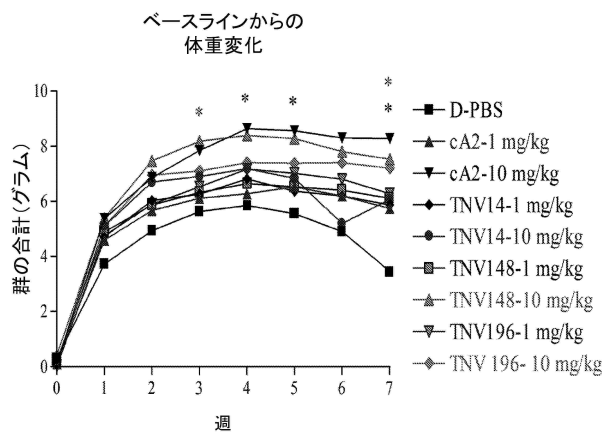
【図 8】



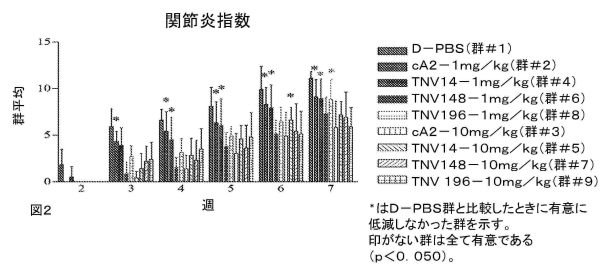
【図 9】



【図 10】



【図 11 A】



*はD-PBS群と比較したときに有意に低減しなかった群を示す。印がない群は全て有意である ($p < 0.050$)。

10

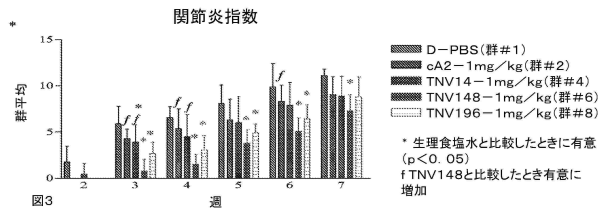
20

30

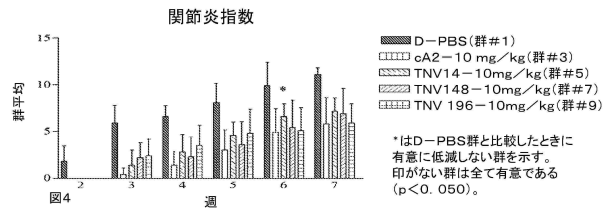
40

50

【図 1 1 B】

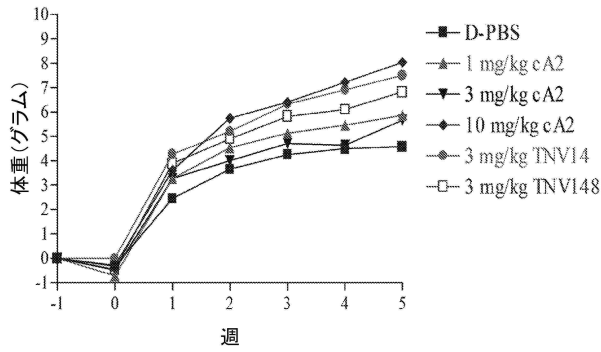


【図 1 1 C】

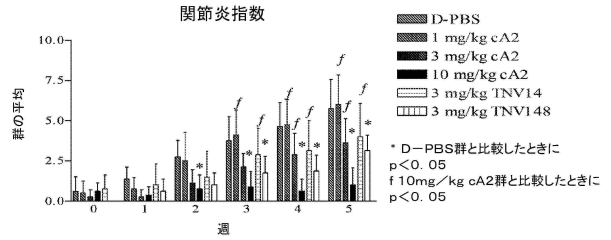


【図 1 2】

体重の変化(群平均)



