

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193326** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.01

(22) Дата подачи заявки
2020.05.11

(51) Int. Cl. *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01)
A61K 31/4706 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ФНО, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ АКТИВНОГО АНКИЛОЗИРУЮЩЕГО СПОНДИЛИТА

(31) 62/856,300; 62/924,839

(32) 2019.06.03; 2019.10.23

(33) US

(86) PCT/IB2020/054447

(87) WO 2020/245677 2020.12.10

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

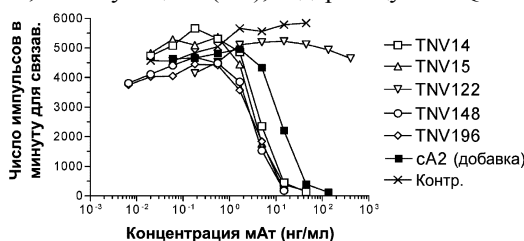
(72) Изобретатель:

**Харрисон Дайен Д., Ся Элизабет С.,
Ким Ли-Лянь, Ло Ким Хун (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям и способам применения антител к ФНО или их антигенсвязывающих фрагментов при лечении активного анкилозирующего спондилита (АС), например при лечении с использованием антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (НС), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37.



A1

202193326

202193326

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571930EA/042

АНТИТЕЛА К ФНО, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ АКТИВНОГО АНКИЛОЗИРУЮЩЕГО СПОНДИЛИТА

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6104WOPCT1SeqListing.txt, с датой создания 4 мая 2020 г. и размером 21 КБ. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам применения антител к ФНО или их антигенсвязывающих фрагментов при лечении активного анкилозирующего спондилита (AS), например при лечении с использованием антитела к ФНО, имеющего тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ФНО-альфа - это растворимый гомотример из белковых субъединиц с молекулярной массой 17 кДа. Кроме того, существует мембранно-связанная форма-предшественник ФНО с молекулярной массой 26 кДа.

Клетки, отличные от моноцитов или макрофагов, также продуцируют ФНО-альфа. Например, человеческие немонотитарные опухолевые клеточные линии, Т-лимфоциты периферической крови CD4⁺ и CD8⁺, а также некоторые культивируемые линии Т-и В-клеток продуцируют ФНО-альфа.

ФНО-альфа обладает провоспалительной активностью, которая приводит к повреждению тканей, такому как деградация хряща и кости, к индукции молекул адгезии, индукции прокоагулянтной активности на клетках эндотелия сосудов, повышению адгезии нейтрофилов и лимфоцитов и стимулированию высвобождения фактора активации тромбоцитов из макрофагов, нейтрофилов и клеток эндотелия сосудов.

ФНО-альфа связывали с инфекциями, иммунными расстройствами, неопластическими патологиями, аутоиммунными патологиями и патологическими реакциями «трансплантат против хозяина». Связь ФНО-альфа с раком и инфекционными патологиями часто обусловлена состоянием катаболизма организма-хозяина. Пациенты с раком страдают от потери веса, обычно обусловленной анорексией.

Обширное истощение, связанное с раком и другими заболеваниями, известно как «кахексия». Кахексия включает прогрессирующее снижение веса, анорексию и устойчивую потерю безжирового компонента массы тела в ответ на появление злокачественного образования. Кахексическое состояние приводит к повышению онкологической заболеваемости и смертности. Существуют доказательства того, что

ФНО-альфа участвует в кахексии, вызванной раком, инфекционной патологией и другими катаболическими состояниями.

Считается, что ФНО-альфа оказывает особое влияние на грамотрицательный сепсис и эндотоксический шок, включая лихорадку, слабость, анорексию и кахексию. Эндотоксин сильно активирует продукцию моноцитов/макрофагов и секрецию ФНО-альфа и других цитокинов. ФНО-альфа и другие цитокины, продуцируемые моноцитами, опосредуют метаболические и нейрогормональные ответы на эндотоксин. Введение эндотоксина людям-добровольцам приводит к возникновению острого заболевания с гриппоподобными симптомами, включая лихорадку, тахикардию, повышенную скорость метаболизма и высвобождение гормонов стресса. Уровень ФНО-альфа в кровотоке увеличивается у пациентов, страдающих грамотрицательным сепсисом.

Таким образом, ФНО-альфа вовлечен в воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, злокачественные опухоли и/или нейродегенеративные заболевания, и его используют в качестве мишени для специфической биологической терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит и болезнь Крона. В открытых исследованиях с использованием моноклональных антител к ФНО-альфа (сА2) отмечены благоприятные эффекты с подавлением воспаления и успешным повторным лечением при рецидиве ревматоидного артрита и при болезни Крона. Благоприятные результаты также отмечены в рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях с сА2 при ревматоидном артрите с подавлением воспаления.

В других исследованиях описаны mAb, специфичные к рекомбинантному человеческому ФНО, которые обладают нейтрализующей активностью *in vitro*. Некоторые из этих mAb использовали для картирования эпитопов человеческого ФНО, для разработки ферментных иммунологических анализов и содействия очистке рекомбинантного ФНО. Однако эти исследования не обеспечивают основу для получения нейтрализующих ФНО антител, которые можно использовать для диагностики или терапевтического применения *in vivo* у людей из-за иммуногенности, низкой специфичности и/или неприемлемости фармацевтических препаратов.

Показано, что нейтрализующие антисыворотки или моноклональные антитела (мАт) к ФНО у не относящихся к человеку млекопитающих предотвращают нежелательные физиологические изменения и не допускают гибели после введения летальной дозы при экспериментальной эндотоксемии и бактериемии. Этот эффект продемонстрирован, например, в анализах летальности на грызунах и в моделях патологии на приматах.

Были описаны предполагаемые связывающиеся с рецептором локусы человеческого ФНО, и связывающиеся с рецептором локусы ФНО-альфа состоят из аминокислот 11-13, 37-42, 49-57 и 155-157 в ФНО.

Для не относящихся к человеку млекопитающих, химерные, поликлональные (например, антисыворотки) и/или моноклональные антитела (мАт) и их фрагменты

(например, продукты протеолитического расщепления или полученные из них гибридные белки) являются потенциальными терапевтическими агентами, которые исследуют в некоторых случаях для лечения определенных заболеваний. Однако такие антитела или фрагменты могут индуцировать иммунный ответ при введении человеку. Такой иммунный ответ может приводить к опосредованному иммунными комплексами выведению антител или фрагментов из кровообращения и делать повторное введение непригодным для терапии, тем самым снижая терапевтический эффект для пациента и ограничивая возможности введения антитела или фрагмента. Например, повторное введение антител или фрагментов, содержащих нечеловеческие участки, может приводить к появлению сывороточной болезни и/или анафилаксии. Чтобы предотвратить эти и другие проблемы, применяли ряд подходов для снижения иммуногенности таких антител и их участков, включая химеризацию и гуманизацию, что хорошо известно в данной области. Однако эти и другие подходы по-прежнему могут приводить к получению антител или фрагментов, имеющих некоторую иммуногенность, низкую аффинность, низкую авидность или проблемы с клеточной культурой, увеличением масштаба, производством и/или низким выходом продукта. Таким образом, такие антитела или фрагменты могут не подходить идеально для производства или применения в качестве терапевтических белков.

Соответственно, существует потребность в создании антител к ФНО или фрагментов, которые преодолевают одну или более из этих проблем, а также улучшают по сравнению с известными антителами или их фрагментами. Это требование привело к разработке полностью человеческого моноклонального антитела к ФНО SIMPONI® (голимумаб).

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для

повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанное статистически значимое улучшение активности заболевания к неделе 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня в AS QoL= $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS= $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS= $20,3 \pm 24,6$ CO.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где указанную композицию вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен

способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент имеет ответ на лечение и идентифицирован как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания к неделе 16 лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднего изменения качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднего изменения по сравнению с исходным уровнем по сводке физических компонентов Short-Form-36 (PC-36), среднее изменение относительно исходного уровня в сводной информации по составу Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где указанную композицию вводят посредством внутривенной инфузии (IV) так, что указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, где способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (Short-Form-36 PC), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно

включает введение до, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одной из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВП), анальгетика, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нейромышечный блокатор, противомикробный, антипсориазный, кортикостерический, анаболический стероид, эритропоэтин, иммунизацию, иммуноглобулин, иммуносупрессивный фактор, гормон роста, гормонозаместительное лекарственное средство; радиофармацевтический препарат, антидепрессант, антипсихотический препарат, стимулятор, лекарственный препарат астмы, агонист бета, ингаляционный стероид, эпинефрин или аналог, цитокин или антагонист цитокинов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо,

где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL= $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ CO, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS= $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS= $20,3 \pm 24,6$ SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где указанную композицию вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело к ФНО или связующий фрагмент его антигена вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного

уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (Short-Form-36 PC), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение до, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одной из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВП), анальгетика, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нейромышечный блокатор, противомикробный, антипсориазный, кортикостерический, анаболический стероид, эритропоэтин, иммунизацию, иммуноглобулин, иммуносупрессивный фактор, гормон роста, гормонозаместительное лекарственное средство; радиофармацевтический препарат, антидепрессант, антипсихотический препарат, стимулятор, лекарственный препарат астмы, агонист бета, ингаляционный стероид, эпинефрин или аналог, цитокин или антагонист цитокинов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен

способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL= $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ CO, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS= $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS= $20,3 \pm 24,6$ SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами,

получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое

улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (Short-Form-36 PC), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение до, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одной из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВП), анальгетика, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нейромышечный блокатор, противомикробный, антипсориазный, кортикостерический, анаболический стероид, эритропоэтин, иммунизацию, иммуноглобулин, иммуносупрессивный фактор, гормон роста, гормонозаместительное лекарственное средство; радиофармацевтический препарат, антидепрессант, антипсихотический препарат, стимулятор, лекарственный препарат астмы, агонист бета, ингаляционный стероид, эпинефрин или аналог, цитокин или антагонист цитокинов.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно

исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL= $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ CO, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS= $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS= $20,3 \pm 24,6$ SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (Short-Form-36 PC), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS), где способ дополнительно включает введение до, одновременно или после указанного

введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одной из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВП), анальгетика, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нейромышечный блокатор, противомикробный, антипсориазный, кортикостерический, анаболический стероид, эритропоэтин, иммунизацию, иммуноглобулин, иммуносупрессивный фактор, гормон роста, гормонозаместительное лекарственное средство; радиофармацевтический препарат, антидепрессант, антипсихотический препарат, стимулятор, лекарственный препарат астмы, агонист бета, ингаляционный стероид, эпинефрин или аналог, цитокин или антагонист цитокинов.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, включающей антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания

определяется по ответу, состоящему из одного или более следующих: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает активность заболевания, определяемую ответом, включающим в себя одно или более из среднего изменения качества жизни анкилозирующего спондилита (AS QoL), среднего изменения по сравнению с исходным уровнем по сводке физического компонента Short-Form-36 (PC-36), среднее изменение относительно исходного уровня в сводке по методу Шора формы-36 Mental Component (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели с повторными измерениями со смешанными эффектами (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS) или их эквивалент.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, где способ включает введение пациенту композиции, содержащей средство для приведения в контакт с ФНО, где пациент реагирует на лечение и идентифицируется как имеющий улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до приблизительно 52-й недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, содержащему одно или более из среднего изменения качества жизни анкилозирующего спондилита (AS QoL), среднего изменения качества жизни по сравнению с исходным уровнем (сводка физических компонентов по методу « SF-36 PCS »), среднего изменения по сравнению с исходным уровнем в сводке по типу « гортанный компонент » (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, где способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей средство для приведения в контакт с ФНО, где пациент реагирует на лечение и идентифицируется как имеющий улучшение активности заболевания на 16-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до приблизительно 52-й недели лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, содержащему одно или более из среднего изменения качества жизни анкилозирующего спондилита (AS QoL), среднего изменения качества жизни по сравнению с исходным

уровнем (сводка физических компонентов по методу « SF-36 PCS »), среднего изменения по сравнению с исходным уровнем в сводке по типу « гортанный компонент » (SF-36 MCS), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37 для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО антитело вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии, и при этом пациент, получавший лечение антителом к ФНО антителом, обеспечивает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и при этом пациент, получавший антитело к ФНО, обеспечивает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело вводят с метотрексатом (MTX) или без него, сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ), и при этом указанное антитело к ФНО вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии, и при этом пациент, получавший антитело к ФНО, обеспечивает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для применения при лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят путем в/винфузии, и при этом пациент, получавший лечение композицией, обеспечивает неактивное заболевание (ASDAS) ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически

приемлемый носитель или разбавитель для применения при лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и при этом пациент, получавший лечение композицией, обеспечивает неактивное заболевание ($<1,3$) ASDAS на 4 неделях лечения или на 2 неделе лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для применения при лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят с метотрексатом или без него (MTX), сульфасалазин (SSZ) или гидроксихлорохин (HCTQ), и при этом указанную композицию вводят посредством ВНУТРИВЕННОГО введения, и при этом пациент, получавший лечение композицией, получает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя: введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/винфузии, и при этом пациент, получавший лечение композицией, обеспечивает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя: введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и при этом пациент, получавший лечение композицией, обеспечивает неактивное заболевание ($<1,3$) ASDAS на 4 неделях лечения или на 2 неделе лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят с метотрексатом (MTX)

или без него, сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ), и при этом указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и при этом пациент, получавший лечение композицией, получает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) на 4 неделях лечения или через 2 недели лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии, и при этом пациент, получавший композицию, получает неактивное заболевание ASDAS ($<1,3$) через 4 недели лечения или через 2 недели лечения, где способ дополнительно включает введение, до, одновременно или после указанного (а) введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одной из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нейромышечного блокатора, противомикробного средства, антипсориатического средства, кортикостероидного средства, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизация, иммуноглобулин, иммуносупрессивный гормон роста, гормонозаместительное лекарственное средство, радиофармацевтический препарат, антидепрессант, антипсихотический препарат, стимулятор, лекарственный препарат астмы, агонист бета, ингаляционный стероид, эпинефрин или аналог, цитокин или антагонист цитокина.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО антитело вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии, и при этом на 16 неделе пациентов, получавших антитело к ФНО антитело, достигают среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: Функциональный индекс анкилозирующего спондилита в ванне (BASFI) = $-2,4 \pm 2,1$ среднеквадратичное отклонение (SD), индекс анкилозирующего спондилита в ванне (BASMI) = $-0,4 \pm 0,6$ SD, 36-элементная сводная информация по физическим компонентам для здоровья в форме горла (SF-36 PC) = $8,5 \pm 7,5$ CO, 36-элементная сводная информация по медицинским компонентам в форме горла (SF-36 MCS) = $6,5 \pm 9,1$ CO, и показатель жизни анкилозирующего спондилита (ASQoL) = $-5,4 \pm 5,0$

СО.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и при этом на неделе 16 пациентов, получавших антитело к ФНО, достигали среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI= $-2,4 \pm 2,1$ SD, BASMI= $-0,4 \pm 0,6$ SD, SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD и ASQoL= $-5,4 \pm 5,0$ SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят с метотрексатом или без него (MTX), Сульфасалазин (SSZ) или гидроксихлорохин (HCTQ) и антитело к ФНО вводят путем внутривенной (В/В) инфузии в дозе 2 мг/кг, и где на 16 неделе пациентов, получавших антитело к ФНО антитело, достигают среднего изменения одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI= $-2,4 \pm 2,1$ SD, BASMI= $-0,4 \pm 0,6$ SD, SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD и ASQoL= $-5,4 \pm 5,0$ SD.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят посредством в/винфузии, и при этом на 16 неделе пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, достигают среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI= $-2,4 \pm 2,1$ SD, BASMI= $-0,4 \pm 0,6$ SD, SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD и ASQoL= $-5,4 \pm 5,0$ SD.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, после этого каждые 8 недель (один раз в 8 недель), и при этом на 16 неделе пациентов, получавших антитело к ФНО, достигали среднего изменения относительно исходного уровня одного или более

критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI=-2,4 ± 2,1 SD, BASMI=-0,4 ± 0,6 SD, SF-36 PCS=8,5 ± 7,5 SD, SF-36 MCS=6,5 ± 9,1 SD и ASQoL=-5,4 ± 5,0 SD.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита, где указанную композицию вводят с метотрексатом (MTX) или без него, сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ), а композицию вводят посредством в/винфузии, и при этом на неделе 16 пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, достигают среднего изменения по сравнению с исходным уровнем одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI=-2,4 ± 2,1 SD, BASMI=-0,4 ± 0,6 SD, SF-36 PCS=8,5 ± 7,5 SD, SF-36 MCS=6,5 ± 9,1 SD и ASQoL=-5,4 ± 5,0 SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии, и при этом на 16 неделе пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, достигают среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI=-2,4 ± 2,1 SD, BASMI=-0,4 ± 0,6 SD, SF-36 PCS=8,5 ± 7,5 SD, SF-36 MCS=6,5 ± 9,1 SD и ASQoL=-5,4 ± 5,0 SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, после этого каждые 8 недель (один раз в 8 недель), и где на 16 неделе пациентов, получавших антитело к ФНО, достигали среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI=-2,4 ± 2,1 SD, BASMI=-0,4 ± 0,6 SD, SF-36 PCS=8,5 ± 7,5 SD, SF-36 MCS=6,5 ± 9,1 SD и ASQoL=-5,4 ± 5,0 SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC),

содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят с метотрексатом (MTX) или без него, сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ), и при этом композицию вводят посредством в/в инфузии, и при этом на неделе 16 пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, достигают среднего изменения по сравнению с исходным уровнем одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI= $-2,4 \pm 2,1$ SD, BASMI= $-0,4 \pm 0,6$ SD, SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD и ASQoL= $-5,4 \pm 5,0$ SD.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии, и при этом на 16 неделе пациентов, получавших лечение антителом к ФНО, достигают среднего изменения относительно исходного уровня одного или более критериев, выбранных из группы, состоящей из: BASFI= $-2,4 \pm 2,1$ SD, BASMI= $-0,4 \pm 0,6$ SD, SF-36 PCS= $8,5 \pm 7,5$ SD, SF-36 MCS= $6,5 \pm 9,1$ SD и ASQoL= $-5,4 \pm 5,0$ SDA, метод дополнительно включает введение перед, одновременно или после указанного (а) введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии и при этом $\geq 65\%$ пациентов, получающих лечение, достигают ASAS20 на 16-й неделе лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37,

для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят путем внутривенной (В/В) инфузии, и при этом $\geq 65\%$ получающих лечение пациентов достигают ASAS20 на 16 неделе лечения с различием в лечении (улучшением по сравнению с плацебо) $\geq 45\%$.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят посредством внутривенной (В/В) инфузии в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и где $\geq 65\%$ пациентов, получающих лечение, достигают ASAS20 на неделе 16 лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено по меньшей мере одно выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, для применения в инактивации активного анкилозирующего спондилита, где указанное антитело к ФНО вводят путем внутривенной (В/В) инфузии с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них, и при этом $\geq 65\%$ получающих лечение пациентов достигают ASAS20 на 16-й неделе лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя: введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/винфузии, и при этом $\geq 65\%$ пациентов, получающих лечение, достигают значения ASAS20 на неделе 16 лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/винфузии, и при этом $\geq 65\%$ получающих лечение пациентов достигают ASAS20 на неделе 16 лечения, при этом различие в лечении (улучшение по сравнению с плацебо) составляет $\geq 45\%$.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает в себя введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего,

имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят посредством в/в инфузии в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого, и где $\geq 65\%$ пациентов, получающих лечение, достигают значения ASAS20 на неделе 16 лечения.

В настоящем изобретении предложен способ лечения связанного с ФНО состояния, где связанное с ФНО состояние представляет собой активный анкилозирующий спондилит, при этом способ включает введение композиции, содержащей выделенное антитело к ФНО млекопитающего, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, где указанную композицию вводят путем в/в инфузии с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без него, и где $\geq 65\%$ пациентов, получающих лечение, достигают ASAS20 на неделе 16 лечения.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **Фиг. 1** показано графическое представление, демонстрирующее анализ способности мАт TNV в супернатантах клеток гибридомы ингибировать связывание ФНО α с рекомбинантным ФНО-рецептором. Различные количества супернатантов клеток гибридомы, содержащих известные количества мАт TNV, предварительно инкубировали с фиксированной концентрацией (5 нг/мл) 125 I-меченного ФНО α . Смесь переносили в 96-луночные планшеты Optiplates, которые были предварительно покрыты p55-SF2, рекомбинантным гибридным белком рецептора ФНО/IgG. Количество ФНО α , связавшегося с рецептором p55 в присутствии мАт, определяли после отмывки от несвязанного материала и подсчета с помощью гамма-счетчика. Хотя в этих экспериментах исследовали восемь образцов мАт TNV, для простоты не показаны три мАт, которые по данным анализов последовательностей ДНК были идентичны одному из других мАт TNV (см. Раздел 5.2.2). Каждый образец испытывали в двух повторностях. Представленные результаты отражают репрезентативные данные, полученные в ходе двух независимых экспериментов.

На **Фиг. 2А-В** показаны последовательности ДНК переменных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии представляет собой ген DP-46. TNV обозначает, что показанная последовательность представляет собой последовательность TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. Первые три нуклеотида в последовательности TNV определяют кодон инициации трансляции Met. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 19 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации переменного участка. Трансляция аминокислот (однобуквенные аббревиатуры), начиная со зрелого мАт, показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как

к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии. В тяжелых цепях мАт TNV используется соединительная область J6.

На **Фиг. 3** показаны последовательности ДНК переменных областей легкой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии является репрезентативным членом семейства V γ /38K человеческих генов зародышевой линии переменного участка цепи каппа. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 16 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации переменного участка. Аминокислотная трансляция зрелого мАт (однобуквенные сокращения) показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии. В легких цепях мАт TNV используют соединительную последовательность J3.

На **Фиг. 4** показаны выведенные аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной последовательности (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена зародышевой линии DP-46 показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV идентична гену зародышевой линии. TNV148(B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. TNV означает, что показанная последовательность относится ко всем мАт TNV, если не показана другая последовательность. Штриховые линии в последовательности зародышевой линии (CDR3) означают, что последовательности не известны или отсутствуют в гене зародышевой линии.

На **Фиг. 5** показаны выведенные аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной последовательности (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена легкой цепи зародышевой линии V γ /38K-типа показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV

идентична гену зародышевой линии. TNV148(B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. «Все» означает, что показанная последовательность относится к TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и TNV186.

На **Фиг. 6** показаны схематические изображения экспрессирующих тяжелую и легкую цепи плазмид, которые применяют для получения гTNV148B-экспрессирующих клеток С466. р1783 - плазида тяжелой цепи, а р1776 - плазида легкой цепи. Домены, кодирующие переменную и константную области гTNV148B, показаны черными прямоугольниками. Энхансеры иммуноглобулинов в интронах J-C показаны серыми прямоугольниками. Показаны значимые сайты рестрикции. Ориентация плазмидов показана таким образом, что транскрипция генов антител проходит в направлении по часовой стрелке. Плазида р1783 имеет длину 19,53 т.п.н., а плазида р1776 имеет длину 15,06 т.п.н. Известны полные нуклеотидные последовательности обеих плазмид. Последовательность, кодирующая переменную область в р1783, может быть легко заменена другой последовательностью переменной области тяжелой цепи путем замены рестрикционного фрагмента BsiWI/BstBI. Последовательность, кодирующая переменную область в р1776, может быть заменена другой последовательностью переменной области путем замены рестрикционного фрагмента SalI/AflII.