【図 1 3 A】

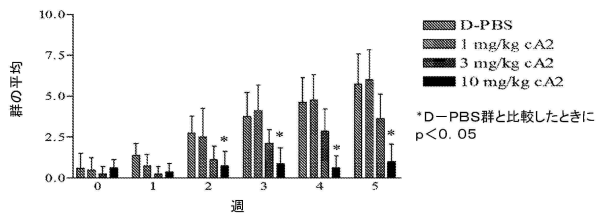


10

20

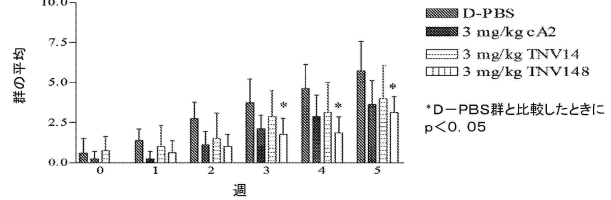
【図 1 3 B】

関節炎指数(対照)



【図 1 3 C】

関節炎指数

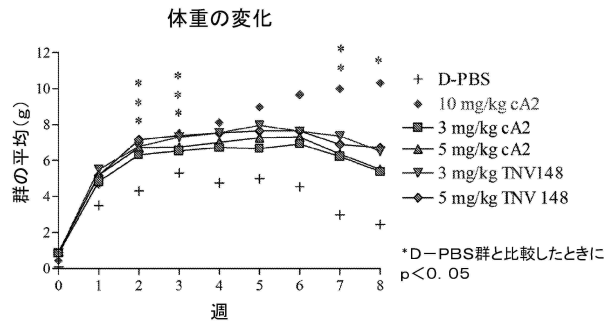


30

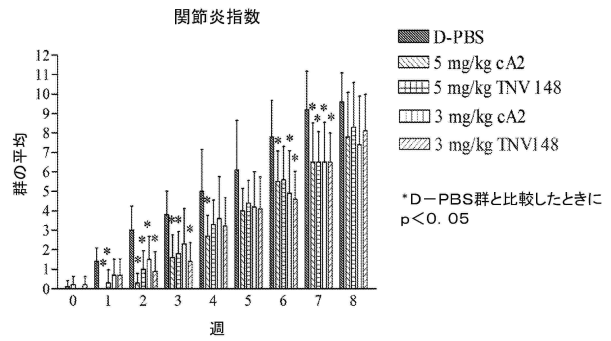
40

50

【図 1 4】

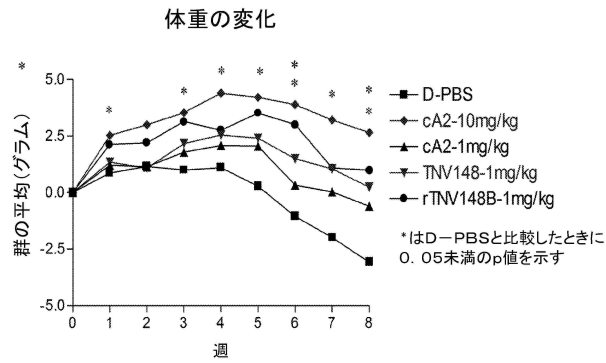