На **Фиг. 7** показано графическое представление анализов кривых роста пяти продуцирующих гTNV148B клеточных линий. Культуры инициировали на 0 день, высевая клетки во флаконы Т75 в среде I5Q+МНХ с плотностью жизнеспособных клеток $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в объеме 30 мл. Используемые в этих исследованиях клеточные культуры находились в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и субклонирования. В последующие дни клетки в Т-флаконах тщательно ресуспендировали и извлекали аликвоту культуры 0,3 мл. Исследования кривых роста завершали, когда количество клеток падало ниже $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Количество живых клеток в аликвоте определяли по исключению трипанового синего, а оставшуюся часть аликвоты хранили для последующего определения концентрации мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

На **Фиг. 8** показано графическое представление сравнения скоростей роста клеток в присутствии различных концентраций МНХ для селекции. Клеточные субклоны С466А и С466В размораживали в среде, не содержащей МНХ (IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамин) и культивировали в течение еще двух дней. Впоследствии обе клеточные культуры разделяли на три культуры, которые или не содержали МНХ, или содержали 0,2X МНХ или 1X МНХ. Через день в свежие флаконы Т75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 часа в течение одной недели. Время удвоения в течение первых 5 дней рассчитывали по формуле в SOP PD32.025, и эти данные показаны над столбцами.

На **Фиг. 9** показаны графические изображения стабильности продукции мАт с течением времени для двух продуцирующих гTNV148B клеточных линий. Субклоны

клеток, находившиеся в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и субклонирования, использовали для запуска длительных серийных культур в 24-луночных культуральных чашках. Клетки культивировали в среде I5Q с селекцией по МНХ и без нее. Клетки непрерывно пересевали путем разделения культур каждые 4-6 дней для поддержания новых жизнеспособных культур, в то время как предыдущие культуры расходовали. Аликвоты супернатанта расходных клеток собирали вскоре после вывода культур в расход и хранили до определения концентраций мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

На **Фиг. 10** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 4. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутривентральную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг. При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым в период 3-7 недель. Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования.

На **Фиг. 11А-С** представлено прогрессирование тяжести заболевания, по данным индекса артрита, как представлено в примере 4. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг сА2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг сА2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг сА2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

На **Фиг. 12** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 5. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на

основании массы тела и получали внутрибрюшинную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытуемого препарата оценивали в группах 1-6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

На **Фиг. 13А-С** представлены графики, демонстрирующие прогрессирование тяжести заболевания в примере 5 по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные, получавшие 3 мг/кг TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сА2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3-5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сА2.

На **Фиг. 14** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 6. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу антитела (сА2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сА2.

На **Фиг. 15** представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита, как показано в примере 6. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, где 5 мг/кг сА2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1-3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сА2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сА2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами

лечения (за исключением контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

На **Фиг. 16** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 7. Сравнение эффективности однократного внутрибрюшинного введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

На **Фиг. 17** представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита, как показано в примере 7. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг cA2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг cA2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутрибрюшинного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг cA2, не давала существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг cA2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в AI между группой, получавшей 1 мг/кг cA2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148B, в любой момент исследования.

На **Фиг. 18** показана схема исследования для испытаний Simponi (голимумаб) при внутривенном введении субъектам с активным анкилозирующим спондилитом (AS)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены выделенные, рекомбинантные и/или синтетические антитела к ФНО человека, примата, грызуна, млекопитающего, химерные, гуманизированные или CDR-привитые антитела, содержащие все вариабельные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и (или) все вариабельные участки CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, 5 и 6 и к ним антиидиотипические антитела, а также композиции и кодирующие молекулы нуклеиновых кислот, содержащие по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере одно антитело к ФНО или антиидиотипическое антитело. Настоящее изобретение дополнительно включает в себя, без ограничений, способы получения и применения таких нуклеиновых кислот и антител, а также антиидиотипические антитела, включая диагностические и терапевтические композиции, способы и устройства.

В контексте настоящего документа термины «антитело к фактору некроза опухоли альфа», «антитело к ФНО», «участок антитела к ФНО» или «фрагмент антитела к ФНО» и/или «вариант антитела к ФНО» и т. п. включают любой белок или пептид, содержащий

по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна определяющая комплементарность (CDR) область тяжелой или легкой цепи, либо ее связывающий лиганд участок, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, либо по меньшей мере один участок рецептора или связывающего белка ФНО, который можно встраивать в антитело настоящего изобретения. Такое антитело необязательно дополнительно воздействует на специфичный лиганд, например, без ограничений, такое антитело модулирует, снижает, повышает, выступает антагонистом, выступает агонистом, уменьшает, ослабляет, блокирует, ингибирует, уничтожает и/или препятствует по меньшей мере одной активности или связыванию ФНО, либо активности или связыванию рецептора ФНО *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. В качестве не имеющего ограничительного характера примера приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант настоящего изобретения может связываться с по меньшей мере одной молекулой ФНО или ее определенными участками, вариантами или доменами. Приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант может также необязательно влиять на по меньшей мере один вид активности или функции ФНО, например, без ограничений, синтез РНК, ДНК или белка, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО. Предполагается, что термин «антитело» будет дополнительно охватывать антитела, фрагменты расщепления, их определенные участки и варианты, включая миметики антител, или содержать участки антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или участка, включая одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ФНО млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с ФНО или его участками, включая, без ограничений, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), Fcab (например, после расщепления плазмином), pFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), Fv или scFv (например, полученные способами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, выше).

Такие фрагменты могут быть получены путем ферментативного расщепления, синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела могут также быть получены в различных укороченных формах с использованием генов антител, в которые были введены один или более стоп-кодона ближе к 5' концу от сайта естественной остановки. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи F(ab')₂, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен CH₁ и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные участки антител можно химически соединять обычными

способами или получать в виде единого белка способами генной инженерии.

В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены C_L , C_H (например, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), шарнир, домены V_L , V_H) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т. п.) и других млекопитающих определяются особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства, семейства. Химерные антитела дополнительно включают любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется или ослабевает иммуногенность у человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела. Следует отметить, что человеческое антитело может быть спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Когда человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может дополнительно содержать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

Можно также применять биспецифические, гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания относится к по меньшей мере одному белку ФНО, а другая - к любому другому антигену. Способы получения биспецифических антител известны специалистам в данной области. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, где только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно выполняют путем аффинной хроматографии, является довольно трудоемким процессом с низким выходом продукта. Аналогичные процедуры описаны, например, в WO 93/08829, патентах США № 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333,

5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, публикациях WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Специфичные к ФНО антитела (также называемые антителами к ФНО), используемые в способах и композициях настоящего изобретения, могут необязательно характеризоваться высокой аффинностью связывания с ФНО, где необязательно и предпочтительно они имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, где отдельные компоненты, такие как переменная область, константная область и каркас, по отдельности и/или в совокупности, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность. Антитела, которые можно использовать в изобретении, необязательно характеризуются способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. Под «низкой иммуногенностью» в настоящем документе понимают индукцию значимых ответов антител НАНА, НАСА или НАМА у менее около 75% или предпочтительно у менее около 50% получающих лечение пациентов, и/или индукцию низких титров у получающих лечение пациентов (менее около 300, предпочтительно менее около 100, по результатам измерения иммуноферментным анализом с двойным антигеном) (см. публикацию Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

Полезные свойства. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно использовать для продукции по меньшей мере одного антитела к ФНО, или его определенного варианта, которые можно использовать для определения эффекта в клетке, ткани, органе или у животного (включая млекопитающих и человека), для диагностики, отслеживания, модулирования, лечения, ослабления, профилактики возникновения или для уменьшения симптомов по меньшей мере одного связанного с ФНО состояния, выбранного из, без ограничений, по меньшей мере одного из иммунного нарушения или заболевания, сердечно-сосудистого нарушения или заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического нарушения или заболевания.

Такой способ может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, организм животного или пациента, которым требуется такое модулирование, лечение, ослабление, предотвращение или уменьшение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное количество может содержать количество от около 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсного), многократного или непрерывного введения, или для достижения концентрации в сыворотке крови 0,01-5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или любой

эффективный интервал или значение, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях. Ссылки. Все цитируемые в настоящем документе публикации или патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки, поскольку они показывают уровень развития на момент настоящего изобретения и/или предоставляют описание и необходимую информацию для настоящего изобретения. К публикациям относятся любые научные или патентные публикации, или любая информация, доступная на любых носителях, включая все форматы записи, электронные и печатные форматы. Следующие ниже источники полностью включены в настоящий документ путем ссылки: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Антитела настоящего изобретения. По меньшей мере одно антитело к ФНО настоящего изобретения, содержащее все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, можно необязательно получать с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, immortalized клетки или клональной популяции immortalized клеток, как хорошо известно специалистам в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Человеческие антитела, специфичные к человеческим белкам ФНО или их фрагментам, можно получать в ответ на соответствующий иммуногенный антиген, такой как выделенный белок ФНО и/или его участок (включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды). Другие специфичные или общие антитела млекопитающих можно получать аналогичным образом. Получение иммуногенных антигенов и продукцию моноклонального антитела можно выполнять любым приемлемым способом.

В одном подходе гибридомы получают путем слияния приемлемой immortalized клеточной линии (например, клеточной линии миеломы, такой как, без ограничений, 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, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, или т. п., или гетеромиеломы, продукты их слияния, или любую клетку, или гибридную клетку,

производную из них, или любую другую приемлемую клеточную линию, известную в данной области. См., например, www.atcc.org, www.lifetech.com. и т. п., где антителопродуцирующие клетки, такие как, без ограничений, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие иммунные или клетки, содержащие В-клетки, или любые другие клетки, экспрессирующие константные, или переменные, или каркасные, или CDR-последовательности тяжелой или легкой цепи, в виде эндогенной или гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантных или эндогенных, относящихся к вирусам, бактериям, водорослям, прокариотам, амфибиям, насекомым, рептилиям, рыбам, млекопитающим, грызунам, лошадям, птицам, козам, овцам, приматам, эукариотам геномных ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальных ДНК или РНК, ДНК или РНК хлоропластов, гяРНК, мРНК, тРНК, одно-, двух-или трехцепочечных, гибридизированных и т. п., или любых их комбинаций. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, Immunology, выше, глава 2, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов человека или других приемлемых животных, которые были иммунизированы интересующим антигеном. Для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, его определенный фрагмент или вариант настоящего изобретения, можно также использовать любую другую приемлемую клетку-хозяина. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделять с помощью селективных условий культивирования или других известных приемлемых способов и клонировать путем предельного разведения или сортировки клеток или других известных способов. Клетки, продуцирующие антитела с требуемой специфичностью, могут быть выбраны с помощью приемлемого анализа (например, ИФА).

Можно применять другие приемлемые способы продукции или выделения антител требуемой специфичности, включая, без ограничений, способы отбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, без ограничений, библиотеки дисплея бактериофагов, рибосом, олигонуклеотидов, РНК, кДНК или т. п.; например, производства компаний Cambridge antibody Technologies, гр. Кембриджшир, Великобритания; MorphoSys, с. Мартинсайд/к. Планегг, Германия; Biovation, г. Абердин, Шотландия, Великобритания; BioInvent, г. Лунд, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, г. Беркли, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (12.05.94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Хома); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483,

5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, в настоящее время, Applied Molecular Evolution (AME); все включены в настоящий документ путем ссылки), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. 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), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки, как и смежные патенты и заявки), которые способны продуцировать набор человеческих антител, как известно специалистам в данной области и/или описано в настоящем документе. Такие способы включают, без ограничений, рибосомный дисплей (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)); технологии продукции антител из одиночной клетки (например, способ получения антител из отобранных лимфоцитов (SLAM) (патент США № 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, г. Кембридж, штат Массачусетс, США; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); отбор В-клеток (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)).

Кроме того, можно применять и хорошо известные специалистам в данной области способы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу гуманизированное или модифицированное геной инженерией антитело имеет один или более аминокислотных остатков из источника, не относящегося к человеку, например, без ограничений, мыши, крысы, кролика, примата (исключая человека) или других млекопитающих. Эти аминокислотные остатки человеческого происхождения часто называют «импортированными» остатками, поскольку их обычно берут из «импортированных» переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.

Известные последовательности Ig человека описаны во множестве публикаций и веб-сайтов, например:

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/AEPStart.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.cnusc.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;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.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.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Как известно специалистам в данной области, такие импортированные последовательности можно применять для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, периода полужизни или любой другой приемлемой характеристики. Как правило, сохраняются целиком или частично нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей замещают человеческими или другими аминокислотами. Антитела могут также быть необязательно гуманизированы с

сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные антитела можно необязательно получать в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с помощью трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известными специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, демонстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. Исследование этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, т. е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из консенсусной и импортированной последовательностей так, чтобы получить требуемую характеристику антитела, такую как повышенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам). В целом остатки CDR напрямую и в очень значительной степени влияют на связывание с антигеном. Гуманизацию или конструирование антител настоящего изобретения можно выполнять с помощью любого известного способа, такого как, без ограничений, способ, описанный в: 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), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, РСТ: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, где каждый полностью включен в настоящий документ путем ссылки, включая приведенные в нем ссылки.

Антитело к ФНО можно также необязательно создавать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата (за исключением человека) и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ФНО, можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с использованием приемлемых способов, таких как описанные в настоящем документе.

Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными способами (например, без ограничений, описанными в патентах США №: 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 и 5,789,650, выданных Lonberg et al.; выданных Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et

al. патент США № 5,545,807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, в 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) и Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996), где каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки). По существу такие мыши имеют по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен или который можно подвергать функциональной перестройке. Эндогенный локус иммуноглобулина у таких мышей можно разрушать или делетировать, чтобы таким образом лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

Скрининг антител на специфичность связывания со сходными белками или фрагментами удобно проводить с использованием библиотек пептидного дисплея. Данный способ включает скрининг больших наборов пептидов для выявления отдельных пептидов, имеющих требуемую функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках пептидных дисплеев хорошо известен специалистам в данной области. Длина отображаемых пептидных последовательностей может составлять от 3 до 5000 или более аминокислот, зачастую длина составляет 5-100 аминокислот и часто длина составляет от около 8 до 25 аминокислот. В дополнение к способам получения пептидных библиотек прямым химическим синтезом, было описано несколько способов с рекомбинантными ДНК. Один из таких способов предусматривает отображение пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278. Другие системы для создания пептидных библиотек имеют аспекты как способов химического синтеза *in vitro*, так и рекомбинантных способов. См. патентные публикации РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5,658,754; и 5,643,768. В продаже имеются библиотеки пептидных дисплеев, векторы и наборы для скрининга таких производителей, как Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (гр. Кембриджшир, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, выданные Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, выданные Duax, 5427908, 5580717, выданные Affymax; 5885793, выданный Cambridge antibody Technologies; 5750373, выданный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, выданные Хоме, Colligan, выше; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения можно также получать с использованием по

меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы и т. п., которые продуцируют такие антитела в своем молоке. Таких животных можно создавать с помощью известных способов. См., например, без ограничений, патенты США № 5 827 690; 5 849 992; 4 873 316; 5 849 992; 5 994 616; 5 565 362; 5,304,489 и т. п., каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения можно дополнительно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничений, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или полученных из них клеточных культурах. В качестве не имеющего ограничительного характера примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцируемого промотора. См., например, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Кроме того, трансгенный маис использовали для экспрессии белков млекопитающих на уровне промышленного производства, где их биологическая активность была эквивалентна активности белков, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Антитела, включая и фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), также продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе из семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) и приведенные в этой публикации ссылки. Таким образом, антитела настоящего изобретения можно также продуцировать с использованием трансгенных растений в соответствии с известными способами. См. также, например, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); и приведенные в этих публикациях ссылки. См. также по существу применительно к экспрессии антител в растениях, без ограничений, каждый из приведенных выше источников, полностью включенный в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения могут связываться с человеческим ФНО в широком интервале аффинностей (K_D). В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно человеческое мАт настоящего изобретения может необязательно связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью. Например, мАт человека может связываться с человеческим ФНО с показателем K_D , равным около 10^{-7} или менее М, например, без ограничений, 0,1-9,9 (или в любом интервале, или с любым значением в нем) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , или в любом интервале, или с любым значением в нем.

Аффинность или авидность антитела для антигена можно определять экспериментально любым приемлемым способом (см., например, 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); а также способами, описанными в настоящем документе). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может изменяться в зависимости от измерения в разных условиях (например, концентрации солей, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена (например, K_D , K_a , K_d) предпочтительно выполнять в стандартизованных растворах антитела и антигена и в стандартизованном буфере, таком как буфер, описанный в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновых кислот. Используя приведенную в настоящем документе информацию, такую как нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70-100% смежных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, их указанные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности, или депонированный вектор, содержащий по меньшей мере одну из этих последовательностей, может быть получена молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующая по меньшей мере одно антитело к ФНО, содержащее все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, с использованием способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в данной области.

Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут иметь форму РНК, такой как мРНК, гяРНК, тРНК или любой другой формы, или форму ДНК, включая, без ограничений, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования, путем синтеза или любых их комбинаций. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной, одноцепочечной или комбинированной. Любая часть по меньшей мере одной цепи ДНК или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как прямая цепь, или не кодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронами, например, без ограничений, для по меньшей мере одного определенного участка по меньшей мере одного CDR, такого как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 1-3) или легкой цепи (например, SEQ ID NO: 4-6; молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность антитела к ФНО или переменной области (например, SEQ ID NO:7,8); и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от нуклеотидных последовательностей, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ФНО, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Разумеется, генетический код хорошо известен специалистам в данной области.

Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание таких вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к ФНО настоящего изобретения. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие ограничительного характера примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения включают SEQ ID NO:10, 11, 12, 13, 14, 15, соответствующие не имеющим ограничительного характера примерам нуклеиновой кислоты, кодирующей соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, переменную область HC и переменную область LC.

Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ФНО, могут включать, без ограничений, молекулу, отдельно кодирующую аминокислотную последовательность фрагмента антитела; кодирующую последовательность для полноразмерного антитела или его участка; кодирующую последовательность для антитела, фрагмента или участка, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность для по меньшей мере одного сигнального лидерного или слитого пептида при наличии или в отсутствие вышеуказанных дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, включающими, без ограничений, некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые участвуют в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, которые обеспечивают дополнительную функциональность. Таким образом, кодирующая антитело последовательность может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, что облегчает очистку слитого антитела, содержащего фрагмент или участок антитела.

Полинуклеотиды, селективно гибридизующиеся с описанным в настоящем документе полинуклеотидом. В настоящем изобретении обеспечены выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации гибридизуются с полинуклеотидом, описанным в настоящем документе. Таким образом, полинуклеотиды настоящего варианта осуществления можно применять для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, содержащих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды настоящего изобретения можно использовать для идентификации, выделения или амплификации частичных или полноразмерных клонов в депонированной библиотеке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды представляют собой последовательности геномной ДНК или кДНК, выделенные или иным образом комплементарные к кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

Библиотека кДНК предпочтительно содержит по меньшей мере 80% полноразмерных последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 85% или 90% полноразмерных последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% полноразмерных последовательностей. Библиотеки кДНК можно нормализовать для увеличения представительства редких последовательностей. Для последовательностей с низкой или умеренной идентичностью относительно комплементарных последовательностей гибридизацию обычно, но не исключительно осуществляют в условиях низкой или умеренной жесткости. Для последовательностей с большей идентичностью необязательно применяют условия средней и высокой жесткости. Условия низкой жесткости допускают селективную гибридизацию последовательностей с уровнем идентичности около 70%, и их можно применять для идентификации ортологических или паралогических последовательностей.

Необязательно полинуклеотиды настоящего изобретения кодируют по меньшей мере часть антитела, кодируемого полинуклеотидами, описанными в настоящем документе. Полинуклеотиды настоящего изобретения охватывают последовательности нуклеотидов, которые можно использовать для селективной гибридизации с полинуклеотидом, кодирующим антитело настоящего изобретения. См., например, Ausubel, выше; Colligan, выше, каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Конструирование нуклеиновых кислот. Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получать с помощью (а) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (с) способов очистки или их комбинаций.

Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду настоящего изобретения. Например, в нуклеиновую кислоту можно встраивать сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида. Кроме того, можно встраивать транслируемые последовательности, чтобы облегчить выделение транслированного полинуклеотида настоящего изобретения. К примеру, удобным средством очистки белков настоящего изобретения служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота настоящего изобретения, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно представлять собой вектор, адаптер или линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или улучшать введение полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, экспрессионных векторов, адаптеров и линкеров хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, *выше*).

Рекомбинантные способы конструирования нуклеиновых кислот. Композиции выделенных нуклеиновых кислот настоящего изобретения, таких как РНК, кДНК, геномная ДНК или любая их комбинация, можно получать из биологических источников с помощью любого числа способов клонирования, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для идентификации желательной последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК используют олигонуклеотидные зонды, которые селективно гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами настоящего изобретения. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномных библиотек хорошо известно специалистам в данной области. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, *выше*).

Способы скрининга и выделения нуклеиновых кислот. Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью зонда на основании последовательности полинуклеотида настоящего изобретения, такого как описанные в настоящем документе. Зонды можно использовать для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделять гомологичные гены в тех же самых или разных организмах. Специалистам в данной области должно быть понятно, что для анализа можно использовать различные степени жесткости гибридизации; и что жесткой может быть либо гибридизация, либо среда для отмывки. По мере того как условия гибридизации становятся более жесткими, требуемая для образования дуплекса степень комплементарности между зондом и мишенью возрастает. Жесткость условий можно контролировать одним или более из следующих параметров: температура, ионная сила, рН и присутствие частично денатурирующего растворителя, такого как формамид. Например, жесткость условий гибридизации обычно изменяют путем смены полярности раствора реагентов, например посредством изменения концентрации формамида в интервале от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичности последовательностей), необходимая для детектируемого связывания, варьирует в соответствии с жесткостью среды для гибридизации и/или среды для отмывки. Оптимальная степень комплементарности составляет 100%, или 70-100%, или любой интервал, или значение в нем. Однако следует понимать, что небольшие вариации последовательностей в зондах и праймерах возможно компенсировать путем уменьшения строгости среды гибридизации и/или среды для промывания.

Способы амплификации РНК или ДНК хорошо известны специалистам в данной области и могут применяться в соответствии с настоящим изобретением без лишних экспериментов на основании представленных в настоящем документе инструкций и рекомендаций.

Известные способы амплификации ДНК или РНК включают, без ограничений, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и связанные с ней процессы амплификации (см., например, патенты США № 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, выданные Mullis, et al.; 4,795,699 и 4,921,794, выданные Tabor, et al.; 5,142,033, выданный Innis; 5,122,464, выданный Wilson, et al.; 5,091,310, выданный Innis; 5,066,584, выданный Gyllensten, et al;

4,889,818, выданный Gelfand, et al; 4,994,370, выданный Silver, et al; 4,766,067, выданный Biswas; 4,656,134, выданный Ringold), и опосредованную РНК амплификацию, в которой используют в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК обратную РНК к последовательности-мишени (патент США № 5,130,238, выданный Malek, et al, с торговым названием NASBA), полное содержание всех этих ссылок включено в настоящий документ путем ссылки. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов настоящего изобретения, и связанных с ними генов прямо из библиотек геномной ДНК или кДНК. ПЦР и другие способы амплификации *in vitro* можно также использовать, например, для клонирования последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, которые требуется экспрессировать, чтобы применять зонды нуклеиновых кислот для обнаружения наличия желательной мРНК в пробах, секвенирования нуклеиновых кислот или иных целей. Примеры способов, достаточные для определения специалистам в данной области способов амплификации *in vitro*, можно найти в Berger, выше, Sambrook, выше, и Ausubel, выше, а также в Mullis, et al., патенте США № 4,683,202 (1987); и Innis, et al., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Имеющиеся в продаже наборы для амплификации геномной последовательности ПЦР известны специалистам в данной области. См., например, набор Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Кроме того, возможно использование, например, белка 32 гена T4 (Boehringer Mannheim) для увеличения выхода реакции при ПЦР длинных фрагментов.

Синтетические способы конструирования нуклеиновых кислот. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно также получать прямым химическим синтезом с помощью известных способов (см., например, Ausubel, et al., выше). Химическим синтезом по существу получают одноцепочечный олигонуклеотид, который можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью либо полимеризации с ДНК-полимеразой и одиночной цепью в качестве матрицы. Специалистам в данной области известно, что химический синтез ДНК может ограничиваться последовательностями длиной в 100 или более оснований, однако можно лигировать короткие последовательности, получая более длинные последовательности.

Рекомбинантные экспрессионные кассеты. В настоящем изобретении дополнительно обеспечены рекомбинантные экспрессионные кассеты, содержащие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения. Последовательность нуклеотидов настоящего изобретения, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело настоящего изобретения, можно использовать для конструирования рекомбинантной экспрессионной кассеты, которую можно вводить в по меньшей мере одну требуемую клетку-хозяина. Рекомбинантная экспрессионная кассета, как правило, содержит полинуклеотид настоящего изобретения, функционально

связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют транскрипцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот настоящего изобретения можно применять как гетерологичные, так и негетерологичные (т. е. эндогенные) промоторы.

В некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промотора, энхансера или других элементов, можно встраивать в соответствующее положение (выше, ниже или в интроне) негетерологичной формы полинуклеотида настоящего изобретения таким образом, чтобы стимулировать или подавлять экспрессию полинуклеотида настоящего изобретения. Например, эндогенные промоторы можно изменять *in vivo* или *in vitro* путем мутации, делеции и/или замены.

Векторы и клетки-хозяева. Настоящее изобретение также относится к векторам, включающим выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, клеткам-хозяевам, созданным методом генной инженерии с применением рекомбинантных векторов, и к выработке по меньшей мере одного антитела к ФНО с применением хорошо известных специалистам рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., выше; Ausubel, et al., выше; каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. Как правило, плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, его можно упаковывать *in vitro* с помощью приемлемой упаковочной клеточной линии и впоследствии вводить внутрь клеток-хозяев.

Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминирования транскрипции, а в транскрибируемой области - сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодировующий участок зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкторами, предпочтительно содержит сайт инициации трансляции в начале, а также терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, где для экспрессии в клетках млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничений, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4,399,216; 4 634 665; 4 656 134; 4 956 288; 5 149 636; 5,179,017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США № 5 122 464; 5 770 359; 5,827,739) для культуры эукариотических клеток и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях или прокариотах (вышеуказанные патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Пригодные культуральные среды и условия для

вышеуказанных клеток-хозяев известны в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструкта в клетку-хозяина можно осуществлять путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных способов. Такие способы описаны в данной области, например, в Sambrook выше, главы 1-4 и 16-18; Ausubel выше, главы 1, 9, 13, 15, 16.

По меньшей мере одно антитело настоящего изобретения можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как гибридный белок, и оно может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, особенно заряженные аминокислоты, для повышения стабильности и персистенции антитела в клетке-хозяине, а также в ходе очистки или в ходе последующих манипуляций и хранения. Кроме того, к антителу настоящего изобретения для упрощения очистки можно добавлять пептидные звенья. Такие области можно удалять перед получением антитела или по меньшей мере одного его фрагмента. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например, Sambrook, упомянутое, главы 17.29-17.42 и 18.1-18.74; Ausubel, упомянутое, главы 16, 17 и 18.

Специалистам в данной области известно множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок настоящего изобретения.

В альтернативном варианте осуществления нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем манипуляции) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области, например, описаны в патентах США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 и 5,733,761, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки.

Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных участков или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используют в виде монослоев клеток, однако можно также использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности линии клеток COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т. п., например, производства Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org). Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Более предпочтительны клетки-хозяева P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851). В особенно предпочтительном

варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линий P3X63Ab8.653 или SP2/0-Ag14.

Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5 168 062; 5,385,839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1 alpha (патент США № 5,266,491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого Т-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для получения нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению можно использовать и другие известные и/или поставляемые клетки, например по каталогу American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор обычно встраивают последовательности полиаденилирования или терминации транскрипции. Например, в качестве последовательности терминации можно использовать последовательность полиаденилирования из гена бычьего гормона роста. Возможно также добавление последовательностей для точного сплайсинга транскрипта. Примером последовательности сплайсинга служит интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно добавлять последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине, известные в данной области.

Очистка антитела. Антитело к ФНО может быть извлечено и очищено из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включающими, без ограничений, очистку на белке А, осаждение сульфатом аммония или спиртом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилapatите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, где каждая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Антитела настоящего изобретения включают очищенные естественным путем продукты, продукты химического синтеза и продукты, получаемые при помощи рекомбинантных технологий из эукариотических клеток-хозяев, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в способе рекомбинантной продукции, антитело настоящего изобретения может быть гликозилированным или может быть негликозилированным, где гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие способы описаны в

многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например Sambrook, выше, разделы 17.37-17.42; Ausubel, выше, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, Protein Science, выше, главы 12-14, все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ФНО

Выделенные антитела настоящего изобретения, содержащие все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, включают аминокислотные последовательности антител, описанные в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, либо любого выделенного или полученного антитела. Предпочтительно человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим ФНО и таким образом частично или по существу полностью нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности белка. Антитело, или его определенный участок или вариант, которые частично или предпочтительно по существу нейтрализуют по меньшей мере один вид биологической активности по меньшей мере одного белка или фрагмента ФНО, может связывать белок или фрагмент и таким образом ингибировать активности, опосредованные связыванием ФНО с рецептором к ФНО или с другими зависимыми от ФНО или опосредованные им механизмами. В контексте настоящего документа термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое может ингибировать зависимость от ФНО активность на около 20-120%, предпочтительно на по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более в зависимости от способа анализа. Способность антитела к ФНО ингибировать зависимость от ФНО активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого способа анализа белка ФНО или его рецептора, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Человеческое антитело изобретения может представлять собой антитело любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т. п.) или изотипа и может содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления человеческое антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела этого типа можно получать с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного не относящегося к человеку млекопитающего, содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA и IgM (например, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческое антитело к человеческому ФНО содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

При использовании в настоящем документе термины «антитело» или «антитела» относятся к молекулам биоаналогов антител, утвержденным в соответствии с Законом о ценовой конкуренции и инновациях биологических лекарств 2009 г. (закон BPCI) и аналогичными законами и нормативами во всем мире. В соответствии с законом BPCI может быть продемонстрировано, что антитело является биоаналогом, если данные

показывают, что оно «очень схоже» с эталонным продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и «ожидается», что оно даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт, с точки зрения безопасности, чистоты и активности (Endocrine Practice: февраль 2018 г., Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). Эти молекулы-биоаналоги антител обеспечивают по сокращенной схеме утверждения, при которой заявитель полагается на клинические данные эталонного продукта изобретателя для получения одобрения регулирующих органов. По сравнению с исходным эталонным изобретенным антителом, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований, молекула-биоаналог антитела в настоящем документе называется «биопрепаратом второго эшелона». Как представлено в настоящем документе, SIMPONI® (голимумаб) представляет собой оригинальное инновационное референтное антитело к ФНО, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований. Голимумаб продается в США с 2009 года.

Примеры последовательностей

Пример последовательностей антитела к ФНО α , например SIMPONI® (голимумаб)

CDR (комплементарно детерминированная область) тяжелой цепи (HCDR) и CDR легкой цепи (LCDR) подчеркнуты в тяжелой цепи и легкой цепи голимумаба (определяемых по Кабату).

Тяжелая цепь (ТЦ) SEQ ID NO:36

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAF
MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
GIAAGGNYYYY YGMDVWGQGT

121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
ALTSGVHTFP

181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD
KTHTCPPCPA

241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL

361 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSKLT

421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 456

Легкая цепь (ЛЦ) SEQ ID NO:37

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT
VAAPSVFIFP

121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS

QESVTEQDSK DSTYSLSSTL

181 TLSKADYEKH KVVACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

По меньшей мере одно антитело изобретения связывает по меньшей мере один определенный эпитоп, специфичный к по меньшей мере одному белку ФНО, его субъединице, фрагменту, участку или любой их комбинации. По меньшей мере один эпитоп может содержать по меньшей мере одну область связывания с антителом, которая содержит по меньшей мере один участок указанного белка, где данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере один внеклеточный, растворимый, гидрофильный, внешний или цитоплазматический участок указанного белка. По меньшей мере один определенный эпитоп может содержать любую комбинацию из по меньшей мере одной последовательности аминокислот, состоящей из по меньшей мере 1-3 аминокислот, и до полного определенного участка из последовательных аминокислот с SEQ ID NO:9.

По существу человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения содержит антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант по меньшей мере одной вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере одной определяющей комплементарность области человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи. В качестве не налагающего ограничения примера антитело или антигенсвязывающий участок или вариант могут содержать по меньшей мере одну CDR3 тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO:3, и/или CDR3 легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO:6. В конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одной CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую последовательность аминокислот, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO:1, 2 и/или 3). В другом конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий участок или вариант может иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере участок по меньшей мере одной CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 4, 5, и/или 6). В предпочтительном варианте осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента имеют последовательность аминокислот соответствующей CDR по меньшей мере одного из МАт TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV118, TNV32, TNV86, описанных в настоящем документе. Такие антитела можно получать путем химического связывания различных участков (например, CDR, каркасной области) антитела с помощью обычных способов получения и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью обычных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

Специфичное антитело к ФНО может содержать по меньшей мере одну из переменных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ФНО содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и/или по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, где антитела, которые связываются с ФНО человека и которые содержат определенный переменный участок тяжелой или легкой цепей, могут быть получены приемлемыми способами, такими как фаговый дисплей (Katsube, Y., et al., *Int J Mol. Med.*, 1(5):863-868 (1998)), или способами, в которых используют трансгенные животные, известными специалистам в данной области и/или описанными в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген, содержащий ДНК локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который может подвергаться функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ФНО или его фрагментом, чтобы индуцировать продукцию антител. При желании можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие immortalized клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитела, определенный участок или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее участка.

Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, цепям иммуноглобулина и областям CDR, содержащим аминокислоты в последовательности, по существу совпадающей с аминокислотной последовательностью антитела, описанной в настоящем документе. Предпочтительно такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты и антитела, содержащие такие цепи или области CDR, могут связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью (например, с K_D равной около 10^{-9} М или менее). Аминокислотные последовательности, по существу совпадающие с последовательностями, описанными в настоящем документе, включают последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены, а также делеции и/или вставки аминокислот. Консервативной аминокислотной заменой называется замена первой аминокислоты на вторую аминокислоту, физические и/или химические свойства которой (например, заряд, структура, полярность, гидрофобность/гидрофильность) сходны со свойствами первой аминокислоты. Консервативные замены включают замену одной аминокислоты на другую в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H); аспартат (D) и глутамат (E); аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), K, R, H, D и E; аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), триптофан (W), метионин (M), цистеин (C) и глицин (G); F, W и Y; C, S и T.

Коды аминокислот. Аминокислоты, составляющие антитела к ФНО настоящего изобретения, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно обозначать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (-ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

ОДНОБУКВЕНН ЫЙ КОД	ТРЕХБУКВЕНН ЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
A	Ala	Аланин	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Цистеин	UGC, UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC, GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA, GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC, UUU
G	Gly	Глицин	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Гистидин	CAC, CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Лизин	AAA, AAG
L	Leu	Лейцин	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC, AAU
P	Pro	Пролин	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA, CAG
R	Arg	Аргинин	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Серин	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Треонин	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Валин	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC, UAU

Антитело к ФНО настоящего изобретения может включать одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений вследствие естественных мутаций либо

действий человека, описанных в настоящем документе.

Несомненно, число аминокислотных замен, которое может произвести квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Вообще говоря, число замен, вставок или делеций аминокислот любого данного антитела к ФНО, фрагмента или варианта будет составлять не более 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, например 1-30, или любой интервал, или значение в нем, как указано в настоящем документе.

Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в антителе к ФНО, которые необходимы для его функции, известными способами, такими как сайт-направленный мутагенез или сканирующий аланином мутагенез (например, Ausubel, см. выше, главы 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Впоследствии полученные мутантные молекулы испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна активность по нейтрализации ФНО. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа структуры, например путем кристаллизации, ядерного магнитного резонанса или фотоаффинного мечения (Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) и de Vos, et al., *Science* 255:306-312 (1992)).

Антитела к ФНО могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из от 1 до всех последовательных аминокислот, из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6.

Антитело к ФНО может необязательно дополнительно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70-100% последовательных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO:7, 8.

В одном варианте осуществления последовательность аминокислот цепи иммуноглобулина или ее участок (например, вариабельная область, CDR) имеет идентичность около 70-100% (например, 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 или любой интервал, или значение в нем) с последовательностью аминокислот соответствующей цепи по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO:7, 8. Например, аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи можно сравнивать с последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи можно сравнивать с SEQ ID NO: 7. 70-100% идентичности аминокислот (например, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) предпочтительно определяют с помощью приемлемого компьютерного алгоритма, известного специалистам в данной области.

Примеры последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NO: 7, 8. Антитела настоящего изобретения или их определенные варианты могут содержать любое число остатков смежных аминокислот из антитела

настоящего изобретения, где это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10-100% от числа последовательных остатков в антителе к ФНО. Длина данной подпоследовательности последовательных аминокислот необязательно составляет по меньшей мере около 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 или более аминокислот, или любой интервал, или значение в нем. Кроме того, количество таких подпоследовательностей может представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

Согласно определению специалистов в данной области настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело настоящего изобретения. Биологически активные антитела обладают удельной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, 30% или 40%, и предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% или 70%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, 90% или 95-1000% от активности нативного (несинтетического), эндогенного или родственного ему и известного антитела. Способы качественного и количественного анализа ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны специалистам в данной области.

В другом аспекте изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящем документе, которые модифицируют путем ковалентного присоединения органической функциональной группы. Такая модификация позволяет создавать антитело или антигенсвязывающий фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным периодом полужизни *in vivo* в сыворотке). В качестве органической функциональной группы можно использовать линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от около 800 до около 120 000 дальтон и представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG)), углеводный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпирролидон, а группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут содержать одну или более органических функциональных групп, которые имеют прямую или непрямую ковалентную связь с антителом. Каждая органическая функциональная группа, связанная с антителом или с антигенсвязывающим фрагментом изобретения, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин «жирная кислота» охватывает одноосновные и двухосновные карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин «гидрофильная полимерная группа» обозначает органический полимер, обладающий

лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворяется в воде, чем в октане. Таким образом, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, включено в изобретение. Гидрофильные полимеры, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т. п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т. п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспарат и т. п.), оксиды полиалканов (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т. п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело изобретения, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150 000 дальтон, как отдельный фрагмент молекулы. Например, PEG₅₀₀₀ и PEG_{20,000}, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей - групп алкила, жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминокгруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N, N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.

Жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть насыщенными или могут содержать одну или более ненасыщенных связей. Жирные кислоты, приемлемые для модификации антител изобретения, включают, например, н-додеканоат (C₁₂, лаурат), н-тетрадеканоат (C₁₄, миристат), н-октадеканоат (C₁₈, стеарат), н-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), н-докозаноат (C₂₂, бегенат), н-триаконтаноат (C₃₀), н-тетрааконтаноат (C₄₀), *цис*-Δ⁹-октадеканоат (C₁₈, олеат), полностью *цис*-Δ^{5,8,11,14}-эйкозатетраеноат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т. п. Приемлемые сложные эфиры жирных кислот включают сложные моноэфиры дикарбоновых кислот, содержащие линейную или разветвленную группу низшего алкила. Группа низшего алкила может содержать от одного до около двенадцати, предпочтительно от одного до около шести атомов углерода.

Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью приемлемого способа, например путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин «модифицирующий агент» относится к приемлемой органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, сложному эфиру жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. «Активирующая группа» означает химический фрагмент или функциональную группу, которые при подходящих условиях могут

вступать в реакцию со второй химической группой и таким образом образовывать ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила (NHS) и т. п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йодацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т. п. Функциональная группа альдегида может быть связана с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азида может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые способы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через линкерное звено, например двухвалентную группу C₁-C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут быть замещены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ и $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$. Модифицирующие агенты, которые содержат линкерную функциональную группу, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамин (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Защитную группу Вос можно удалять из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с открытием первичного амина, который может быть связан с другим карбоксилатом, как описано выше, или он может вступать в реакцию с малеиновым ангидридом с замыканием полученного продукта в цикл и получением активированного малеимидного производного жирной кислоты (см., например, публикацию Thompson, et al., WO 92/16221, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Модифицированные антитела изобретения можно получать путем реакции человеческого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические функциональные группы могут быть связаны с антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента, например сложного эфира NHS и PEG. Модифицированные человеческие антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно также получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии взаимодействовать с реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела изобретения. Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты,

содержащие органическую функциональную группу, которая связано с определенными участками антитела настоящего изобретения, можно получать с помощью приемлемых способов, таких как обратный протеолиз (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)), а также способов, описанных в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Антиидиотипические антитела к композициям антитела к ФНО. Помимо моноклональных или химерных антител к ФНО настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому (анти-Id) антителу, специфичному к таким антителам изобретения. Антитело к Id представляет собой антитело, распознающее уникальные детерминанты, по существу связанные с антигенсвязывающей областью другого антитела. Анти-Id-антитело можно получать путем иммунизации животного того же вида и генетического типа (например, линии мышей), что и источник Id-антитела, антителом или его CDR-содержащей областью. Иммунизированное животное будет распознавать идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела и будет продуцировать анти-Id-антитело. Анти-Id-антитело можно также применять в качестве «иммуногена» для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело.

Композиции антитела к ФНО. В настоящем изобретении также обеспечена по меньшей мере одна композиция антитела к ФНО, содержащая по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к ФНО, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области, представленных в виде не встречающейся в природе композиции, смеси или формы. Такие композиции представляют собой композиции неприродного происхождения, содержащие по меньшей мере один или два полноразмерных, имеющих С- и/или N-концевую делецию варианта, домена, фрагмента или определенных варианта аминокислотной последовательности антитела к ФНО, выбранной из группы, состоящей из 70-100% последовательных аминокислот с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или определенных их фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антитела к ФНО включают по меньшей мере одну или две полноразмерных последовательности, фрагмента, домена или варианта участков, содержащих по меньшей мере одну CDR или LBP из последовательности антитела к ФНО с 70-100% сходством с последовательностью SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, или их указанными фрагментами, доменами или вариантами. Предпочтительные композиции дополнительно содержат, например, 40-99% по меньшей мере одной из 70-100% последовательностей с SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Процентные доли такой композиции определяют по массе, объему, концентрации, молярности или моляльности в жидких или сухих растворах, смесях, суспензиях, эмульсиях или коллоидах, как известно специалистам в данной

области или описано в настоящем документе.

Композиции антитела к ФНО настоящего изобретения могут дополнительно содержать по меньшей мере одно приемлемое и эффективное количество композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, вводимое в клетку, ткань, орган, животного или пациента, нуждающегося в такой модуляции, лечении или терапии, и необязательно дополнительно включать по меньшей мере одно средство, выбранное из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их слитых белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного агента, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, агента против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Не имеющие ограничительного характера примеры таких цитокинов включают, без ограничений, любой из от IL-1 до IL-23. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, 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), каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Такие противораковые или противоинфекционные средства могут также включать молекулы токсина, которые ассоциированы, связаны, объединены в один состав или вводятся совместно с по меньшей мере одним антителом настоящего изобретения. Эффект токсина может быть необязательно направлен на селективное уничтожение патологической клетки или ткани. Патологическая клетка может представлять собой раковую клетку или другую клетку. Такие токсины могут представлять собой, без ограничений, очищенный или рекомбинантный токсин или фрагмент токсина, содержащий по меньшей мере один функциональный цитотоксический домен токсина, например, выбранный из по меньшей мере одного из рицина, дифтерийного токсина, токсина яда или бактериального токсина. Термин «токсин» также включает как эндотоксины, так и экзотоксины, продуцируемые любыми естественными, мутантными или рекомбинантными бактериями или вирусами, которые могут вызывать любое патологическое состояние у человека и других млекопитающих, включая токсический шок, который может приводить к летальному исходу. Такие токсины могут включать, без ограничений, энтеротоксигенный термолabileный энтеротоксин (LT) *E. coli*, термостабильный энтеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, энтеротоксины *Aeromonas*, токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), В (SEB) или С (SEC), стрептококковые энтеротоксины и т. п. Такие бактерии включают, без ограничений, штаммы видов энтеротоксигенной *E. coli* (ETEC), энтерогеоморфической *E. coli* (например, штаммы серотипа 0157:H7), виды *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), виды *Shigella* (например, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* и *Shigella sonnei*), виды *Salmonella* (например, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), виды *Clostridium* (например, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), виды *Camphlobacter* (например, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), виды *Helicobacter*, (например, *Helicobacter pylori*), виды *Aeromonas* (например, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* (например, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*), *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococci*. См., например, публикации 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), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Соединения, композиции или комбинации антител к ФНО, применяемые в способе

настоящего изобретения, могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых вспомогательных веществ, таких как, без ограничений, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант или т. п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Не имеющие ограничительного характера примеры таких стерильных растворов и способы их получения хорошо известны специалистам в данной области, например, без ограничений, описаны в Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут быть выбраны обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ФНО, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в представленной композиции, включают, без ограничений, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т. п.; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в комбинации, составляя отдельно или в комбинации 1-99,99% по массе или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и т. п. Типичные компоненты аминокислот/антител, которые могут также выполнять буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т. п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

Углеводные эксципиенты, приемлемые для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т. п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т. п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т. п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т. п. Предпочтительными углеводными эксципиентами для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

Композиции антитела к ФНО могут также включать буфер или агент, регулирующий pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; буферы Трис, гидрохлорида трометамин или фосфата. Предпочтительными буферами для применения в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Композиции антитела к ФНО изобретения могут дополнительно включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как ТВИН-20 и ТВИН-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к ФНО, их участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной области, например перечислены в публикациях Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19th ed., Williams & Williams, (1995) и Physician's Desk Reference, 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Предпочтительными материалами-носителями или эксципиентами являются углеводы (например, сахараиды и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты.