【図 1 5】

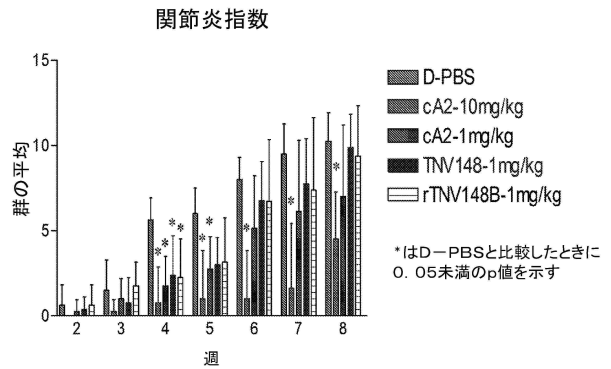


10

【図 1 6】

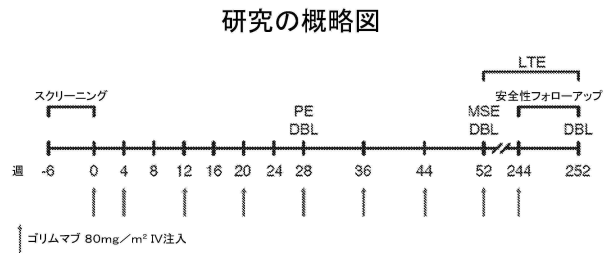


【図 1 7】

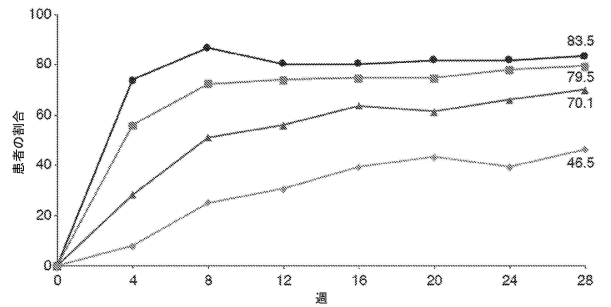


20

【図 1 8】



【図 1 9】

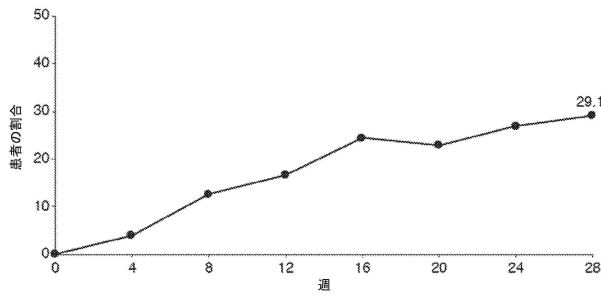


30

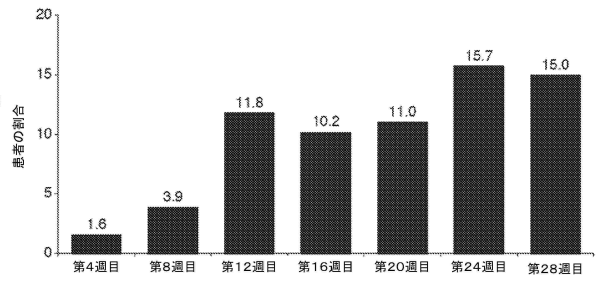
40

50