Составы. Как указано выше, в изобретении обеспечены стабильные составы, которые предпочтительно представляют собой фосфатный буфер с физиологическим раствором или выбранной солью, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также консервированные составы для многократного применения, пригодные для фармацевтического или ветеринарного применения, содержащие по меньшей мере одно антитело к ФНО в фармацевтически приемлемом составе. Консервированные составы содержат по меньшей мере один консервант, известный или необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксизтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Как известно специалистам в данной области, можно использовать любую приемлемую концентрацию или смесь, такую как 0,001-5%, или любой интервал, или значение в нем, например, без ограничений, 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, или любой интервал, или значение в нем. Не имеющие ограничительного характера примеры включают отсутствие консервантов, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005, 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабена (-ов) (например, 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%) и т. п.

Как отмечено выше, в изобретении обеспечено промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного специфического антитела к ФНО с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, где указанный упаковочный материал содержит этикетку с указанием, что такой раствор можно хранить в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 часа или дольше. Изобретение дополнительно содержит промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное по меньшей мере одно антитело к ФНО, и второй флакон, содержащий водный разбавитель, состоящий из предписанного буфера или консерванта, где указанный упаковочный материал содержит этикетку с инструкцией для пациента о том, как разводить по меньшей мере антитело к ФНО в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода в двадцать четыре часа или дольше.

По меньшей мере одно антитело к ФНО, применяемое в соответствии с настоящим изобретением, можно продуцировать рекомбинантными способами, в том числе из клетки млекопитающего или трансгенных препаратов, либо его можно очищать из других биологических источников, как описано в настоящем документе или как известно специалистам в данной области.

Диапазон количества по меньшей мере одного антитела к ФНО в продукте настоящего изобретения включает количества, которые после разведения (при использовании влажной/сухой системы) достигают концентраций от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, хотя меньшие и большие концентрации приемлемы и зависят от предполагаемой несущей среды для введения, например, составы раствора различаются для способов с трансдермальным пластырем, введением через легкие, через слизистые оболочки, или осмотическим способом, или с помощью микродозатора.

Дополнительно водный разбавитель предпочтительно необязательно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Предпочтительные консерванты включают выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия или их смесей. Концентрации консерванта, применяемой в составе, должно быть достаточно для обеспечения противомикробного действия. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта, и квалифицированный специалист в данной области без труда определяет ее.

Предпочтительно в разбавитель можно необязательно добавлять другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используют в известных концентрациях. Для улучшения контроля pH предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от

около pH 5 до около pH 9 и наиболее предпочтительно от около pH 6,0 до около pH 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

Для уменьшения агрегации в составы или композиции можно необязательно добавлять другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, например твин-20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат), твин-40 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонопальмитат), твин-80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), Pluronic F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полуксамер 184 или 188, полиолы Pluronic®, другие блок-сополимеры, и хелатирующие вещества, такие как ЭДТА и ЭГТА. Эти добавки, в частности, используют, если для введения состава применяют насос или пластиковый контейнер. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

Составы настоящего изобретения можно получать способом, включающим смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и консерванта, выбранного из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и консерванта в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, для получения приемлемого состава соединяют отмеренное количество по меньшей мере одного антитела к ФНО в буферном растворе с необходимым консервантом в буферном растворе в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двойных флаконов, в том числе флакона с лиофилизированным по меньшей мере одним антителом к ФНО, которое разводят содержащимися во втором флаконе водой, консервантом и/или эксципиентами, предпочтительно фосфатным буфером и/или физиологическим раствором и выбранной солью, в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Настоящие заявленные промышленные изделия используют в течение периода от

немедленного введения до двадцати четырех часов или дольше. Соответственно, заявленные в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значимые преимущества для пациентов. Составы изобретения можно необязательно безопасно хранить при температурах от около 2 до около 40 °C и сохранять биологическую активность белка в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке может быть этикетка с указанием, что раствор можно хранить и/или использовать в течение периода 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 или 96 часов или более. При использовании разбавителя с консервантом на такой этикетке может быть указан срок годности до 1-12 месяцев, полугод, полутора и/или двух лет.

Растворы по меньшей мере одного антитела к ФНО по изобретению можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью обычных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и необязательно консерванта или буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, в том числе флакона с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. В этом случае объем прозрачного раствора может составлять до одного литра или даже больший объем, тем самым обеспечивая большой сосуд, из которого в аптеке или клинике можно дозировать малыми порциями раствор по меньшей мере одного антитела, однократно или многократно, для переливания во флаконы меньшего размера и предоставления покупателям и/или пациентам.

Общепринятые устройства, содержащие такие системы с одним флаконом, включают в себя устройства - шприц-ручки для доставки раствора, такие как B-D[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), NOVOPEN[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), AUTOPEN[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), OPTIPEN[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), GENOTROPIN PEN[®] (инжекторное устройство - шприц-

ручка),—HUMATROPEN[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), BIOJECTOR[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка), Reco-Pen, Humaject, J-tip Needle-Free Injector, Intraject, Medi-Ject, например, произведенные или разработанные компаниями Becton Dickinson (Франклин Лейкс, Нью-Джерси, [www. Bectondickenson.com](http://www.Bectondickenson.com)), Disetronic (Бургдорф, Швейцария, [www. disetronic.com](http://www.disetronic.com)); Bioject, г. Портланд, штат Орегон, США ([www. bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, [www. mediject.com](http://www.mediject.com)). Признанные устройства, содержащие системы из двух флаконов, включают такие системы шприца-ручки для разведения лиофилизированного лекарственного средства в картридже для введения разведенного раствора, например HUMATROPEN[®] (инжекторное устройство - шприц-ручка)

Изделия, заявленные в настоящем документе, могут включать упаковочный материал. В дополнение к информации по требованию контролирующих органов, на упаковочном материале также указывают условия, при которых можно использовать продукт. Упаковочный материал настоящего изобретения предусматривает инструкции для пациента по разведению по меньшей мере одного антитела к ФНО в водном разбавителе с получением раствора и по использованию раствора в течение периода 2-24 часов или дольше в случае двух флаконов - влажного/сухого, с продуктом. Для одного флакона с продуктом в виде раствора, на упаковке указывают, что такой раствор можно использовать в течение периода 2-24 часов или дольше. Заявленные в настоящем документе продукты предназначены для использования человеком в фармацевтических целях.

Составы настоящего изобретения можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание по меньшей мере одного антитела и буфера в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый состав, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют с требуемым буферным агентом в воде в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Заявленные стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, в том числе флакона с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для

одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

По меньшей мере одно антитело к ФНО в стабильных или консервированных составах или растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая подкожную или внутримышечную инъекцию; трансдермальное введение, введение в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной области, как хорошо известно в данной области.

Терапевтические варианты применения. В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с ФНО заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе, с использованием по меньшей мере одного двойного антитела к интегрину настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с ФНО, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из ожирения, иммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного заболевания, злокачественного заболевания или неврологического заболевания.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с иммунной системой заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системными проявлениями, анкилозирующий спондилит, язва желудка, серонегативные артропатии, остеоартрит, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, иридоциклит/увеит/неврит зрительного нерва, идиопатический легочный фиброз, системный васкулит/гранулематоз Вегенера, саркоидоз, орхит/процедура обращения вазэктомии, аллергические/атопические заболевания, астма, аллергический ринит, экзема, аллергический контактный дерматит, аллергический конъюнктивит, пневмонит с гиперчувствительностью, трансплантация, отторжение трансплантатов органов, болезнь «трансплантат против хозяина», синдром системной воспалительной реакции, синдром сепсиса, грам-положительный сепсис, грам-отрицательный сепсис, сепсис с отрицательными результатами посева, грибковый сепсис, нейтропеническая лихорадка, уросепсис, менингококкемия, травма/кровотечение, ожоги, воздействие ионизирующего облучения, острый панкреатит, респираторный дистресс-синдром у взрослых, алкогольный гепатит, хронические воспалительные патологические состояния, саркоидоз, болезнь Крона, серповидно-клеточная анемия, диабет, нефроз, атопические заболевания, реакции гиперчувствительности, аллергический ринит, сенная лихорадка, длительный ринит, конъюнктивит, эндометриоз, астма, крапивница, системная

анафилаксия, дерматит, злокачественная анемия, гемолитическое заболевание, тромбоцитопения, отторжение трансплантата любого органа или ткани, отторжение трансплантата почки, отторжение трансплантата сердца, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата поджелудочной железы, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата костного мозга (ТКМ), отторжение аллотрансплантата кожи, отторжение трансплантата хряща, отторжение трансплантата кости, отторжение трансплантата тонкой кишки, отторжение имплантата тимуса плода, отторжение трансплантата паращитовидной железы, отторжение ксенотрансплантата любого органа или ткани, отторжение аллотрансплантата, реакции гиперчувствительности антирецепторов, болезнь Грейвса, болезнь Рейно, инсулинорезистентный сахарный диабет типа В, астма, злокачественная миастения, опосредованная антителами цитотоксичность, реакции гиперчувствительности типа III, системная красная волчанка, синдром POEMS (синдром полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммапатии, изменения кожи), полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия, синдром изменения кожи, антифосфолипидный синдром, пузырчатка, склеродермия, смешанное заболевание соединительной ткани, идиопатическая болезнь Аддисона, сахарный диабет, хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз, витилиго, васкулит, синдром кардиотомии после ИМ, гиперчувствительность типа IV, контактный дерматит, пневмонит с гиперчувствительностью, отторжение аллотрансплантата, гранулемы, вызванные внутриклеточными организмами, чувствительность к лекарственному средству метаболическая/ идиопатическая, болезнь Вильсона, гемахроматоз, дефицит альфа-1-антитрипсина, диабетическая ретинопатия, тиреоидит Хасимото, остеопороз, первичный билиарный цирроз, тиреоидит, энцефаломиелит, кахексия, муковисцидоз, хроническое заболевание легких у новорожденных, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, дерматологические состояния, псориаз, алопеция, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острая почечная недостаточность, гемодиализ, уремия, токсичность, преэклампсия, терапия ОКТЗ, терапия антителом к CD3, терапия цитокинами, химиотерапия, лучевая терапия (например, включая, без ограничений, астению, анемию, кахексию и т. п.), хроническая интоксикация салицилатами и т. п. См., например, 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), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного сердечно-сосудистого заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: синдром оглушенного миокарда, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, инсульт, ишемический инсульт, кровоизлияние, артериосклероз, атеросклероз, рестеноз, диабетическое артериосклеротическое заболевание, гипертензия,

артериальную гипертензия, реноваскулярная гипертензия, обморок, шок, сифилис сердечно-сосудистой системы, сердечная недостаточность, легочное сердце, первичная легочная гипертензия, сердечные аритмии, предсердная эктопическая активность, трепетание предсердий, фибрилляция предсердий (устойчивая или пароксизмальная), постперфузионный синдром, воспалительный ответ на искусственное кровообращение, хаотическая или многоочаговая тахикардия предсердий, регулярная тахикардия с узкими комплексами QRS, специфические аритмии, мерцание желудочков, аритмии пучка Гиса, атриовентрикулярная блокада, блокада ножки пучка Гиса, ишемические заболевания миокарда, ишемическая болезнь коронарных артерий, стенокардия, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, дилатационная застойная кардиомиопатия, рестриктивная кардиомиопатия, заболевания клапанов сердца, эндокардит, болезнь перикарда, опухоли сердца, аневризмы аорты и периферических сосудов, расслоение аорты, воспаление аорты, окклюзия брюшной аорты и ее ветвей, болезни периферических сосудов, окклюзионные артериальные расстройства, атеросклеротические заболевания периферических сосудов, облитерирующий тромбоангиит, функциональные расстройства периферических артерий, явление и болезнь Рейно, акроцианоз, эритромелалгия, заболевания вен, венозный тромбоз, варикозные вены, артериовенозная фистула, лимфедема, липедема, неустойчивая стенокардия, реперфузионное повреждение, постгемодиализный синдром, ишемическо-реперфузионное повреждение и т. п. Такой способ может необязательно содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии.

Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного инфекционного заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих заболеваний: острая или хроническая бактериальная инфекция, острые и хронические паразитарные или инфекционные процессы, включая бактериальные, вирусные и грибковые инфекции, ВИЧ-инфекцию/ВИЧ-нейропатию, менингит, гепатит (А, В или С или т. п.), септический артрит, перитонит, пневмония, эпиглоттит, *e. coli* 0157:h7, гемолитический уремический синдром/тромболитическая тромбоцитопеническая пурпура, малярия, геморрагическая лихорадка денге, лейшманиоз, проказа, синдром токсического шока, стрептококковый миозит, газовая гангрена, микобактериальный туберкулез, внутриклеточные инфекции *mycobacterium avium*, пневмония, вызванная *Pneumocystis carinii*, воспалительное заболевание тазовых органов, орхит/эпидидимит, легионелла, болезнь Лайма, грипп А, вирус Эпштейна-Барр, вирус-ассоциированный гемафагоцитарный синдром, вирусный энцефалит/асептический менингит и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, помимо прочего, по меньшей мере одно из

следующего: лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), В-клеточный, Т-клеточный или FAB-ОЛЛ, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, миелодипластический синдром (МДС), лимфома, болезнь Ходжкина, злокачественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, множественная миелома, саркома Капоши, колоректальная карцинома, карцинома поджелудочной железы, карцинома носоглотки, злокачественный гистиоцитоз, паранеопластический синдром/гиперкальциемия злокачественной опухоли, солидные опухоли, аденокарциномы, саркомы, злокачественная меланома, гемангиома, метастатическое заболевание, связанная с раком резорбция костной ткани, связанная с раком боль в костной ткани и т. п.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного неврологического заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из: нейродегенеративных заболеваний, рассеянного склероза, мигрени, комплекса СПИД-деменции, демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз и острый поперечный миелит; экстрапирамидальные и мозжечковые расстройства, такие как поражения кортикоспинальной системы; расстройства базальных ганглиальных или мозжечковые расстройства; гиперкинетические двигательные расстройства, такие как хорей Хантингтона и старческая хорей; расстройства движений, вызванных лекарственными средствами, такие как расстройства, индуцированные лекарственными средствами, блокирующими рецепторы дофамина в ЦНС; гипокинетические двигательные расстройства, такие как болезнь Паркинсона; прогрессирующий супрануклеарный парез взора; структурные поражения мозжечка; спинально-мозжечковые дегенерации, такие как спинальная атаксия, атаксия Фридерейха, дегенерация в коре мозжечка, мультисистемные дегенерации (Менсела, Дежерина-Томаса, Ши-Дрегера и Мачадо-Джозефа); системные расстройства (болезнь Рефсума, абеталипопротеинемия, атаксия, телеангиэктазия и митохондриальное мультисистемное расстройство); основные демиелинизирующие расстройства, такие как рассеянный склероз, острый поперечный миелит; и расстройства мотонейронов, такие как нейрогенные мышечные атрофии (дегенерация клеток переднего рога, например амиотрофический боковой склероз, детская спинальная мышечная атрофия и юношеская спинальная мышечная атрофия); болезнь Альцгеймера; синдром Дауна в среднем возрасте; диффузная болезнь с тельцами Леви; старческая деменция с тельцами Леви; синдром Вернике-Корсакова; хронический алкоголизм; болезнь Крейтцфельда-Якоба; подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Галлервордена - Шпатца; и деменция боксеров, и т. п. Такой способ может необязательно включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, или определенную часть или вариант, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. См., например, публикацию Merck Manual, 16th

Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

Любой способ настоящего изобретения может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, где введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme),

цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, 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), каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

К антагонистам ФНО, приемлемым для композиций, комбинированной терапии, совместного введения, устройств и/или способов настоящего изобретения (дополнительно содержащим по меньшей мере одно антитело, его указанную часть и вариант настоящего изобретения), относятся, без ограничений, антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты и молекулы рецепторов, которые специфически связываются с ФНО; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют синтез ФНО, высвобождение ФНО или его действие на клетки-мишени, например талидомид, тенидап, ингибиторы фосфодиэстеразы (например, пентоксифиллин и ролипрам), агонисты аденозиновых рецепторов A2b и усилители аденозиновых рецепторов A2b; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют сигнализацию ФНО-рецептора, такие как ингибиторы митоген-активируемых киназ (МАР); соединения, которые блокируют и/или ингибируют расщепление мембранного ФНО, такие как ингибиторы металлопротеиназы; соединения, которые блокируют и/или ингибируют активность ФНО, такие как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) (например, каптоприл); и соединения, которые блокируют и/или ингибируют продукцию ФНО и/или синтез ФНО, такие как ингибиторы МАР-киназ.

В настоящем документе «антитело к фактору некроза опухоли», «антитело к ФНО», «антитело к ФНО α » или его фрагмент и т. п. уменьшает, блокирует, ингибирует, уничтожает или нарушает активность ФНО α в условиях *in vitro*, *in situ* и/или предпочтительно *in vivo*. Например, приемлемое человеческое антитело к ФНО настоящего изобретения может связываться с ФНО α и включает антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты, а также их определенные мутанты или домены, которые специфически связываются с ФНО α . Приемлемое антитело к ФНО или его фрагмент также могут уменьшать, блокировать, устранять, не допускать, предотвращать и/или ингибировать синтез РНК, ДНК или белка ФНО, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО.

Химерное антитело сА2 состоит из антигенсвязывающей вариабельной области высокоаффинного нейтрализующего мышинового антитела типа IgG1 к человеческому ФНО α , обозначенного как А2, и константных областей человеческого IgG1, каппа-иммуноглобулина. Область Fc человеческого IgG1 улучшает эффекторную функцию аллогенного антитела, увеличивает его период полужизни в сыворотке и уменьшает иммуногенность антитела. Авидность и эпитопная специфичность химерного антитела сА2 обусловлены вариабельной областью мышинового антитела А2. В конкретном варианте осуществления предпочтительным источником нуклеиновых кислот, кодирующих

вариабельную область мышиноного антитела A2, является гибридомная клеточная линия A2.

Химерное антитело A2 (сA2) дозозависимым образом нейтрализует цитотоксический эффект как природного, так и рекомбинантного человеческого ФНО α . С помощью анализов связывания химерного антитела сA2 и рекомбинантного человеческого ФНО α было рассчитано, что константа аффинности химерного антитела сA2 составляет $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Предпочтительные способы определения специфичности и аффинности моноклональных антител посредством конкурентного ингибирования можно найти в публикациях Harlow, et al., *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al., *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); и Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В конкретном варианте осуществления мышиноное моноклональное антитело A2 продуцируется клеточной линией, обозначенной как c134A. Химерное антитело сA2 продуцируется клеточной линией, обозначенной c168A.

Дополнительные примеры моноклональных антител к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны в данной области (см., например, патент США № 5,231,024; Möller, A. et al., *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); заявку на патент США № 07/943,852 (подана 11 сентября 1992 г.); Rathjen et al., Международную публикацию № WO 91/02078 (опубликована 21 февраля 1991 г.); Rubin et al., патентную публикацию ЕРО № 0 218 868 (опубликована 22 апреля 1987 г.); Yone et al., патентную публикацию ЕРО № 0 288 088 (26 октября 1988 г.); 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); and Hirai, et al., *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Молекулы рецептора ФНО. Предпочтительными молекулами рецептора ФНО, используемыми в настоящем изобретении, являются молекулы, которые связываются с ФНО α с высокой аффинностью (см. например, Feldmann et al., международная патентная публикация WO 92/07076 (опубликована 30 апреля 1992 г.); Schall et al., *Cell* 61:361-370 (1990); и Loetscher et al., *Cell* 61:351-359 (1990), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) и необязательно обладают низкой иммуногенностью. В частности, в настоящем изобретении используют находящиеся на клеточной поверхности рецепторы к ФНО массой 55 кДа (p55 ФНО-R) и массой 75 кДа (p75 ФНО-R). Усеченные формы этих рецепторов, содержащие внеклеточные домены (ECD) рецепторов или их функциональные участки (см. например, Corcoran et al., *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), также используют в настоящем изобретении. Усеченные

формы рецепторов к ФНО, содержащие ECD, обнаруживают в моче и сыворотке в виде ингибирующих связывающих ФНО α белков массой 30 кДа и 40 кДа (Engelmann, H. et al., J. Biol. Chem. 265:1531-1536 (1990)). Мультимерные молекулы рецептора к ФНО, гибридные молекулы иммунорецепторов к ФНО и их производные, фрагменты или участки представляют собой дополнительные примеры молекул рецептора к ФНО, используемых в способах и композициях настоящего изобретения. Молекулы рецептора к ФНО, которые можно использовать в изобретении, характеризуются своей способностью обеспечивать лечение пациентов в течение длительных периодов с хорошим или отличным облегчением симптомов и низкой токсичностью. Низкая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие неидентифицированные свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов.

Мультимерные молекулы рецепторов к ФНО, используемые в настоящем изобретении, содержат ECD целиком, или функциональный участок ECD двух или более рецепторов к ФНО, связанных посредством одного или более полипептидных линкеров или других непептидных линкеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Мультимерные молекулы могут дополнительно содержать сигнальный пептид секретируемого белка для управления экспрессией мультимерной молекулы. Эти мультимерные молекулы и способы их получения описаны в заявке на патент США № 08/437,533 (поданной 9 мая 1995 г.), содержимое которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО, используемые в способах и композициях настоящего изобретения, содержат по меньшей мере одну часть одной или более молекул иммуноглобулина и целую молекулу или функциональный участок одного или более рецепторов к ФНО. Эти гибридные иммунорецепторные молекулы могут быть собраны в виде мономеров или гетеро-или гомомультимеров. Гибридные иммунорецепторные молекулы могут также быть одновалентными или мультивалентными. Примером такой гибридной иммунорецепторной молекулы к ФНО является гибридный белок рецептор ФНО/IgG. Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО и способы их получения описаны в данной области (Lesslauer 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., патента США № 5,447,851; и заявке на патент США № 08/442,133 (поданной 16 мая 1995 года), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Способы получения гибридных иммунорецепторных молекул можно также найти в публикациях Capon et al., патент США № 5,116,964; Capon et al., патент США № 5,225,538; и Capon et al., Nature 337:525-531 (1989), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Функциональный эквивалент, производное, фрагмент или область молекулы рецептора ФНО относится к участку молекулы рецептора ФНО или к участку последовательности молекулы рецептора ФНО, которая кодирует молекулу рецептора

ФНО, и имеет достаточный размер и последовательность для функционального сходства с молекулами рецептора ФНО, которые могут быть использованы в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО также включает модифицированные молекулы рецептора к ФНО, функционально сходные с молекулами рецептора к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Например, функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО может содержать «молчащий» кодон или одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений (например, замена одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту; или замену одного кодона, кодирующего ту же или другую гидрофобную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий гидрофобную аминокислоту). См. публикацию Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000).

Термин «цитокины» включают любой известный цитокин. См., например, Cytokines.com. Термин «антагонисты цитокинов» включают, без ограничений, любое антитело, фрагмент или миметик, любой растворимый рецептор, фрагмент или миметик, любой низкомолекулярный антагонист или любую их комбинацию.

Терапевтические способы лечения. Любой способ настоящего изобретения может включать способ лечения обусловленного ФНО заболевания, включающий введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, где введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого

противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина.

Термин «безопасность» в отношении композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО настоящего изобретения (например, антитела к ФНО голимумаба) относится к благоприятному соотношению риск : польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью неблагоприятных явлений (НЯ) и серьезных неблагоприятных явлений (СНЯ) по сравнению со стандартным лекарственным препаратом или другим препаратом сравнения, отличным от агентов-антител к ФНО. Неблагоприятное явление - это неблагоприятное медицинское событие у пациента, которому ввели лекарственный препарат. В частности, «безопасность» в отношении композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО в соответствии с настоящим изобретением относится к приемлемой частоте и/или приемлемой степени тяжести неблагоприятных явлений, включая, например, реакции на инфузии, аномалии гепатобилиарных лабораторных показателей, инфекции, включая туберкулез, и злокачественные опухоли.

В настоящем документе термины «эффективность» и «эффективный» в контексте композиции, дозы, схемы введения, лечения или способа относятся к эффективности конкретной композиции, дозы, введения, лечения или способа с использованием антитела к ФНО настоящего изобретения (например, антитела к ФНО голимумаба). Эффективность можно измерять на основании изменений течения заболевания в ответ на введение агента настоящего изобретения. Например, антитело к ФНО настоящего изобретения (например, устекинумаб) вводят пациенту в количестве и в течение времени, которых достаточно для индуцирования улучшения, предпочтительно стойкого улучшения, в отношении по

меньшей мере одного показателя, который отражает тяжесть расстройства, подвергаемого лечению. Для определения, достаточно ли количества и времени лечения, оценивают различные показатели, отражающие степень патологии, заболевания или состояния субъекта. Такие показатели включают, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомов или проявлений рассматриваемого расстройства. Степень улучшения по существу определяется врачом или другим лицом, имеющим должную квалификацию, который может сделать это на основании признаков, симптомов, биопсий или других результатов анализов, указывающих на облегчение клинических симптомов или любую другую меру активности заболевания. Например, антитело к ФНО настоящего изобретения можно вводить для улучшения у субъекта состояния, связанного с анкилозирующим спондилитом (AS). Улучшение состояния пациента, связанного с AS, может быть оценено с использованием одного или более критериев, включая, например, оценку активности анкилозирующего спондилита (ASDAS), функциональный индекс бигондилита в крови (BASFI), анкилозирующий метрولوجический индекс биондилита в крови (BASMI), сводные данные по физическим компонентам для здоровья в форме 36-элементных сводных данных (PC-36), сводные данные по медицинским компонентам в форме 36-элементной сводной информации (MCS ДЛЯ состояния здоровья в форме SF-36) и/или полученные в анкилозирующем опросе качества жизни (ASQoL). ASDAS представляет собой показатель активности заболевания (DAS), применяемый в AS, разработанный в оценке международного общества SpondyloArthritis. ASDAS рассчитывают с использованием формулы с оценками, которые включают в себя, например, общую боль в спине, продолжительность утренней жесткости, периферическую боль/отек и глобальную оценку пациента. BASFI представляет собой самооценку субъекта, представленную в среднем 10 вопросов, 8 из которых относятся к функциональной анатомии субъекта, а 2 из которых относятся к способности субъекта справляться с повседневной жизнью. BASMI представляет собой совокупный балл, рассчитанный путем преобразования оценок в баллы для 5 оценок, включая боковое сгибание поясничного отдела, расстояние между стенками, поясничное сгибание, расстояние между мальтиками и угол поворота шейки матки. SF-36 представляет собой опросник, состоящий из 8 многоэлементных шкал с подсчетом баллов, а SF-36 PSA и SF-36 MCS представляют собой общие оценки, полученные из SF-36, которые позволяют сравнивать относительное бремя различных заболеваний и относительную пользу различных типов лечения. ASQoL представляет собой самостоятельно введенный прибор для оценки исходов пациента, состоящий из 18 элементов, запрашивающих ответ на вопросы, связанные с влиянием боли на сон, настроение, мотивацию, способность избавиться от, деятельность повседневной жизни, независимость, взаимоотношения и социальный срок службы.

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин «клинически доказанный» (используемый независимо или для модификации терминов «безопасный» и/или «эффективный», например, клинически доказанный безопасный

и/или клинически доказанный эффективный) означает, что доказательство было получено в клиническом исследовании, где клиническое исследование соответствовало стандартам Управления по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов США, Европейского агентства лекарственных средств (EMA) или соответствующего национального регулирующего органа. Например, клиническое исследование может представлять собой рандомизированное двойное слепое исследование соответствующего объема, применяемое для клинического подтверждения эффектов лекарственного средства.

Как правило, лечение патологических состояний осуществляют путем введения безопасного и эффективного количества или дозы по меньшей мере одной композиции антитела к ФНО, которая суммарно в среднем содержит от по меньшей мере около 0,01 до 500 миллиграммов по меньшей мере одного антитела к ФНО на килограмм массы тела пациента на дозу, а предпочтительно от по меньшей мере около 0,1 до 100 миллиграммов антитела на килограмм массы тела пациента за одно или множество введений, в зависимости от конкретной активности, присущей композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1-5000 мкг/мл сыворотки за одно или множество введений. Приемлемые дозы известны медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического количества может потребоваться выполнение повторного введения, т. е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, где отдельные введения повторяют до достижения требуемой суточной дозы или эффекта.

Предпочтительные дозы могут необязательно включать 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 и/или 100-500 мг/кг за введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона, либо количество для достижения в сыворотке концентрации 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, 12, 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 и/или 5000 мкг/мл сыворотки за однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона.

В альтернативном варианте осуществления вводимые дозы могут варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного агента, режим и способ его введения; возраст, состояние здоровья и масса

реципиента; природа и степень выраженности симптомов, тип сопутствующего лечения, частота введения и требуемый эффект. Обычно доза активного ингредиента составляет от около 0,1 до 100 мг на килограмм массы тела. Как правило, доза от 0,1 до 50 и предпочтительно от 0,1 до 10 миллиграммов на килограмм за одно введение или в лекарственной форме с замедленным высвобождением будет эффективной для достижения требуемых результатов.

В качестве не налагающего ограничения примера, лечение людей или животных можно проводить в виде однократного или периодического введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения в дозе от 0,1 до 100 мг/кг, например 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 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из суток 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 или 40, либо в альтернативном или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере на одной из недель 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 или 52, либо в альтернативном или дополнительном варианте осуществления в по меньшей мере один год из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, либо в любой их комбинации с введением однократной, инфузионной или повторных доз.

Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, обычно содержат от около 0,1 мг до около 500 мг активного ингредиента на единицу или контейнер. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве около 0,5-99,999% масс. в расчете на общую массу композиции.

Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1-10%. Кроме того, можно применять липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми способами.

Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.

Альтернативные способы введения. В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств по меньшей мере одного антитела к ФНО настоящего изобретения можно применять множество известных и разработанных способов введения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с

настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты.

Антитела к ФНО настоящего изобретения можно доставлять в носителе в виде раствора, эмульсии, коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из множества устройств и способов, приемлемых для введения путем ингаляции или другими способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

Парентеральные составы и введение. Составы для парентерального введения могут в качестве обычных эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т. п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций можно использовать нетоксичный, пригодный для неперорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, или стерильный раствор для инъекций, или суспензию в растворителе. В качестве пригодной несущей среды или растворителя допустимо использовать воду, раствор Рингера, изотонический раствор и т. п.; в качестве обычного растворителя или суспендирующего растворителя можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этого можно использовать нелетучее масло и жирную кислоту любого вида, включая природные или синтетические либо полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические либо полусинтетические моно-, ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничений, общепринятые средства инъекции, пневматическое безыгольное инъекционное устройство, описанное в патенте США № 5,851,198, и лазерный перфоратор, описанный в патенте США № 5,839,446, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Альтернативные способы доставки. Изобретение дополнительно относится к введению по меньшей мере одного антитела к ФНО путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшинного, интракапсулярного, внутривисцерального, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутripеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутривисцерального, интаректального, интареального, интареинального, интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, внутрипузырного, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию по меньшей мере одного антитела к ФНО можно готовить для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для

применения вагинальным или ректальным способом введения, в частности, в мягких формах, таких как, без ограничений, кремы и суппозитории; для трансбуккального или подъязычного введения, например, без ограничений, в форме таблеток или капсул; или для интраназального введения, например, без ограничений, в форме порошков, капель в нос или аэрозолей, либо в виде определенных агентов; или для введения трансдермально, например, без ограничений, в виде систем доставки в геле, мази, лосьоне, суспензии или пластыре с химическими ускорителями, такими как диметилсульфоксид, либо для модификации структуры кожи, либо для повышения концентрации лекарственного средства в трансдермальном пластыре (Junginger, et al. Drug Permeation Enhancement; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки), или с окислителями, которые облегчают нанесение составов, содержащих белки и пептиды, на кожу (WO 98/53847), или с применением электрического поля для создания временных траекторий доставки, например, путем электропорации, или для ускорения движения заряженных лекарственных средств через кожу, например, путем ионофореза, или применения ультразвука, например сонофореза (патенты США № 4,309,989 и 4,767,402) (приведенные выше публикации и патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

Легочное/назальное введение. При введении через легкие предпочтительно по меньшей мере одну композицию антитела к ФНО доставляют в виде частиц, размер которых эффективно достигает нижних дыхательных путей легких или пазух. В соответствии с изобретением по меньшей мере одно антитело к ФНО может быть доставлено с помощью любого из множества ингаляционных или назальных устройств, известных специалистам и предназначенных для введения терапевтического агента ингаляцией. Такие устройства, предназначенные для нанесения аэрозольных препаратов в полость пазухи или альвеол пациента, включают ингаляторы отмеренных доз, небулайзеры, генераторы сухого порошка, распылители и т. п. В данной области также известны другие устройства, приемлемые для направленного легочного или назального введения антител. Во всех таких устройствах можно использовать составы, приемлемые для введения антитела в виде аэрозоля. Такие аэрозоли могут содержать либо раствор (как водный, так и неводный), либо твердые частицы. В ингаляторах отмеренных доз, таких как VENTOLIN[®] (ингалятор отмеренных доз), обычно используют газ-пропеллент, и во время вдоха требуется активация устройства (см. например, WO 94/16970, WO 98/35888). В порошковых ингаляторах, таких как Turbuhaler (Astra), Rotahaler (Glaxo), DISKUS[®] (ингалятор) (Glaxo), SPIROS[®] (ингалятор) (Dura), устройства, продаваемые компанией Inhale Therapeutics и порошковые ингаляторы Spinhaler (Fisons), используют активацию смешанного порошка под действием дыхания (публикации US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Небулайзеры, такие как AERX[®] (небулайзер) Aradigm, ULTRAVENT[®] (небулайзер) (Mallinckrodt) и небулайзер Acorn II (Marquest Medical Products) (публикации US 5404871 Aradigm, WO

97/22376), где публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки, позволяют получать аэрозоли из растворов, тогда как ингаляторы отмеренных доз, ингаляторы сухого порошка и т. п. образуют аэрозоли из мелких частиц. Эти имеющиеся в продаже ингаляционные устройства приведены в качестве примеров конкретных устройств, пригодных для применения настоящего изобретения, и не ограничивают объем изобретения. Предпочтительно доставлять композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело к ФНО, с помощью ингалятора сухого порошка или распылителя. Ингаляционное устройство для введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения имеет несколько желательных признаков. Например, преимуществом является надежность, воспроизводимость и точность доставки ингаляционным устройством. Ингаляционное устройство может необязательно доставлять небольшие сухие частицы, например менее приблизительно 10 мкм, предпочтительно приблизительно 1-5 мкм, для обеспечения хорошей пригодности для вдыхания.

Введение композиций антител к ФНО в виде спрея. Спрей, включающий белок композиции антител к ФНО, может быть получен путем пропускания суспензии или раствора по меньшей мере одного антитела к ФНО через сопло под давлением. Размер и конфигурация сопла, применяемое давление и скорость подачи жидкости могут быть выбраны таким образом, чтобы достичь требуемого выхода и размера частиц. Например, электрораспыление можно производить с помощью электрического поля в комбинации с подачей через капилляр или сопло. Преимуществом является то, что частицы по меньшей мере одного белка композиции антител к ФНО, доставляемые распылителем, имеют размер частиц менее около 10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

Составы с по меньшей мере одним белком композиции антител к ФНО, приемлемые для применения с распылителем, как правило, включают белок композиции антител в водном растворе в концентрации от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка композиции антител к ФНО на мл раствора или мг/г, или в любом интервале или значении в нем, например, без ограничений, 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 или 100 мг/мл, или мг/г. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации белка композиции антител, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения композиций антител, относятся альбумин, протамин или т. п. К типичным углеводам, используемым для получения белков композиций антител, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т. п. Состав с белком композиции антител может также включать поверхностно-активное вещество, которое может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию белка композиции антител, вызванную атомизацией раствора с образованием аэрозоля. Можно

использовать различные традиционные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 14% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат 20 или т. п. В состав могут также быть включены известные в данной области дополнительные агенты, предназначенные для получения белка, такого как антитела к ФНО, или их указанные участки или варианты.

Введение композиций антител к ФНО с помощью небулайзера. Белок композиции антител можно вводить с помощью небулайзера, такого как струйный небулайзер или ультразвуковой небулайзер. Как правило, в струйном небулайзере для создания высокоскоростной струи воздуха через отверстие используют источник сжатого воздуха. По мере расширения газа за соплом образуется область низкого давления, под действием которой раствор белка, содержащего композицию антител, засасывается через капиллярную трубку, соединенную с резервуаром с жидкостью. На выходе из капиллярной трубки поток жидкости разделяется на нестабильные волокна и капли и образуют аэрозоль. Для получения требуемых рабочих характеристик данного струйного небулайзера можно использовать диапазон конфигураций, скоростей потока и типов дефлекторов. В ультразвуковом небулайзере высокочастотная электрическая энергия преобразуется в вибрационную механическую энергию, обычно при помощи пьезоэлектрического преобразователя. Эта энергия подается на состав белка композиции антител либо напрямую, либо через связующую жидкость, в результате чего образуется аэрозоль, содержащий белок композиции антител. Преимуществом является то, что частицы композиции антитела к ФНО, доставляемые небулайзером, имеют размер частиц менее около 10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

Составы с по меньшей мере одним антителом к ФНО, приемлемые для использования с небулайзером, струйным или ультразвуковым, как правило, имеют концентрацию от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка антител к ФНО на миллилитр раствора. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, относятся альбумин, протамин или т. п. К типичным углеводам, используемым для получения по меньшей мере одного антитела к ФНО, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т. п. Состав с по меньшей мере одним антителом к ФНО может также включать поверхностно-активное вещество, которое

может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию по меньшей мере одного антитела к ФНО, вызванную атомизацией раствора с образованием аэрозоля. Можно использовать различные традиционные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтилensorбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 4% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтилensorбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат 20 или т. п. В препарат белка, такого как белок антитела, могут также быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты.

Введение композиций антител к ФНО с помощью ингалятора отмеренных доз.

В ингаляторе отмеренных доз (MDI) пропеллент, по меньшей мере одно антитело к ФНО и любые эксципиенты или другие добавки содержатся в резервуаре в виде смеси, содержащей сжиженный сжатый газ. Приведение в действие дозирующего клапана высвобождает смесь в виде аэрозоля, предпочтительно с частицами размером менее около 10 мкм, предпочтительно от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм. Требуемый размер частиц аэрозоля можно получить с использованием состава белка композиции антитела, полученного различными способами, известными специалистам в данной области, включая помол в струйной мельнице, распылительную сушку, конденсацию при критической температуре или т. п. Предпочтительные ингаляторы отмеренных доз включают ингаляторы с использованием пропеллента гидрофторуглерода, производимые компаниями 3М или Glaxo.

Составы с по меньшей мере одним антителом к ФНО для применения в ингаляторе отмеренных доз обычно включают мелкодисперсный порошок, содержащий по меньшей мере одно антитело к ФНО в виде суспензии в неводной среде, например суспензии в пропелленте, полученной с помощью поверхностно-активного вещества. Пропеллент может представлять собой любой традиционно используемый для этой цели материал, такой как хлорфторуглерод, гидрохлорфторуглерод, гидрофторуглерод или углеводород, в том числе трихлорфторметан, дихлордифторметан, тетрафтордихлорэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан, HFA-134 а (гидрофторалкан-134а), HFA-227 (гидрофторалкан-227) или т. п. Пропеллент предпочтительно представляет собой гидрофторуглерод. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано для стабилизации по меньшей мере одного антитела к ФНО в виде суспензии в пропелленте для защиты активного агента от химического разложения и т. п. Приемлемые поверхностно-активные вещества включают сорбитантриолеат, соевый лецитин, олеиновую кислоту или т. п. В некоторых случаях предпочтительными являются аэрозоли растворов, в которых используют растворители, такие как этанол. В состав также могут быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты, применяемые для получения препаратов белка.

Специалисту в данной области будет понятно, что способы настоящего изобретения могут быть достигнуты путем введения через легкие по меньшей мере одной

композиции антитела к ФНО через устройства, не описанные в настоящем документе.

Пероральные составы и способ введения. Препараты для перорального применения основаны на одновременном введении вспомогательных веществ (например, резорцинов и неионных поверхностно-активных веществ, таких как полиоксиэтиленолеиловый эфир и н-гексадецилполиэтиленовый эфир) для искусственного увеличения проницаемости стенок кишечника, а также на одновременном введении ингибиторов ферментов (например, ингибиторов трипсина поджелудочной железы, диизопропилфторфосфата (DFF) и тразилола) для ингибирования ферментативного расщепления. Активное составляющее твердой лекарственной формы для перорального введения можно смешивать с по меньшей мере одной добавкой, включая сахарозу, лактозу, целлюлозу, маннит, трегалозу, рафинозу, мальтит, декстран, крахмалы, агар, аргинаты, хитины, хитозаны, пектины, трагакантовую камедь, гуммиарабик, желатин, коллаген, казеин, альбумин, синтетический или полусинтетический полимер и глицерид. Эти лекарственные формы могут также содержать добавки другого (-их) типа (-ов), например неактивный разбавитель, смазывающее вещество, такое как стеарат магния, парабен, консервант, такой как сорбиновая кислота, аскорбиновая кислота, альфа-токоферол, антиоксидант, такой как цистеин, дезинтегратор, связующее вещество, загуститель, буферный агент, подсластитель, ароматизатор, отдушка и т. п.

Таблетки и пилюли можно дополнительно обрабатывать с получением препаратов с кишечнорастворимым покрытием. Жидкие препараты для перорального введения включают эмульсию, сироп, эликсир, суспензию и раствор, подходящие для медицинского применения. Эти препараты могут содержать неактивные разбавители, обычно используемые в указанной области техники, например воду. В качестве систем доставки инсулина и гепарина также описаны липосомы (патент США № 4,239,754). В последнее время для доставки фармацевтических препаратов используют микросферы из искусственных полимеров смешанных аминокислот (протеиноидов) (патент США № 4,925,673). Кроме того, в данной области известны соединения-носители, описанные в патенте США № 5,879,681 и патенте США № 5,587,753, и используемые для перорального введения биологически активных веществ.

Составы и способ введения через слизистую. Для абсорбции через слизистые оболочки композиции и способы введения по меньшей мере одного антитела к ФНО включают эмульсию, содержащую множество субмикронных частиц, мукоадгезивную макромолекулу, биоактивный пептид и непрерывную водную фазу, которая способствует абсорбции через слизистые оболочки за счет достижения адгезии частиц эмульсии к слизистой оболочке (патент США № 5,514,670). Способы введения через слизистые оболочки, приемлемые для введения эмульсий настоящего изобретения, могут включать ротовичный, конъюнктивальный, буккальный, сублингвальный, назальный, вагинальный, легочный, желудочный, кишечный и ректальный способы введения. Составы для вагинального или ректального введения, например суппозитории, в качестве

эксципиентов могут содержать, например, полиалкиленгликоли, вазелин, масло какао и т. п. Составы для интраназального введения могут быть твердыми и содержать в качестве эксципиентов, например, лактозу, или могут представлять собой водные или масляные растворы для закапывания в нос. К эксципиентам для буккального введения относятся сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и т. п. (патент США № 5,849,695).

Чрескожные составы и способ введения. Для чрескожного введения по меньшей мере одно антитело к ФНО инкапсулируют в устройство доставки, такое как липосомы или полимерные наночастицы, микрочастицы, микрокапсулы или микросферы (в совокупности называемые микрочастицами, если не указано иное). Известен ряд приемлемых устройств, в том числе микрочастицы, изготовленные из синтетических полимеров, таких как полигидроксикислоты, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и их сополимеры, полиортоэфир, полиангидриды, полифосфазены, и натуральные полимеры, такие как коллаген, полиаминокислоты, альбумин и другие белки, альгинат и другие полисахариды и их комбинации (патент США № 5,814,599).

Пролонгированное введение и составы. Иногда может потребоваться доставка соединения настоящего изобретения субъекту в течение длительных периодов времени, например в течение периодов от одной недели до одного года, путем однократного введения. Можно использовать различные лекарственные формы с медленным высвобождением, депо или имплантаты. Например, лекарственная форма может содержать фармацевтически приемлемую нетоксичную соль соединений, которая имеет низкую степень растворимости в физиологических жидкостях, например (а) соль присоединения кислоты с многоосновной кислотой, такой как фосфорная кислота, серная кислота, лимонная кислота, винная кислота, дубильная кислота, памовая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинмоно-или дисульфоновая кислота, полигалактуронозная кислота и т. п.; (b) соль многовалентного катиона металла, например цинка, кальция, висмута, бария, магния, алюминия, меди, кобальта, никеля, кадмия и т. п., или с органическим катионом, образованным из, например, N, N'-дибензилэтилендиамином или этилендиамином; или (с) комбинации (а) и (b), например соль таннат цинка. Кроме того, соединения настоящего изобретения или предпочтительно относительно нерастворимая соль, такая как описанные выше, могут быть получены в виде геля, например геля моностеарата алюминия с, например, кунжутным маслом, приемлемого для инъекций. Особенно предпочтительными солями являются соли цинка, соли танната цинка, соли памоата цинка и т. п. Другой тип депонирующего состава с замедленным высвобождением для инъекций будет содержать соединение или соль, диспергированные для инкапсулирования в медленно разлагающемся нетоксичном неантигенном полимере, таком как полимер полимолочная кислота/полигликолевая кислота, например, как описано в патенте США № 3,773,919. Соединения или предпочтительно относительно нерастворимые соли, такие как описанные выше, можно

также готовить в виде пеллет из силастика с холестериновым матриксом, в частности, для применения у животных. В литературе также известны другие препараты для медленного высвобождения, депонирования или имплантации, например газовые или жидкие липосомы (патент США №5,770,222 и публикация «Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems», J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Приведенное выше описание изобретения по существу дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими.

Пример 1: Клонирование и экспрессия антитела к ФНО в клетках млекопитающих

Типичный экспрессионный вектор млекопитающих содержит по меньшей мере один промоторный элемент, опосредующий инициацию транскрипции мРНК, последовательность, кодирующую антитело, и сигналы, необходимые для терминации транскрипции и полиаденилирования транскрипта. К дополнительным элементам относятся энхансеры, последовательности Козака и интроны, фланкированные донорным и акцепторным сайтами для сплайсинга РНК. Высокоэффективной транскрипции можно достигать с помощью ранних и поздних промоторов из SV40, длинных концевых повторов (LTR) из ретровирусов, например RSV, HTLV, HIV, и раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Однако можно также использовать элементы клеток (например, промотор актина человека). Приемлемые экспрессионные векторы для применения на практике настоящего изобретения включают, например, такие векторы, как pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clontech Labs, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) или pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL и PMSG (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) и pBC12MI (ATCC 67109). Клетки-хозяева млекопитающих, которые можно применять, включают клетки человека Hela 293, H9 и клетки Jurkat, мышинные клетки NIH3T3 и C127, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки перепела QC1-3, мышинные L-клетки и клетки яичника китайского хомячка (CHO).