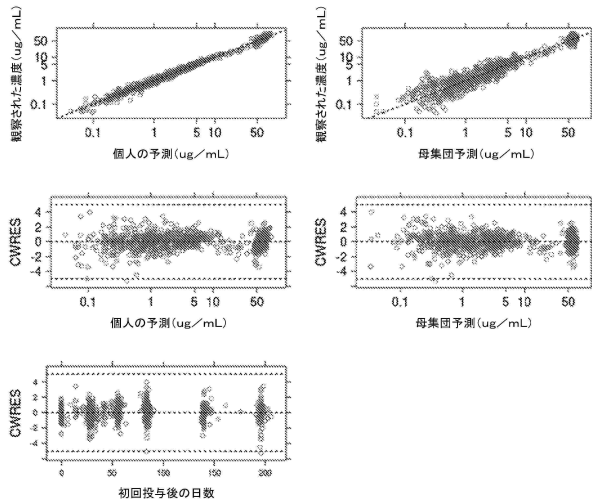
【図 20】



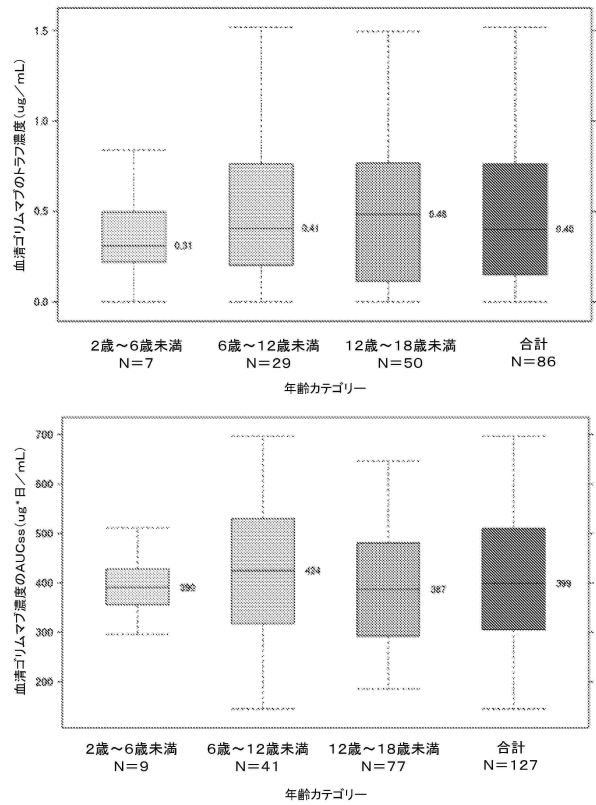
【図 21】



【図 22】



【図 23】



10

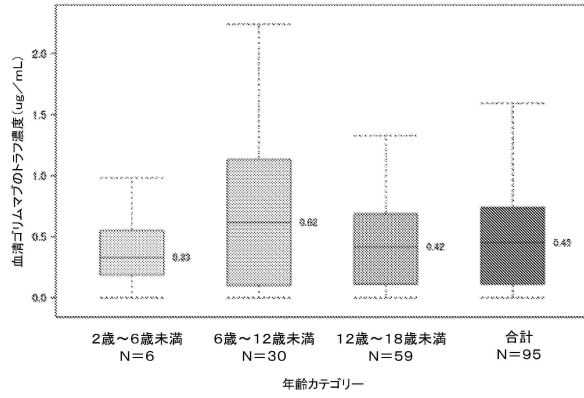
20

30

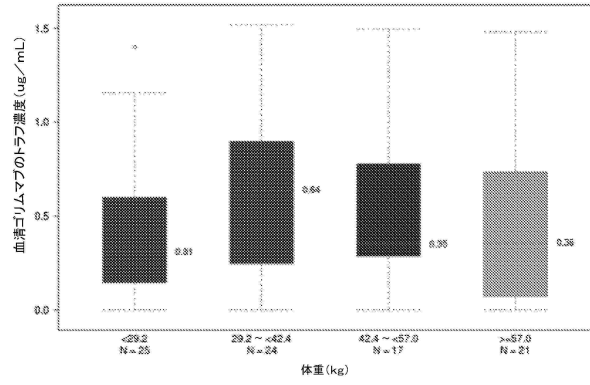
40

50

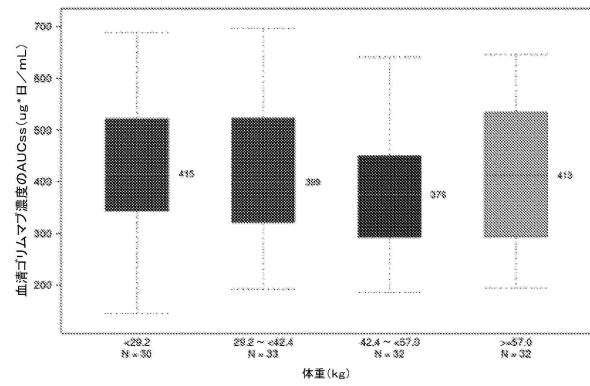
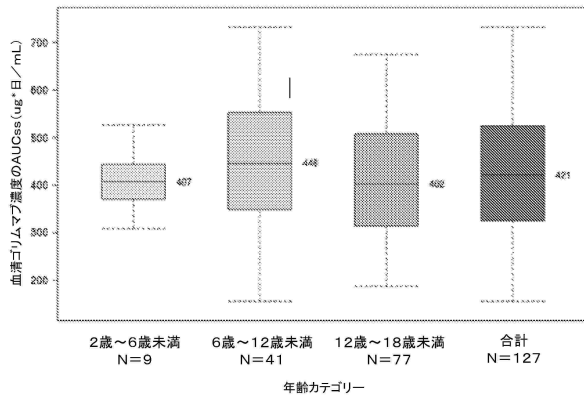
【図 2 4】