В альтернативном варианте осуществления ген можно экспрессировать в стабильных клеточных линиях, содержащих ген, интегрированный в хромосому. Котрансфекция с селективным маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин или гигромицин, допускает идентификацию и выделение трансфицированных клеток.

Трансфицированный ген можно также амплифицировать для экспрессии больших количеств кодированного антитела. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) используют для развития клеточных линий, несущих несколько сотен или даже несколько тысяч копий интересующего гена. Другим используемым селективным маркером является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). С использованием таких маркеров клетки млекопитающих выращивают в селективной среде и отбирают клетки с наивысшей устойчивостью. Такие клеточные линии содержат амплифицированный (-ые) ген (-ы), интегрированный (-ые) в хромосому. Для продуцирования антител часто используют

клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки NSO.

Экспрессионные векторы pC1 и pC4 содержат сильный промотор (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)) с фрагментом энхансера CMV (Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)). Сайты множественного клонирования, например сайты расщепления рестриктазами BamHI, XbaI и Asp718, облегчают клонирование интересующего гена. Кроме 3'-интрона векторы содержат сигнал полиаденилирования и сигнал терминации гена препроинсулина крысы.

Клонирование и экспрессия в клетках CHO. Для экспрессии антитела к ФНО используют вектор pC4. Плазмида pC4 является производным плазмиды pSV2-dhfr (каталожный номер ATCC 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника или другие клетки китайского хомячка, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гайтерсбург, штат Мэриленд, США) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MTX), хорошо описана раньше (см., например, F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990); M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому лекарственному средству путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного (-ых) гена (-ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

Плазмида pC4 содержит для экспрессии интересующего гена сильный промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент, выделенный из энхансера немедленно раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). После промотора расположены сайты расщепления рестрикционных ферментов BamHI, XbaI и Asp718, которые позволяют интегрировать гены. Позади этих сайтов клонирования плазмида содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии можно также использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор бета-актина человека, ранние или поздние промоторы SV40 или длинные концевые повторы других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV1. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы можно использовать для регулируемой экспрессии ФНО в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК можно также использовать другие сигналы, например, из гормона роста человека

или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, можно также отбирать после котрансфекции с селективным маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является применение сначала более одного селективного маркера, например G418 плюс метотрексат.

Плазмиду pC4 расщепляют рестриктазами и впоследствии дефосфорилируют с использованием кишечной фосфатазы телят в ходе процедур, известных специалистам в данной области. Затем выделяют вектор из 1% агарозного геля.

Впоследствии ДНК, кодирующую выделенные переменную и константную области, и дефосфорилированный вектор лигируют с помощью ДНК-лигазы T4. Затем трансформируют клетки *E. coli* HB101 или XL-1 Blue, и идентифицируют бактерии, содержащие фрагмент, встроенный в плазмиду pC4, посредством, например, анализа рестрикционным ферментом.

Для трансфекции используют клетки яичника китайского хомячка (CHO), лишенные активности гена DHFR. Экспрессионную плазмиду pC4 (5 μ г) котрансфицируют с 0,5 μ г плазмиды pSV2-neo с помощью липофектина. Плазида pSV2-neo содержит доминантный селективный маркер, ген neo из Tn5, который кодирует фермент, придающий устойчивость к группе антибиотиков, включая G418. Клетки высевают в среду альфа минус MEM с добавлением 1 μ г/мл G418. Через 2 дня клетки обрабатывают трипсином и высевают в планшеты для клонирования гибридом (Greiner, Германия) в среде альфа минус MEM с добавлением 10, 25 или 50 нг/мл метотрексата и 1 μ г/мл G418. Через около 10-14 дней отдельные клоны обрабатывают трипсином и впоследствии высевают в 6-луночные чашки Петри или 10-мл флаконы с добавлением различных концентраций метотрексата (50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 400 нМ, 800 нМ). Затем клоны, растущие при самых высоких концентрациях метотрексата, переносят в новые 6-луночные планшеты, содержащие еще более высокие концентрации метотрексата (1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ). Такую же процедуру повторяют до тех пор, пока не получают клоны, растущие при концентрации 100-200 мМ. Экспрессию требуемого генного продукта анализируют, например, методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, или методом анализа ВЭЖХ с обращенной фазой.

Пример 2: Создание высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО, с использованием трансгенных мышей.

Сводная информация. Использовали трансгенных мышей, имеющих гены человеческих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов для получения высокоаффинных полностью человеческих моноклональных антител, которые можно использовать в терапевтических целях для ингибирования действия ФНО и соответственно лечения одного или более ФНО-опосредованных заболеваний. Гибридных мышей (CBA/J x C57/BL6/J) F₂, имеющих трансгены человеческих переменного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизируют

человеческим рекомбинантным ФНО (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)). Посредством нескольких слияний удалось получить одну или более панелей полностью человеческих реактивных в отношении ФНО моноклональных антител IgG. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Все они относятся к типу IgG1κ. Обнаружено, что такие антитела имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми кандидатами для терапевтического применения при заболеваниях, патологиях или расстройствах, связанных с ФНО.

Сокращения. BSA - бычий сывороточный альбумин; CO₂ - диоксид углерода; DMSO - диметилсульфоксид; EIA - иммуноферментный анализ; FBS - эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ - перекись водорода; HRP - пероксидаза хрена; в/д - внутридермально; Ig - иммуноглобулин; ФНО - фактор некроза опухоли альфа; в/б - внутрибрюшинно; в/в - внутривенно; мАт - моноклональное антитело; OD - оптическая плотность; OPD - диgidрохлорид о-фенилендиамина; PEG - полиэтиленгликоль; PSA - пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ - комнатная температура; п/к - подкожно; об./об. - объем на объем; масс./об. - масса на объем.

Материалы и способы

Животные. Трансгенные мыши, способные экспрессировать человеческие антитела, известны специалистам в данной области (и предлагаются к продаже, например, компанией GenPharm International, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США; Abgenix, Фримонт, штат Калифорния, США и т. д.), и они экспрессируют человеческие иммуноглобулины, а не мышинный IgM или Igκ. Например, такие трансгенные мыши содержат трансгены человеческой последовательности, которые подвергают соединению V(D)J, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора иммуноглобулинов человеческой последовательности (Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994)). Трансген легкой цепи может быть получен, например, частично из клона искусственной хромосомы дрожжей, включающего почти половину Vκ-участка человеческой зародышевой линии. Кроме того, трансген тяжелой цепи может кодировать человеческие константные области мκ и γ1 (Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)) и/или γ3. Мышей, полученных из соответствующих генотипических линий, можно использовать в процессах иммунизации и слияния для создания полностью человеческих моноклональных антител к ФНО.

Иммунизация. Для создания человеческих гибридом к ФНО можно использовать одну или более схем иммунизации. Первые несколько слияний можно выполнять по приведенному ниже примеру протокола иммунизации, но можно использовать и другие аналогичные известные протоколы. Несколько самок и/или хирургически кастрированных трансгенных самцов мышей возрасте 14-20 недель иммунизируют в/б или в/д, используя 1-1000 мкг рекомбинантного человеческого ФНО, эмульгированного с равным объемом

TITERMAX, или полным адьювантом Фрейнда в конечном объеме 100-400 мкл (например, 200). Каждой мыши могут также необязательно давать 1-10 мкг в 100 мкл физиологического раствора в каждый из 2 участков п/к введения. Впоследствии мышей можно иммунизировать через 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 и/или 21-34 дней в/б (1-400 мкг) и п/к (1-400 мкг x 2) ФНО, эмульгированным с равным объемом TITERMAX или неполным адьювантом Фрейнда. Через 12-25 и 25-40 дней у мышей вызывали кровотечение путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Впоследствии крови дают свернуться при КТ в течение одного часа, собирают сыворотку и титруют с помощью EIA-анализа на ФНО в соответствии с известными способами. Слияния выполняют, когда повторные инъекции не вызывают увеличения титра. В это время мышам путем в/в введения можно вводить бустерную инъекцию 1-400 мкг ФНО, разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через три дня мышей можно умерщвлять посредством смещения шейных позвонков, извлекать селезенки в асептических условиях и погружать их в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленциты собирают путем стерильной перфузии селезенки при помощи PSA-PBS. Клетки однократно промывают в холодном PSA-PBS, подсчитывают с использованием вытеснения трипанового синего и ресуспендируют в среде RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes.

Слияние клеток. Слияние можно проводить при соотношении 1 : 1 к 1 : 10 клеток мышинной миеломы и жизнеспособных клеток селезенки в соответствии, например, с известными специалистам способами. В качестве не имеющего ограничительного характера примера клетки селезенки и клетки миеломы можно совместно гранулировать. Впоследствии осадок можно медленно ресуспендировать в течение более 30 секунд в 1 мл раствора PEG/PBS с концентрацией 50% (мас/об) (PEG с молекулярной массой 1450, Sigma) при температуре 37 °C. Затем слияние можно останавливать путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes (37 °C) в течение 1 минуты. Слитые клетки центрифугируют в течение 5 минут при 500-1500 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде НАТ (среда RPMI 1640, содержащая 25 мМ Hepes, 10% сыворотки Fetal Clone I (Hyclone), 1 мМ пирувата натрия, 4 мМ L-глутамина, 10 мкг/мл гентамицина, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 10% 653-кондиционированной среды RPMI 1640/Hepes, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии наносили в объеме 200 мкл/лунка на пятнадцать 96-луночных плоскодонных планшетов для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор 37 °C, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7-10 суток.

Обнаружение человеческих антител к ФНО IgG в сыворотке крови мышей.

Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО, можно использовать твердофазный EIA. Если коротко, планшеты можно оставлять покрываться в растворе ФНО в PBS (2 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15 М солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки можно

блокировать 1% (мас./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 часа при КТ. Планшеты немедленно используют или замораживают при -20°C для будущего использования. Разведенные растворы мышиной сыворотки инкубируют на планшетах, покрытых ФНО, по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 часа. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc, разведенными 1 : 30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 часа при КТ. Планшеты снова промывали и в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М фосфата натрия, 0,01% H_2O_2 и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляют стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрируют оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы. Положительные по росту гибридомы, секретирующие полностью человеческие иммуноглобулины, можно обнаруживать с помощью приемлемого EIA-анализа. Если коротко, на лунки 96-луночных планшетов с выпуклым дном (VWR, 610744) можно наносить 10 мкг/мл козьего анти-человеческого IgG к Fc в натрий-карбонатном буфере на ночь при 4°C . Планшеты промывают и блокируют 1% BSA-PBS в течение одного часа при 37°C и немедленно используют или замораживают при -20°C . Неразбавленные супернатанты гибридомы инкубируют на планшетах в течение одного часа при 37°C . Планшеты промывали и зондировали мечеными HRP козьими антителами к каппа-цепи иммуноглобулина человека, разведенными 1 : 10 000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при 37°C . Впоследствии планшеты инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.

Определение реакционной способности полностью человеческого антитела к ФНО. Как указано выше, гибридомы можно одновременно анализировать на реактивность к ФНО с помощью приемлемого анализа RIA или другого анализа. Например, супернатанты инкубировали на планшетах с Fc козьими антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше, промывали, а впоследствии зондировали радиоактивно-меченым ФНО с подсчетом соответствующих количеств на лунку в течение 1 часа при КТ. Лунки дважды промывают PBS и количественно оценивают связанный радиоактивно-меченный ФНО с помощью приемлемого счетчика.

Гибридомы, секретирующие человеческое антитело IgG1к к ФНО, могут быть размножены в клеточной культуре и последовательно субклонированы путем предельного разведения. Полученные клональные популяции можно размножать и криоконсервировать в среде для замораживания (95% FBS, 5% DMSO) и хранить в жидком азоте.

Изотипирование. Определение изотипа антител может быть выполнено с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышиной иммунной сыворотки на специфические титры. ФНО можно наносить на 96-луночные планшеты, как описано выше, и очищенное антитело в концентрации 2 мкг/мл можно инкубировать на

планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывают и тестируют меченным HRP козым антителом к человеческому IgG₁ или меченным HRP козым антителом к человеческому IgG₃, разведенным 1 : 4000 в 1% BSA-PBS в течение одного часа при КТ. Планшет снова промывают и инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.

Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО с человеческим ФНО. Характеристики связывания антител можно соответствующим образом оценивать, например, с помощью EIA-технологии с захватом ФНО и BIAcore. Определенные концентрации очищенных человеческих антител к ФНО можно оценивать на связывание с планшетами EIA, покрытыми 2 мкг/мл ФНО, в описанных выше анализах. Впоследствии можно представлять значения оптической плотности в виде полулогарифмических графиков, демонстрирующих относительную эффективность связывания.

Количественные константы связывания можно получать, например, следующим способом или любым другим известным приемлемым способом. Чип BIAcore CM-5 (карбоксиметил) помещают в устройство BIAcore 2000. Буфер HBS (0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) пропускают через проточную кювету чипа со скоростью 5 мкл/мин до получения стабильной фоновой линии. Раствор (100 мкл) 15 мг EDC (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорид) в 200 мкл воды добавляли к 100 мкл раствора 2,3 мг NHS (N-гидроксисукцинимид) в 200 мкл воды. На чип наносят 40 (сорок) мкл полученного раствора. На чип наносят шесть мкл раствора человеческого ФНО (15 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8), что приводит к увеличению приблизительно на 500 RU. Буфер меняют на рабочий буфер TBS/Ca/Mg/BSA (20 мМ Tris, 0,15 М хлорида натрия, 2 мМ хлорида кальция, 2 мМ ацетата магния, 0,5% Triton X-100, 25 мкг/мл BSA, pH 7,4) и пропускают через чип в течение ночи для уравнивания и гидролиза или кэпирования любых непрореагировавших сложных эфиров сукцинимидов.

Антитела растворяют в рабочем буфере при концентрациях 33,33, 16,67, 8,33 и 4,17 нМ. Скорость потока доводят до 30 мкл/мин, а температуру прибора - до 25 °С. Для кинетических прогонов используют две проточные кюветы, где на одной из них иммобилизован ФНО (образец), а вторая является недериватизированной (холостая). По 120 мкл каждой концентрации антитела пропускают через проточные кюветы со скоростью 30 мкл/мин (фаза ассоциации) с последующим непрерывным пропуском потока буферного раствора в течение 360 секунд (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерируют (комплекс фактор некроза опухоли альфа/диссоциированного антитела) путем двух последовательных инъекций 2М гуанидинтиоцианата по 30 мкл каждая.

Анализ данных проводят с использованием BIA 3.0 или CLAMP 2.0, как известно специалистам в данной области. Для каждой концентрации антитела пустую сенсограмму вычитают из сенсограммы образца. Общую аппроксимацию выполняли как для диссоциации (K_d , с⁻¹), так и для ассоциации (k_a , моль⁻¹ с⁻¹) и вычисляли константу диссоциации (K_D , моль) (k_d/k_a). Если аффинность антитела настолько высока, что

значения RU захваченного антитела составляют > 100 , проводят дополнительные разведения антитела.

Результаты и обсуждение

Получение моноклональных антител к человеческому ФНО. Проводят несколько слияний, и для каждого слияния выполняют посев в 15 планшет (1440 лунок/слияние), что дает несколько десятков антител, специфичных к человеческому ФНО. Обнаружено, что некоторые из них состоят из комбинации человеческих и мышиных цепей Ig. Оставшиеся гибридомы секретируют антитела к ФНО, состоящие только из человеческих тяжелых и легких цепей. Ожидается, что все человеческие гибридомы будут относиться к типу IgG1k.

Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО. Анализ методом твердофазного ИФА подтверждает, что очищенные антитела из большинства или всех этих гибридом связываются с ФНО концентрационно-зависимым образом. На Фиг. 1 и Фиг. 2 показаны результаты относительной эффективности связывания этих антител. В этом случае измеряют авидность антитела к его распознаваемому антигену (эпиту). Следует отметить, что при связывании ФНО непосредственно с планшетом для ЕΙΑ возможна денатурация белка, и кажущиеся аффинности связывания не могут отражать связывание с неденатурированным белком. В диапазоне концентраций обнаруживается пятидесятипроцентное связывание.

Количественные константы связывания получали с помощью анализа VIAcore человеческих антител, и результаты показали, что некоторые из человеческих моноклональных антител имеют очень высокую аффинность с K_D в диапазоне от 1×10^{-9} до 7×10^{-12} .

Выводы

Несколько слияний выполняли с использованием спленоцитов от гибридных мышей, содержащих трансгены человеческих антител вариабельного и константного участков, иммунизированных человеческим ФНО. Был создан набор из нескольких полностью человеческих реактивных к ФНО моноклональных антител IgG изотипов IgG1k. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Несколько полученных антител имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми для терапевтического применения при ФНО-зависимых заболеваниях, патологиях или сходных состояниях.

Пример 3. Создание человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО-альфа

Сводная информация. Гибридных мышей (CBA/J x C57BL/6J) F₂ (1-4), имеющих трансгены человеческих вариабельного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизировали рекомбинантным человеческим ФНО α . В результате одного слияния, GenTNV, получали восемь полностью человеческих моноклональных антител IgG1k, которые связываются с иммобилизованным рекомбинантным

человеческим ФНО α . Вскоре после идентификации восемь клеточных линий передавали молекулярным биологам для дополнительного определения характеристик. Поскольку эти мАт являются полностью человеческими по последовательности, ожидается, что они будут у людей менее иммуногенными, чем антитела сА2 (Remicade).

Сокращения. BSA - бычий сывороточный альбумин; CO₂ - диоксид углерода; DMSO - диметилсульфоксид; EIA - иммуноферментный анализ; FBS - эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ - перекись водорода; HC - тяжелая цепь; HRP - пероксидаза хрена; в/д - внутривенно; Ig - иммуноглобулин; ФНО - фактор некроза опухоли альфа; в/б - внутрибрюшинно; в/в - внутривенно; мАт - моноклональное антитело; OD - оптическая плотность; OPD - диgidрохлорид о-фенилендиамина; PEG - полиэтиленгликоль; PSA - пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ - комнатная температура; п/к - подкожно; ФНО α - фактор некроза опухоли альфа; об./об. - объем на объем; масс./об. - масса на объем.

Введение. Для создания полностью человеческих моноклональных антител, специфичных к рекомбинантному ФНО α человека, использовали трансгенных мышей, имеющих человеческие гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Есть надежда, что эти уникальные антитела можно использовать, поскольку сА2 (Remicade) используют для терапевтического ингибирования воспалительных процессов, связанных с опосредованным ФНО α заболеванием, и при этом присутствует полезный эффект увеличения периода полужизни в сыворотке и уменьшения побочных эффектов, связанных с иммуногенностью.

Материалы и способы

Животные. В GenPharm International были разработаны трансгенные мыши, экспрессирующие человеческие иммуноглобулины, но не мышьиные IgM или Igk. Эти мыши имеют функциональные трансгены человеческих антител, которые подвергают соединению V(D)J, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора антиген-специфических человеческих иммуноглобулинов (1). Трансгены легкой цепи частично получены из клона искусственной хромосомы дрожжей, который включает в себя почти половину человеческого локуса V κ зародышевой линии. Кроме нескольких генов VH трансген тяжелой цепи (HC) кодирует как человеческие константные области μ , так и человеческие константные области γ 1 (2) и/или γ 3. В процессе иммунизации и слияния для создания моноклональных антител, описанных в настоящем документе, использовали мышь, полученную из генотипической линии HCo12/KCo5.

Очистка человеческого ФНО α . ФНО α человека очищали из супернатанта тканевой культуры клеток C237A с помощью аффинной хроматографии на колонке, заполненной гибридным белком рецептор ФНО α -Fc (p55-sf2) (5), связанным с сефарозой 4B (Pharmacia). Супернатант клеток смешивали с одной девятой его объема 10-кратного PBS Дульбекко (D-PBS) и пропускали через колонку при 4 °C со скоростью 4 мл/мин. Впоследствии колонку промывали PBS, и элюировали ФНО α 0,1 М цитратом натрия, pH

3,5, и нейтрализовали 2М трис-HCl, pH 8,5. Очищенный ФНО α заменяли на буфер в 10 мМ Tris, 0,12 М хлорида натрия pH 7,5 и фильтровали через шприцевой фильтр на 0,2 мкм.

Иммунизация. Самку мыши GenPharm в возрасте приблизительно 16 недель иммунизировали в/б (200 мкл) и в/д (100 мкл в основании хвоста), используя суммарно 100 мкг ФНО α (партия JG102298 или JG102098), эмульгированного равным объемом адъюванта Titermax, в дни 0, 12 и 28. У мыши вызывали кровотечение в дни 21 и 35 путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Кровь оставляли для свертывания при КТ на один час и сыворотку собирали и титровали с помощью твердофазного ЕІА на ФНО α . Слияние, именуемое GenTNV, проводили после того, как мыши отдыхали в течение семи недель после инъекции в день 28. Мышам с титром IgG человека, равным 1:160, против ФНО α , проводили конечную бустерную в/в инъекцию 50 мкг ФНО α , разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через три дня мышь умерщвляли посредством смещения шейных позвонков, селезенку извлекали в асептических условиях и погружали в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленоциты собирали путем стерильной перфузии селезенки PSA-PBS. Клетки однократно промывали в холодном PSA-PBS, подсчитывали с использованием счетчика Культера и ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes.

Клеточные линии. Несекретирующий партнер по слиянию мышиной миеломы (линия 653) получала группа Cell Biology Services (CBS) 14 мая 1997 г. от группы по разработке продуктов компании Centocor. Клеточную линию размножали в среде RPMI (JRH Biosciences) с добавлением 10% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 1 мМ пирувата натрия, 0,1 мМ NEAA, 2 мМ L-глутамина (все производства JRH Biosciences) и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), а затем хранили в морозильнике с жидким азотом, в паровой фазе в CBS. Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories). Клетки до слияния поддерживали в логарифмической фазе культуры. Перед слиянием их промывали в PBS, подсчитывали и определяли жизнеспособность (> 95%) посредством исключения красителя трипанового синего.

ФНО α человека получали при помощи рекомбинантной клеточной линии, именуемой C237A, и полученной в подразделении Molecular Biology компании Centocor. Клеточную линию размножали в среде IMDM (JRH Biosciences) с добавлением 5% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 2 мМ L-глутамина (все производства JRH Biosciences) и 0,5 мкг/мл микофеноловой кислоты и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), впоследствии хранили в морозильнике с жидким азотом в паровой фазе в CBS (13). Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories).

Слияние клеток. Слияние клеток проводили при соотношении 1 : 1 клеток мышиной миеломы 653 и жизнеспособных клеток мышиной селезенки. Если коротко,

клетки селезенки и клетки миеломы совместно осаждали. Осадок медленно ресуспендировали в течение 30 секунд в 1 мл раствора 50% (масс./об.) PEG/PBS (молекулярная масса PEG 1450 г/моль, Sigma) при 37 °C. Слияние останавливали путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI (без добавок) (JRH) (37 °C) в течение 1 минуты. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при 750 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде HAT (среда RPMI/HEPES, содержащая 10% фетальную бычью сыворотку (JRH), 1 mM пирувата натрия, 2 mM L-глутамина, 10 мкг/мл гентамицина, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 1% 653-кондиционированную среду RPMI, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии высевали по 200 мкл/лунка в пяти 96-луночных плоскодонных планшетах для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор при 37 °C, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7-10 дней.