【図 2 5】

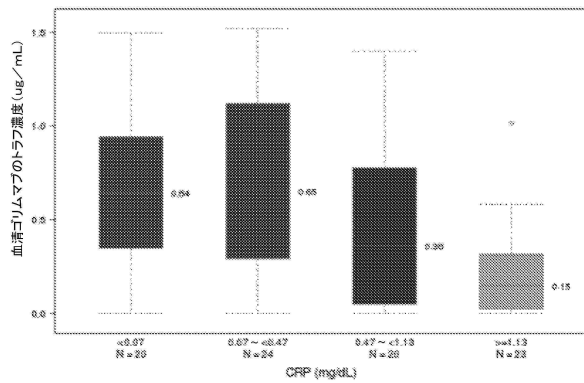


10

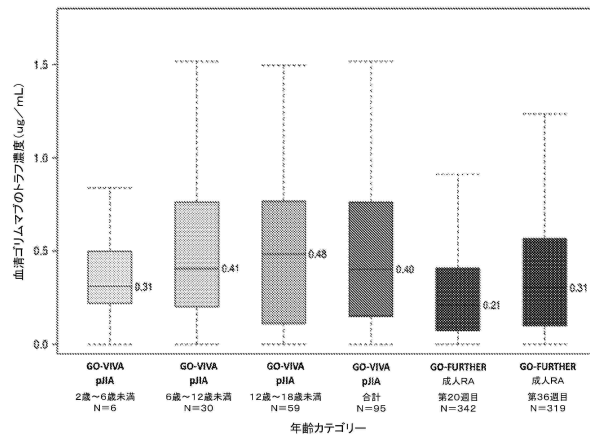


20

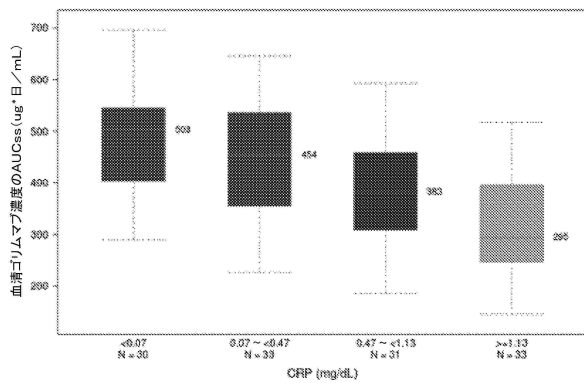
【図 2 6】



【図 2 7】



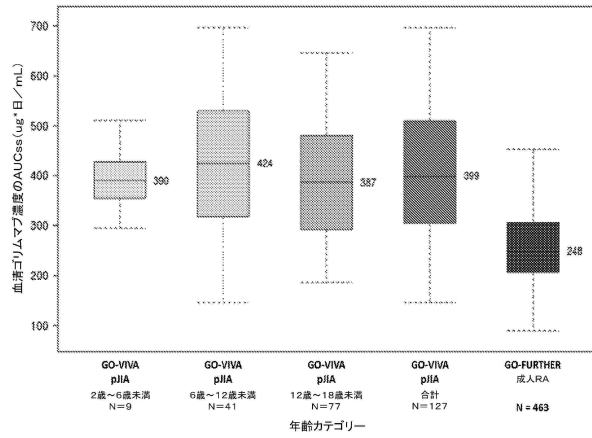
30



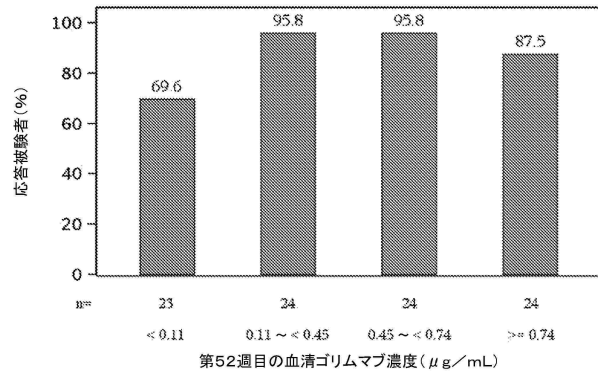
40

50

【図 28】

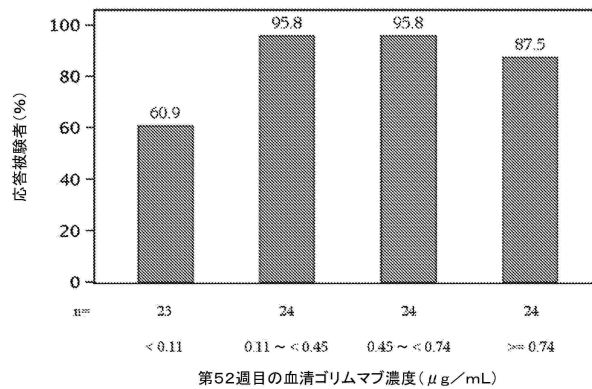


【図 29 A】

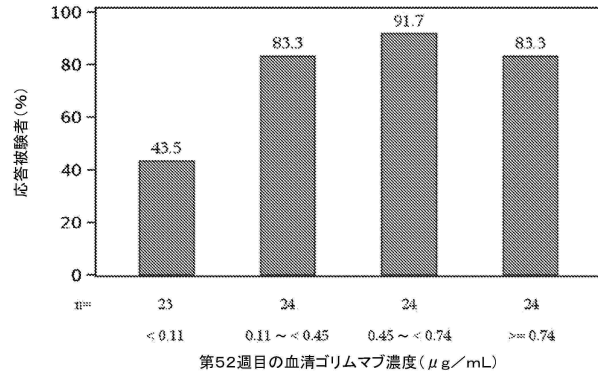


10

【図 29 B】

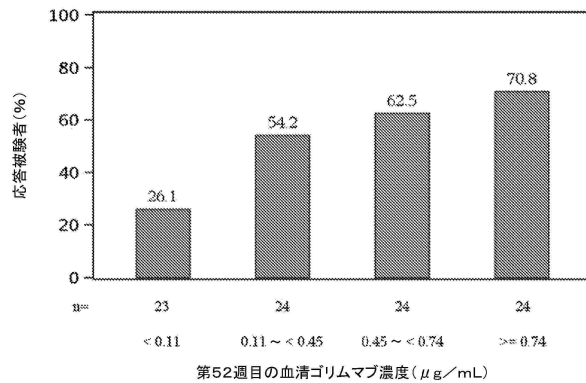


【図 29 C】



20

【図 29 D】



30

【配列表】

0007689074000001.app

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/899,171

(32)優先日 令和1年9月12日(2019.9.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 星川 亮

(72)発明者 ベンズリー, カレン

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 クラーク, ミカエル

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 レウ, ジョセリン

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 シュイ, ジェンファ

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2018/147915 (WO, A1)

国際公開第2018/140121 (WO, A1)

CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY, 2015年, Vol.27, No.5, pp.505-510

BIODRUGS, 2017年, Vol.31, No.3, pp.263-274

CLINICAL EPIDEMIOLOGY, 2014年, Vol.6, pp.379-393

U.S. National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, "A Study to Evaluate the Pharmacokinetics, Efficacy and Safety of Intravenous Golimumab in Pediatric Participants With Active Polyarticular Course Juvenile Idiopathic Arthritis Despite Methotrexate Therapy (GO-VIVA)", NCT02277444, Update Ver.42, [retrieved on 2024.10.14], 2018年11月28日, retrieved from the internet:, <URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02277444?tab=history&a=42#version-content-panel>>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 4 5 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)