Обнаружение человеческих антител IgG к ФНО α в сыворотке крови мышей. Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО α , использовали твердофазный EIA. Если коротко, планшеты оставляли покрываться в растворе ФНО α в PBS (1 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15 М солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки блокировали 1% (мас./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 часа при КТ. Планшеты либо немедленно использовали, либо замораживали при -20°C для будущего использования. Сыворотку крови мыши инкубировали в двукратных серийных разведениях на планшетах, покрытых человеческим ФНО α , по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 часа. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc (Accurate), разведенными 1 : 30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 часа при КТ. Планшеты снова промывали и в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М фосфата натрия, 0,01% H₂O₂ и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляли стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрировали оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы. Поскольку мышь GenPharm способна образовывать мышьиные и человеческие иммуноглобулиновые цепи, для тестирования жизнеспособных клонов гибридомы использовали два отдельных теста EIA на присутствие как человеческих легких, так и человеческих тяжелых цепей. Планшеты покрывали, как описано выше, и неразбавленные супернатанты гибридомы инкубировали на планшетах в течение одного часа при 37 °C. Планшеты промывали и зондировали либо конъюгированными с HRP козьими антителами к каппа-цепи человеческого антитела (Southern Biotech), разведенными 1 : 10 000 в 1% BSA-HBSS, либо конъюгированными с HRP козьими антителами к человеческому IgG, разведенными до 1 : 30 000 в 1% BSA-HBSS, в течение одного часа при 37 °C. Впоследствии планшеты инкубировали с раствором субстрата, как описано

выше. Клоны гибридомы, которые не давали положительного сигнала как в формате с каппа-цепью человека, так и в формате антитела к человеческому IgG с Fc EIA, отбрасывали.

Изотипирование. Определение изотипа антител выполняли с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышинной иммунной сыворотки на специфические титры. Планшеты для EIA покрывали козьими антителами к человеческому IgG (H+L) в концентрации 10 μ г/мл в натрий-карбонатном буфере в течение ночи при 4 EC и блокировали, как описано выше. Чистые супернатанты культур из 24 лунок инкубировали на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывали и зондировали мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ (сайт связывания), разведенными в соотношении 1 : 4000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при комнатной температуре. Планшет снова промывали и инкубировали с раствором субстрата, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Создание полностью человеческих моноклональных антител к ФНО α человека. Одно слияние, называемое GenTNV, выполнял для мыши GenPharm, иммунизированной рекомбинантным белком ФНО α человека. После данного слияния провели отсевали 196 жизнеспособных гибридов. Было выявлено восемь гибридных клеточных линий, секретирующих полностью человеческие антитела IgG, реагирующие с ФНО α человека. Каждая из этих восьми клеточных линий секретирует иммуноглобулины человеческого изотипа IgG1 κ , и все субклонировали дважды путем предельного разведения для получения стабильных клеточных линий (однородность > 90%). Названия клеточных линий и соответствующие С-кодовые обозначения приведены в таблице 1. Каждую клеточную линию замораживали в исследовательских клеточных банках на 12 флаконов, хранимых в жидком азоте.

Родительские клетки, собранные из лунок 24-луночной культуральной чашки каждой из восьми клеточных линий, были переданы в группу Molecular Biology в 18.02.99 для трансфекции и дополнительного определения характеристик.

Таблица 1: Обозначения клеточных линий GenTNV

Название	С-кодовое обозначение
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

Заключение

Слияние GenTNV проводили с использованием спленоцитов гибридной мыши,

имеющей трансгены вариабельной и константной областей антител человека, которая была иммунизирована рекомбинантным ФНО α человека, полученным в компании Centocor. Получали восемь полностью человеческих, реагирующих на ФНО-альфа моноклональных антител IgG изотипа IgG1 κ . Родительские клеточные линии были переданы в группу Molecular Biology для дальнейшего определения характеристик и разработки. Одно из этих новых человеческих антител можно использовать в противовоспалительном препарате, благодаря потенциальному преимуществу уменьшения иммуногенности и аллергических осложнений по сравнению с Remicade.

Справочная литература

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

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

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

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

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

Пример 4: Клонирование и подготовка клеточных линий, экспрессирующих человеческое антитело к ФНО α

Сводная информация. Было обнаружено, что панель из восьми человеческих моноклональных антител (мАт) с обозначением TNV связывается с иммобилизованным ФНО α человека с очевидно высокой авидностью. Было показано, что семь из восьми мАт эффективно блокируют связывание человеческого ФНО α с рекомбинантным рецептором к ФНО. Анализ последовательности ДНК, кодирующей семь мАт, подтвердил, что все мАт имели человеческие V-области. Последовательности ДНК также продемонстрировали, что три пары мАт были идентичны друг другу так, что исходная панель из восьми мАт содержала только четыре различных мАт, обозначенных как TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. На основании анализа выявленных аминокислотных последовательностей мАт и результатов по данным по нейтрализации ФНО α *in vitro* для дальнейшего исследования отбирали мАт TNV148 и TNV14.

Поскольку при поиске по базе данных остаток пролина в положении 75 (каркас 3) в тяжелой цепи TNV148 не был обнаружен в этом положении в других человеческих антителах той же подгруппы, был проведен сайт-направленный мутагенез ДНК для кодирования остатка серина в этом положении, чтобы он соответствовал известным каркасным последовательностям зародышевой линии. Модифицированное серином мАт обозначали как TNV148B. ПЦР-амплифицированную ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей TNV148B и TNV14, клонировали во вновь полученные экспрессионные векторы, основанные на недавно клонированных генах тяжелой и легкой цепей другого человеческого мАт (12B75), описанного в заявке на патент США № 60/236,827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной «IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses», опубликованной как WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Клетки P3X63Ag8.653 (653) или клетки миеломы мышей Sp2/0-Ag14 (Sp2/0)

трансфицировали соответствующими экспрессионными плазмидами тяжелой и легкой цепей и отсеивали посредством двух циклов субклонирования клеточных линий, получая высокие уровни рекомбинантных мАт TNV148B и TNV14 (rTNV148B и rTNV14). Оценки кривых роста и стабильности продукции мАт с течением времени показали, что трансфицированные 653-клоны C466D и C466C стабильно продуцировали приблизительно 125 μ г/мл мАт rTNV148B в отработанных культурах, а трансфицированные Sp2/0-клоны 1.73-12-122 (C467A) стабильно продуцировали приблизительно 25 μ г/мл мАт rTNV148B в отработанных культурах. Аналогичные анализы показали, что трансфицированный Sp2/0-клон C476A продуцировал 18 μ г/мл rTNV14 в отработанных культурах.

Введение. Ранее было показано, что панель из восьми мАт, полученных от иммунизированных человеческим ФНО α мышей GenPharm/Medarex (генотип HCo12/KCo5), связывается с ФНО α человека и имеет полностью человеческий изотип IgG1 каппа. Для определения в примерах мАт настоящего изобретения возможности наличия ФНО α -нейтрализующей активности использовали простой анализ связывания и оценивали их способность блокировать связывание ФНО α с рекомбинантным рецептором ФНО. На основании этих результатов данных о последовательности ДНК и определения характеристик *in vitro* нескольких мАт для дальнейшего определения характеристик отбирали мАт TNV148.

Последовательности ДНК, кодирующие мАт TNV148, клонировали, модифицировали для встраивания в экспрессионные векторы генов, которые кодируют приемлемые константные участки, внедряли в хорошо охарактеризованные клетки мышинных миелом 653 и Sp2/0 и отсеивали трансфицированные клеточные линии, пока не выявляли субклоны, которые продуцировали в 40 раз больше мАт, чем исходная гибридная клеточная линия.

Материалы и способы

Реагенты и клетки. Реагент TRIZOL был приобретен у компании Gibco BRL. Протеиназа К была получена от компании Sigma Chemical Company. Обратную транскриптазу приобретали в компании Life Sciences, Inc. ДНК-полимеразу Taq получали от компании Perkin Elmer Cetus или Gibco BRL. Рестрикционные ферменты приобретали у New England Biolabs. Набор для очистки QIAquick PCR приобретали у компании Qiagen. Набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange был приобретен у компании Stratagene. Наборы для получения минипрепаратов плазмид Wizard и ингибитор РНКаз RNasin приобретали в компании Promega. Планшеты Optiplates были приобретены у компании Packard. 125 Йод был приобретен у компании Amersham. Создаваемые на заказ олигонуклеотиды приобретали у компании Keystone/Biosource International. Названия, идентификационные номера и последовательности олигонуклеотидов, используемых в данной работе, показаны в таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотиды, используемые для клонирования, конструирования или определения последовательности генов мАт TNV

Аминокислоты, кодируемые олигонуклеотидом 5'14s и HuH-J6, показаны над последовательностью. Аминокислотный остаток «М» представляет собой кодон начала трансляции. Подчеркнутые последовательности в олигонуклеотидах 5'14s и HuH-J6 обозначают сайты рестрикции BsiWI и BstBI соответственно. Слеш в HuH-J6 соответствует границе экзон/интрон. Следует отметить, что олигонуклеотиды, последовательность которых соответствует минус-нити, записаны в ориентации 3'-5'.

<u>Название</u>	<u>ИД</u>	<u>Последовательность</u>
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10)
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO:11)
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12)
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14)
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15)
HVKRNA seq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
Bsi WI		M D W T W S I (SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5'-TTTC <u>CGTACGCC</u> ACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID NO:18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21)
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3' (SEQ ID NO:22)
T V T V S S		BstBI (SEQ ID NO:23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCA <u>AAGCTT</u> AAGTT-5' (SEQ ID NO:24)
SalI	M D M R V	(SEQ ID NO:25)
LK7s	362	5'-TTTGT <u>CGACAC</u> CATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26)

LVgs	363	5'-TTTGTGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27)
T K V D I K		(SEQ ID NO: 28) Af12
HuL-J3	380	3'CTGGTTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAGAATTCGGCGCCTTT (SEQ ID NO:29)
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATtCCAAGAACACGCTGTATC-3' (SEQ ID NO:30)
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5' (SEQ ID NO:31)

Получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы 653. Флакон размораживали на этот же день и размножали в Т-флаконах в среде IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамин (среда). Эти клетки поддерживали в непрерывной культуре до трансфицирования через 2-3 недели при помощи ДНК антитела к ФНО α , описанной в настоящем документе. Некоторые культуры собирали через 5 суток после оттаивания, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 95% FBS, 5% DMSO, аликвотировали в 30 флаконов, замораживали и хранили для дальнейшего применения. Аналогичным образом получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы Sp2/0. Флакон размораживали, подготавливали к новой заморозке, как описано выше, и хранили замороженные флаконы в морозильных боксах CBC AA и AB. Эти клетки размораживали и использовали для всех трансфекций Sp2/0, описанных в настоящем документе.

Анализ на ингибирование связывания ФНО с рецептором. Супернатанты гибридных клеток, содержащие мАт TNV, использовали для анализа способности мАт блокировать связывание 125 I-меченого ФНО α с рекомбинантным гибридным белком рецептора к ФНО p55-sf2 (Scallon et al. (1995) Cytokine 7:759-770). На планшеты Optiplates добавляли 50 μ л p55-SF2 в концентрации 0,5 μ г/мл в PBS, чтобы покрыть лунки в течение одного часа инкубации при 37 $^{\circ}$ C. Готовили серийные разведения восьми супернатантов клеток TNV в круглодонных 96-луночных планшетах с использованием PBS/ 0,1% BSA в качестве разбавителя. Супернатант клеток, содержащий мАт к IL-18, использовали в качестве отрицательного контроля, а такой же супернатант антител к IL-18 с добавлением сА2 (химерное антитело к ФНО, Remicade, патент США № 5,770,198, полностью включенный в настоящий документ путем ссылки) использовали в качестве положительного контроля. 125 I-меченный ФНО α (58 Кю/г, D. Shealy) добавляли к 100 μ л супернатанта клеток с конечной концентрацией ФНО α 5 нг/мл. Смесь предварительно инкубировали в течение одного часа при КТ. Планшеты Optiplates с нанесенным покрытием промывали для удаления несвязанного p55-sf2 и в планшеты Optiplates переносили 50 μ л смеси 125 I-ФНО α /супернатант клеток. Через 2 ч при КТ планшеты Optiplates трижды промывали PBS-Tween. Добавляли 100 μ л реактива Microscint-20 и определяли число импульсов в минуту с использованием гамма-счетчика TopCount.

Амплификация V-генов и анализ последовательности ДНК. Клетки гибридомы промывали один раз в PBS, а затем добавляли реагент TRIZOL для подготовки РНК. Количество клеток от 7×10^6 до $1,7 \times 10^7$ ресуспендировали в 1 мл TRIZOL. Пробирки энергично встряхивали после добавления 200 мкл хлороформа. Пробы центрифугировали при 4 °С в течение 10 минут. Водную фазу переносили в новую микроцентрифужную пробирку и добавляли равный объем изопропанола. Пробирки энергично встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Впоследствии пробы центрифугировали при 4 °С в течение 10 минут. Осадок однократно промывали 1 мл 70% этанола и кратковременно высушивали в вакуумной сушилке. Осадки РНК ресуспендировали в 40 мкл обработанной DEPC воды. Качество препаратов РНК определяли путем фракционирования 0,5 мкл в 1% агарозном геле. До использования РНК хранили в морозильной камере при температуре -80 °С.

Для получения кДНК тяжелой и легкой цепей получали смеси, которые содержали 3 мкл РНК и 1 мкг олигонуклеотида 119 (тяжелая цепь) или олигонуклеотида 117 (легкая цепь) (см. таблицу 1) в объеме 11,5 мкл. Смесь инкубировали при 70°С в течение 10 минут на водяной бане, а впоследствии охлаждали на льду в течение 10 минут. Получали отдельную смесь, состоящую из 2,5 мкл 10-кратного буфера обратной транскриптазы, 10 мкл 2,5 mM dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы (20 единиц) и 0,4 мкл ингибитора рибонуклеазы RNasin (1 единица). 13,5 мкл этой смеси добавляли к 11,5 мкл охлажденной смеси РНК/олигонуклеотид и инкубировали реакционную смесь в течение 40 минут при 42 °С. Впоследствии реакционную смесь синтеза кДНК хранили до использования в морозильной камере при -20 °С.

Неочищенные кДНК тяжелой и легкой цепей использовали в качестве матриц для ПЦР-амплификации последовательностей, кодирующих вариабельную область. Одновременно тестировали пять пар олигонуклеотидов (366/354, 367/354, 368/354, 369/354 и 370/354, таблица 1) на способность праймировать амплификацию ДНК тяжелой цепи. Две пары олигонуклеотидов (362/208 и 363/208) одновременно тестировали на способность праймировать амплификацию ДНК легкой цепи. ПЦР проводили с использованием 2 единиц Taq ДНК-полимеразы PLATINUM™ высокой точности (HIFI) в общем объеме 50 мкл. Каждая реакционная смесь включала в себя 2 мкл реакционной смеси кДНК, по 10 пмоль каждого олигонуклеотида, 0,2 mM dNTP, 5 мкл 10X буфера HIFI и 2 mM сульфата магния. Программа термоциклера была следующей: температура 95°С в течение 5 минут, затем 30 циклов (94°С в течение 30 секунд, 62°С в течение 30 секунд, 68°С в течение 1,5 минуты). Впоследствии выполняли конечную инкубацию при 68 °С в течение 10 минут.

Для подготовки ПЦР-продуктов для прямого секвенирования ДНК их очищали с использованием набора QIAquick™ PCR Purification Kit в соответствии с протоколом производителя. ДНК элюировали из центрифужной колонки, используя 50 мкл стерильной воды, а впоследствии высушивали до объема 10 мкл с помощью вакуумной сушилки. Затем готовили реакционные смеси для секвенирования ДНК, содержащие 1

мкл очищенного продукта ПЦР, 10 мкМ олигонуклеотидного праймера, 4 мкл готовой реакционной смеси BigDye Terminator™ и 14 мкл стерильной воды до общего объема 20 мкл. Продукты ПЦР тяжелых цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 367/354, секвенировали с использованием олигонуклеотидных праймеров 159 и 360. Продукты ПЦР легких цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 363/208, секвенировали с использованием олигонуклеотидов 34 и 163. Программа термоциклера для секвенирования представляла собой 25 циклов (96°C в течение 30 секунд, 50 °C в течение 15 секунд, 60°C в течение 4 минут) с последующим выдерживанием в течение ночи при 4 °C. Продукты реакции фракционировали через полиакриламидный гель и детектировали с использованием ДНК-секвенатора ABI 377.

Сайт-направленный мутагенез для замены аминокислоты. Один нуклеотид в последовательности ДНК вариабельной области тяжелой цепи TNV148 изменяли, чтобы заменить Pro⁷⁵ остатком серина в мАт TNV148. Были разработаны и заказаны комплементарные олигонуклеотиды 399 и 400 (таблица 1) для такого изменения с использованием способа сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ в соответствии с описанием производителя. Два олигонуклеотида сначала фракционировали через 15% полиакриламидный гель и очищали основные полосы. Реакции мутагенеза проводили с использованием либо 10 нг, либо 50 нг плазмидной матрицы тяжелой цепи TNV148 (p1753), 5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 1 мкл смеси dNTP, 125 нг праймера 399, 125 нг праймера 400 и 1 мкл ДНК-полимеразы Pfu. Добавляли стерильную воду для доведения общего объема до 50 мкл. Впоследствии реакционную смесь инкубировали в термоциклере, запрограммированном на инкубацию при 95°C в течение 30 секунд, впоследствии проводили цикл 14 раз с последовательными инкубациями: 95°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 1 минуты, 64°C в течение 1 минуты и 68°C в течение 7 минут, затем 30 °C в течение 2 минут (1 цикл). Данные реакции были разработаны для включения мутагенных олигонуклеотидов в идентичные по остальным параметрам вновь синтезированные плазмиды. Для избавления от исходных плазмид TNV148 пробы инкубировали при 37°C в течение 1 часа после добавления 1 мкл эндонуклеазы DpnI, которая расщепляет только исходную метилированную плазмиду. Один мкл реакционной смеси впоследствии использовали для трансформации E.coli Epicurian Coli XL1-Blue стандартными способами теплового шока и трансформированные бактерии, идентифицированные после посева на планшеты с агаром с LB-ампициллином. Плазмидные минипрепараты готовили с использованием наборов Wizard™ в соответствии с инструкциями производителя. После элюирования пробы из колонки Wizard™ плазмидную ДНК осаждали этанолом для дополнительной очистки плазмидной ДНК, а впоследствии ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды. Впоследствии выполняли анализ последовательностей ДНК для идентификации плазмидных клонов, имеющих требуемое изменение основания, и для подтверждения того, что в кодирующую последовательность TNV148 не были случайно введены другие изменения в основаниях. Один мкл плазмиды подвергали реакции циклического секвенирования, проводимой с

использованием 3 мкл смеси BigDye, 1 мкл прямого праймера pUC19 и 10 мкл стерильной воды, используя те же параметры, что описаны в разделе 4.3.

Конструирование экспрессионных векторов из генов 12B75. Выполняли несколько этапов с рекомбинантной ДНК для получения нового человеческого экспрессионного вектора IgG1 и нового человеческого экспрессионного вектора каппа из ранее клонированных геномных копий генов тяжелой и легкой цепей, кодирующих 12B75 соответственно, которые описаны в заявке на патент США № 60/236,827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной «IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses», опубликованной под номером WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Конечные векторы были разработаны с возможностью простого одноэтапного замещения существующих последовательностей варибельной области на любую соответствующим образом сконструированную ПЦР-амплифицированную варибельную область.

Для модификации гена тяжелой цепи 12B75 в плазмиде p1560 фрагмент BamHI/HindIII размером 6,85 т.п.н., содержащий промотор и варибельную область, переносили из p1560 в pUC19 с получением p1743. Благодаря меньшему размеру этой плазмиды по сравнению с p1560 можно было использовать мутагенез QuikChange™ (с использованием олигонуклеотидов BsiWI-1 и BsiWI-2) для введения уникального сайта клонирования BsiWI непосредственно ближе к 5' концу от сайта инициации трансляции в соответствии с протоколом производителя. Полученная плазида была названа p1747. Для введения сайта BstBI на 3'-конец варибельной области был создан 5'-олигонуклеотидный праймер с сайтами SalI и BstBI. Данный праймер использовали с обратным праймером pUC для амплификации фрагмента 2,75 т. п. н. из p1747. Впоследствии фрагмент обратно клонировали в сайт SalI природного происхождения в варибельной области 12B75 и сайт HindIII, в результате чего был внедрен уникальный сайт BstBI. Полученный промежуточный вектор, обозначенный p1750, может принимать фрагменты варибельной области с концами BsiWI и BstBI. Для получения версии вектора тяжелой цепи, в котором константная область также является производной от гена 12B75, вставку BamHI-HindIII в p1750 переносили в pBR322, чтобы получить сайт EcoRI после сайта HindIII. Впоследствии полученную плазмиду p1768 расщепляли при помощи HindIII и EcoRI и лигировали с фрагментом HindIII-EcoRI размером 5,7 т.п.н. из p1744, получали субклон путем клонирования большого фрагмента BamHI-BamHI из p1560 в pBC. Затем полученную плазмиду (p1784) использовали в качестве вектора для фрагментов кДНК антитела TNV с концами BsiWI и BstBI. Была проведена дополнительная работа по получению экспрессионных векторов p1788 и p1798, которые включают константную область IgG1 из гена 12B75 и отличаются друг от друга тем, насколько большую часть J-C интрона тяжелой цепи 12B75 они содержат.

Для модификации гена легкой цепи 12B75 в плазмиде p1558 фрагмент SalI/AflII размером 5,7 т.п.н., содержащий промотор 12B75 и варибельную область, переносили из p1558 в сайты XhoI/AflII плазмиды L28. Эта новая плазида, p1745, обеспечила матрицу

меньшего размера для стадии мутагенеза. Олигонуклеотиды (C340salI и C340sal2) использовали для введения уникального сайта рестрикции SalI на 5'-конце варибельной области посредством мутагенеза QuikChange™. Полученный промежуточный вектор (p1746) имел уникальные сайты рестрикции SalI и AflII, в которые могут быть клонированы фрагменты варибельного участка. Любой фрагмент варибельной области, клонированный в p1746, предпочтительно соединяется с 3'-половиной гена легкой цепи. Для получения рестрикционного фрагмента из 3'-половины гена легкой цепи 12B75, который можно использовать для этой цели, олигонуклеотиды BAHN-1 и BAHN-2 отжигали друг с другом с образованием двухцепочечного линкера, содержащего сайты рестрикции BsiWI, AflII, HindII и NotI, и имеющие концы, которые можно лигировать в сайты KpnI и SacI. Данный линкер клонировали между сайтами KpnI и SacI в pBC с получением плазмиды p1757. Фрагмент из 7,1 т. п. н., содержащий константную область легкой цепи 12B75, созданный путем расщепления p1558 при помощи AflII, с последующим частичным расщеплением HindIII, клонировали между сайтами AflII и HindII p1757 с получением p1762. Данная новая плазида содержала уникальные сайты для BsiWI и AflII, в которые может быть перенесен фрагмент BsiWI/AflII, содержащий промотор и варибельные участки, с объединением двух половин гена.

Клонирование кДНК и сборка экспрессионных плазмид. Все реакционные смеси для ОТ-ПЦР (см. выше) обрабатывали ферментом Klenow для дополнительного заполнения концов ДНК. ПЦР-фрагменты тяжелой цепи расщепляли рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и впоследствии клонировали между сайтами BsiWI и BstBI плазмиды L28 (L28 использовали, поскольку промежуточный вектор на основе 12B75 p1750 еще не был получен). Анализ ДНК-последовательностей клонированных вставок показал, что полученные конструкторы были правильными и что в ходе ПЦР-амплификации ошибки не были внесены. Назначенные идентификационные номера для данных L28-плазмидных конструкторов (для TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и TNV196) показаны в таблице 3.

Вставки BsiWI/BstBI для тяжелых цепей TNV14, TNV148 и TNV148B переносили из вектора L28 во вновь полученный промежуточный вектор, p1750. Назначенные идентификационные номера данных промежуточных плазмид приведены в таблице 2. Этот этап клонирования и последующие этапы не выполняли для TNV15 и TNV196. Варибельные области впоследствии переносили в два разных человеческих вектора экспрессии IgG1. Для переноса варибельных областей в ранее использованный вектор IgG1, p104, от Centocor использовали рестрикционные ферменты EcoRI и HindIII. Полученные экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа Gm(f+), обозначали p1781 (TNV14), p1782 (TNV148) и p1783 (TNV148B) (см. таблицу 2). Варибельные области также клонировали ближе к 5'-концу от константной области IgG1, полученной из гена 12B75 (GenPharm). Эти экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа G1m(z), также перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Идентификационные номера плазмид для различных плазмид тяжелых

и легких цепей

Вектор L28 или вектор pBC представляют собой клон исходной кДНК антитела. Вставки в данных плазмидах переносили в неполный вектор на основе 12B75 для получения промежуточных плазмид. В результате одной дополнительной стадии переноса получали конечные экспрессионные плазмиды, которые либо внедряли в клетки после линейаризации, либо использовали для очистки вставок генов мАт перед трансфицированием клеток. (ND)=не выполняли

Gm(f+)	G1m(z)			
вектор 128	Промежуточная	Экспрессия	Экспрессия	
мАт	<u>ID плазмиды</u>	<u>ID плазмиды</u>	<u>ID плазмиды</u>	<u>ID плазмиды</u>
Тяжелые цепи				
TNV14	p1751 p1777	p1781	p1786	
TNV15	p1752 (ND)	(ND)	(ND)	
TNV148 p1753	p1778 p1782	p1787		
TNV148B p1760	p1779 p1783	p1788		
TNV196 p1754	(ND)	(ND)	(ND)	
pBC вектор	Промежуточный	Экспрессия		
<u>ID плазмиды</u>	<u>ID плазмиды</u>	<u>ID плазмиды</u>		
Легкие цепи				
TNV14	p1748	p1755	p1775	
TNV15	p1748	p1755	p1775	
TNV148	p1749	p1756	p1776	
TNV196	p1749	p1756	p1776	

Продукты ПЦР легких цепей расщепляли рестрикционными ферментами SalI и SacII и впоследствии клонировали между сайтами SalI и SacII плазмиды pBC. Две различные версии легких цепей, отличающиеся одной аминокислотой, были обозначены p1748 и p1749 (таблица 2). Анализ последовательностей ДНК подтвердил, что данные конструкторы имели правильные последовательности. Впоследствии фрагменты SalI/AflII в p1748 и p1749 клонировали между сайтами SalI и AflII промежуточного вектора p1746 для получения p1755 и p1756 соответственно. Эти 5'-половины генов легкой цепи затем соединяли с 3'-половинами гена путем переноса фрагментов BsiWI/AflII из p1755 и p1756 во вновь полученный конструктор p1762 с получением конечных экспрессионных плазмид

p1775 и p1776 соответственно (таблица 2).

Трансфекции клеток, скрининг и субклонирование. Всего провели 15 трансфекций клеток мышинной миеломы различными плазмидами экспрессии TNV (см. таблицу 3 в разделе «Результаты и обсуждение»). Эти трансфекции различались следующим: (1) были ли клетки-хозяева Sp2/0 или 653; (2) была ли константная область тяжелой цепи кодирована предыдущим вектором IgG1 Centocor или константной областью тяжелой цепи 12B75; (3) являлось ли мАт TNV148B, TNV148, TNV14 или новой комбинацией HC/LC; (4) была ли ДНК линейаризованной плазмидой или очищенной вставкой гена антитела; и (5) наличием или отсутствием полной последовательности интрона J-C в гене тяжелой цепи. Кроме того, повторяли несколько трансфекций, чтобы повысить вероятность скрининга большого числа клонов.

Клетки Sp2/0 и 653 трансфицировали смесью ДНК тяжелой и легкой цепей (по 8-12 μ г каждая) путем электропорации в стандартных условиях, как описано ранее (Knight DM et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:1443-1453). Для трансфекций с номерами 1, 2, 3 и 16 соответствующие экспрессионные плазмиды перед трансфекцией линейаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом. Например, рестрикционные ферменты SalI и NotI использовали для линейаризации TNV148B плазмиды тяжелой цепи p1783 и плазмиды легкой цепи p1776 соответственно. Для остальных трансфекций ДНК-вставки, содержащие только ген мАт, отделяли от плазмидного вектора путем расщепления плазмид тяжелой цепи с помощью BamHI и плазмид легкой цепи с помощью BsiWI и NotI. Впоследствии генные вставки мАт очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и очищающих смол Qiex. Клетки, трансфицированные очищенными вставками генов, одновременно трансфицировали 3-5 μ г линейаризованной плазмиды pSV2gpt (p13) в качестве источника селективного маркера. После электропорации клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты в IMDM, 15% FBS, 2 mM глутамина и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Через двое суток добавляли равный объем IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина, реагент для селекции 2X MHH (1 X MHH=0,5 μ г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 μ г/мл гипоксантина, 50 μ г/мл ксантина), и планшеты инкубировали в течение дополнительных 2-3 недель до образования колоний.

Клеточные супернатанты, собранные из лунок с колониями, анализировали на человеческий IgG методом твердофазного ИФА, согласно описанию. Если коротко, различные разведения супернатантов клеток инкубировали в 96-луночных планшетах для EIA, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc-фрагменту IgG и впоследствии связанный человеческий IgG обнаруживали с использованием конъюгированного с щелочной фосфатазой козьего антитела к человеческому IgG(H+L) и соответствующих цветных субстратов. Стандартные кривые, для которых в качестве стандарта использовали такое же очищенное мАт, что и измеряемое в супернатантах клеток, строили для каждого планшета EIA для проведения количественного анализа человеческого IgG в супернатантах. Клетки колоний, которые, по-видимому, продуцировали в основном человеческие IgG, пересеивали в 24-луночные планшеты для

дополнительного определения продукции в отработанных культурах, а затем идентифицировали наиболее продуктивные родительские клоны.

Родительские клоны с наибольшей продукцией субклонировали для идентификации субклонов с большей продукцией и для получения более гомогенной клеточной линии. 96-луночные планшеты для тканевых культур засевали по одной клетке на лунку или по четыре клетки на лунку в IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина, 1X MNX и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение от 12 до 20 дней до тех пор, пока колонии не становились видимыми. Супернатанты клеток собирали из лунок, содержащих по одной колонии на лунку, и анализировали с помощью твердофазного ИФА, как описано выше. Отобранные колонии пересевали на 24-луночные планшеты и позволяли культурам отработать, после чего идентифицировали наиболее продуктивные субклоны путем количественного определения уровней IgG человека в супернатантах. Этот процесс повторяли после второго цикла субклонирования отобранных субклонов первого цикла. В качестве клеточных линий для разработки отбирали наилучшие субклоны второго цикла.

Определение характеристик клеточных субклонов. Отбирали наилучшие субклоны второго цикла и строили кривые роста для оценки уровней продукции мАт и характеристик роста клеток. Во флаконы T75 засевали по 1×10^5 клеток/мл в 30 мл IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина и 1X MNX (или бессывороточной среды). Отбирали аликвоты по 300 мкл с интервалами 24 ч и определяли плотность живых клеток. Анализы продолжали до тех пор, пока число живых клеток не оказывалось менее 1×10^5 клеток/мл. Собранные аликвоты клеточных супернатантов анализировали на концентрацию присутствующих антител. Анализы методом твердофазного ИФА проводили с использованием в качестве стандартов rTNV148B или rTNV14 JG92399. Образцы инкубировали в течение 1 часа на планшетах для ИФА, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc IgG и связанное мАт, обнаруживали конъюгированным с щелочной фосфатазой козьим антителом к человеческому IgG(H+L), в разведении 1:1000.

Для двух клеточных линий также проводили анализ разных кривых роста для сравнения темпов роста в присутствии различных количеств реагента для селекции MNX. Клеточные линии C466A и C466B размораживали в среде без MNX (IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина) и культивировали в течение двух дополнительных дней. Впоследствии обе клеточные культуры делили на три культуры, которые не содержали MNX, содержали 0,2X MNX или 1X MNX (1X MNX=0,5 μ г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 μ г/мл гипоксантина, 50 μ г/мл ксантина). Через день в свежие флаконы T75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 часа в течение одной недели. Аликвоты для продукции мАт не собирали. Для этих образцов вычисляли время удвоения с использованием формулы, представленной в SOP PD32.025.

Выполняли дополнительные исследования для оценки стабильности продукции мАт с течением времени. Культуры выращивали в 24-луночных планшетах в среде IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина с реагентом для селекции MNX или без него. Культуры

разделяли на свежие культуры каждый раз, когда они становились конфлюэнтными, и старым культурам давали возможность отработать. В это время отбирали аликвоту супернатанта и хранили при 4 °С. Аликвоты отбирали в течение периода 55-78 дней. В конце данного периода супернатанты тестировали на количество присутствующего антитела, антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше.

Результаты и обсуждение.

Ингибирование связывания ФНО с рекомбинантным рецептором

Проводили простой анализ связывания, чтобы определить, способны ли восемь мАт TNV, содержащихся в супернатанте клеток гибридомы, блокировать связывание ФНО α с рецептором. Концентрации мАт TNV в соответствующих супернатантах клеток сначала определяли стандартным анализом методом твердофазного ИФА на человеческий IgG. Впоследствии рекомбинантный гибридный белок рецептор ФНО p55/IgG, p55-sf2, наносили на планшеты для EIA, и давали возможность 125 I-меченому ФНО α связаться с рецептором p55 в присутствии различных количеств мАт TNV. Как показано на Фиг. 1, все, кроме одного (TNV122) из восьми мАт TNV эффективно блокировали связывание ФНО α с рецептором с p55. Фактически, мАт TNV оказались более эффективными с точки зрения ингибирования связывания ФНО α , чем мАт положительного контроля, сА2, которые были добавлены в супернатант гибридомы отрицательного контроля. Эти результаты были интерпретированы как показывающие, что мАт TNV блокируют биологическую активность ФНО α в клеточных анализах и *in vivo*, и, следовательно, были необходимы дополнительные анализы.

Анализ последовательности ДНК

Подтверждение того, что РНК кодируют человеческие мАт

В качестве первой стадии характеристики семи мАт TNV (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV148 и TNV196), которые продемонстрировали активность в плане блокирования ФНО α в анализе связывания с рецептором, из семи гибридных клеточных линий выделяли общую РНК. Впоследствии каждый образец РНК использовали для получения кДНК тяжелой или легкой цепей человеческого антитела, которая включала полную сигнальную последовательность, полную последовательность вариабельной области и часть последовательности константной области каждого мАт. Эти продукты-кДНК впоследствии амплифицировали в ПЦР-реакциях, а ПЦР-амплифицированную ДНК напрямую секвенировали без предварительного клонирования фрагментов. Секвенированная кДНК тяжелой цепи была более чем на 90% идентична одному из пяти человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей, DP-46 (Фиг. 2). Аналогичным образом секвенированные кДНК легкой цепи были на 100 или 98% идентичными одному из человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей (Фиг. 3). Эти результаты подтверждали, что молекулы РНК, транскрибированные в кДНК и секвенированные, кодировали тяжелые цепи человеческого антитела и легкие цепи человеческого антитела. Следует отметить, что, поскольку вариабельные области были ПЦР-амплифицированы с использованием олигонуклеотидов, которые картируются

на 5'-конце последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, первые несколько аминокислот сигнальной последовательности могут не быть фактической последовательностью исходных продуктов трансляции TNV, а представлять собой фактические последовательности рекомбинантных мАт TNV.

Уникальные нейтрализующие мАт

Анализы последовательностей кДНК целых вариабельных областей как тяжелой, так и легкой цепей каждого мАт показали, что TNV32 идентичен TNV15, TNV118 идентичен TNV14 и TNV86 идентичен TNV148. Результаты анализа связывания с рецепторами соответствовали анализам последовательностей ДНК, т. е. и TNV86, и TNV148 были приблизительно в 4 раза более эффективными, чем и TNV118, и TNV14, в плане блокирования связывания ФНО. Следовательно, последующая работа была сфокусирована только на четырех уникальных мАт TNV, TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196.

Родство четырех мАт

Результаты определения последовательности ДНК показали, что гены, кодирующие тяжелые цепи четырех мАт TNV, были высоко гомологичны друг другу, и, по-видимому, каждый из них происходил из одного и того же гена зародышевой линии DP-46 (Фиг. 2). Кроме того, поскольку все последовательности CDR3 тяжелой цепи имеют настолько высокое сходство и одинаковую длину, а также поскольку все они используют экзон J6, очевидно, что они возникают в результате одной перестройки гена VDJ с последующими соматическими изменениями, благодаря которым каждое мАт становится уникальным. Анализ последовательностей ДНК показали, что среди четырех мАт были только два разных гена легких цепей (Фиг. 3). Кодирующие последовательности вариабельной области легкой цепи TNV14 и TNV15 идентичны друг другу и репрезентативной последовательности зародышевой линии из семейства V γ /38K человеческих каппа-цепей. Кодирующие последовательности легкой цепи TNV148 и TNV196 идентичны друг другу, но отличаются от последовательности зародышевой линии в двух нуклеотидных положениях (Фиг. 3).

Определенные аминокислотные последовательности четырех мАт выявили родство этих реальных мАт. Четыре мАт содержат четыре разные тяжелые цепи (Фиг. 4), но только две разные легкие цепи (Фиг. 5). Различия между последовательностями мАт TNV и последовательностями зародышевой линии в основном ограничены доменами CDR, но три тяжелые цепи мАт также отличались от последовательности зародышевой линии каркасных участков (Фиг. 4). В сравнении с каркасными областями антитела, кодируемыми зародышевой линией DP-46, TNV14 было таким же, TNV15 отличалось одной аминокислотой, TNV148 отличалось двумя аминокислотами, а TNV196 отличалось тремя аминокислотами.

Клонирование кДНК, сайт-специфический мутагенез и сборка конечных экспрессионных плазмид. Клонирование кДНК. На основании последовательности ДНК ПЦР-амплифицированных вариабельных областей были заказаны новые олигонуклеотиды

для выполнения еще одного цикла ПЦР-амплификации для адаптации кодирующей последовательности, клонируемой в экспрессионные векторы. В случае тяжелых цепей продукты этого второго цикла ПЦР расщепляли рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и клонировали в плазмидный вектор L28 (идентификационные номера плазмид показаны в таблице 2). В случае легких цепей продукты второго цикла ПЦР расщепляли с помощью SalI и AflII и клонировали в плазмидный вектор pBC. Впоследствии индивидуальные клоны секвенировали для подтверждения того, что их последовательности были идентичны предыдущей последовательности, полученной путем прямого секвенирования продуктов ПЦР, что позволяет выявить наиболее распространенный нуклеотид в каждом положении в потенциально гетерогенной популяции молекул.

Сайт-специфический мутагенез для изменения TNV148. Неизменно наблюдали, что мАт TNV148 и TNV196 были в четыре раза более эффективными, чем следующее по эффективности мАт (TNV14), в плане нейтрализации биологической активности ФНО α . Однако, как описано выше, каркасные последовательности тяжелой цепи TNV148 и TNV196 отличались от каркасных последовательностей зародышевой линии. Сравнение последовательности тяжелой цепи TNV148 с другими человеческими антителами показало, что множество других человеческих мАт содержит остаток Ile в положении 28 в каркасе 1 (учитывается только зрелая последовательность), в то время как в качестве остатка Pro в положении 75 в каркасе 3 использовали необычную аминокислоту в этом положении.

Аналогичное сравнение для тяжелой цепи TNV196 показывает, что три аминокислоты, которыми она отличается от последовательности зародышевой линии каркасной области 3, могут быть редкими в человеческих мАт. Существует возможность того, что из-за этих различий TNV148 и TNV196 могут стать иммуногенными при введении человеку. Поскольку антитело TNV148 имело только один рассматриваемый аминокислотный остаток, и этот остаток, как полагают, является неважным для связывания ФНО α , использовали методику сайт-специфического мутагенеза для изменения одного нуклеотида в кодирующей последовательности тяжелой цепи TNV148 (в плазмиде p1753) так, чтобы кодировать остаток Ser зародышевой линии вместо остатка Pro в положении 75. Полученная плазида названа p1760 (см. таблицу 2). Полученный ген и мАт назвали TNV148B, чтобы отличать его от исходного гена TNV148 (см. Фиг. 5).

Сборка конечных экспрессионных плазмид. Были подготовлены новые экспрессионные векторы антител, основанные на генах тяжелой и легкой цепей 12B75, предварительно клонированных как геномные фрагменты. Хотя были получены различные плазмиды экспрессии TNV (см. таблицу 2), в каждом случае фланкирующие последовательности со стороны 5'-конца, промотор и интронный энхансер получали из соответствующих генов 12B75. В случае плазмид для экспрессии легких цепей из гена легкой цепи 12B75 также получали полный интрон J-C, кодирующую последовательность константной области, и фланкирующую последовательность со стороны 3'-конца. В

случае плазмид для экспрессии тяжелых цепей, позволяющих получать конечные продуктивные клеточные линии (p1781 и p1783, см. ниже), последовательности, кодирующие константную область человеческого IgG1, получали из ранее использованного экспрессионного вектора (p104) Centocor. Важно отметить, что описанные в настоящем документе конечные продуктивные клеточные линии экспрессируют другой аллотип (Gm(f+)) мАт TNV, отличный от аллотипа исходных полученных из гибридомы мАт TNV (G1m(z)). Это связано с тем, что ген 12B75 тяжелой цепи, полученный от мышей GenPharm, кодирует остаток Arg на С-конце домена CH1, тогда как экспрессионный вектор IgG1-Centocor, p104, кодирует остаток Lys в этом положении. Были получены другие плазмиды для экспрессии тяжелых цепей (например, p1786 и p1788), в которых интрон J-C, полная последовательность, кодирующая константный участок, и фланкирующая последовательность со стороны 3'-конца были получены из гена 12B75 тяжелой цепи, но клеточные линии, трансфицированные данными генами, не были отобраны в качестве продукционных клеточных линий. Векторы были тщательно разработаны для обеспечения одноэтапного клонирования будущих ПЦР-амплифицированных V-областей, что позволяет получить конечные экспрессионные плазмиды.

ПЦР-амплифицированную кДНК варибельной области переносили из векторов L28 или pBC в векторы промежуточной стадии на основе 12B75, которые предоставляли промоторную область и часть интрона J-C (идентификационные номера плазмид см. в таблице 2). Рестрикционные фрагменты, содержащие 5'-половину генов антитела, впоследствии переносили из этих векторов промежуточной стадии в конечные экспрессионные векторы, предоставляющие 3'-половину соответствующих генов с образованием конечных экспрессионных плазмид (идентификационные номера плазмид см. в таблице 2).

Трансфекции и субклонирование клеток. Экспрессионные плазмиды либо линейаризовали путем расщепления рестриктазами, либо генные вставки антител в каждой плазмиде очищали от каркасов плазмиды. Клетки мышинной миеломы Sp2/0 и 653 трансфицировали при помощи ДНК тяжелой и легкой цепей путем электропорации. Проводили пятнадцать различных трансфекций, большая часть которых была уникальной по следующим показателям: антитело, конкретные характеристики генов антитела, находились ли гены на линейаризованных цельных плазмидах или очищенных генных вставках и по линии клеток-хозяев (сводные данные в таблице 4). Супернатанты клеток от клонов, устойчивых к микофеноловой кислоте, анализировали методом твердофазного ИФА на присутствие человеческого IgG и количественно оценивали с использованием очищенного rTNV148B для построения эталонной калибровочной кривой.

Клеточные линии с наибольшей продукцией rTNV148B

Десять наиболее эффективно продуцирующих родительских линий 653 после rTNV148B-трансфекции 2 (продуцирующих 5-10 г/мл в отработанных 24-луночных культурах) субклонировали для скрининга на более высокопродуцирующие клеточные

линии и получения более гомогенной популяции клеток. Два субклона родительской линии 2.320, 2.320-17 и 2.320-20 продуцировали приблизительно 50 $\cdot$ г/мл в отработанных 24-луночных культурах, что представляло собой увеличение в 5 раз по сравнению с родительской линией. Второй цикл субклонирования субклонированных линий 2.320-17 и 2.320-20

Показаны идентификационные номера плазмид тяжелой и легкой цепей, которые кодируют каждое мАт. В случае трансфекций, выполненных с использованием очищенных вставок гена мАт, в качестве источника селективного маркера gpt использовали плазмиду p13 (pSV2gpt). Константные области тяжелой цепи кодировали либо тем же экспрессионным вектором человеческого IgG1, который применяли для кодирования антитела Remicade («старый»), либо константными областями, содержащимися в гене тяжелой цепи (GenPharm/Medarex) 12B75 («новый»). H1/L2 означает «новое» мАт, состоящее из тяжелой цепи TNV14 и легкой цепи TNV148. Плазмиды p1783 и p1801 отличаются только тем, насколько большую часть интрона J-C содержат их гены тяжелой цепи. Справа показаны номера трансфекций, которые образуют первое число общих названий клеточных клонов. Описанные здесь линии гTNV148B-продуцирующих клеток C466 (A, B, C, D) и C467A получены из трансфекционных номеров 2 и 1 соответственно. гTNV14-продуцирующая клеточная линия C476A получена из номера 3 трансфекции.

Таблица 4. Сводные данные по трансфекциям клеток

ДНК НС плазмид					
<u>№ трансфекции</u>					
<u>мАт</u>	<u>НС/LC/gpt</u>	<u>вектор</u>	<u>формат</u>	<u>Sp2/0</u>	<u>653</u>
гTNV148B	1783/1776	старый	линейный	1	2
гTNV14	1781/1775	старый	линейный	3	-
гTNV148B	1788/1776/13	новый	вставка	4,6	5,7
гTNV14	1786/1775/13	новый	вставка	8,10	9,11
гTNV148	1787/1776/13	новый	вставка	12	17
гH1/L2	1786/1776/13	новый	вставка	13	14
гTNV148B	1801/1776	старый	линейный	16	

Таблица 4. Сводные данные по трансфекциям клеток

Анализ методом твердофазного ИФА супернатантов отработанных культур в 24-луночных планшетах показали, что все эти субклоны второго цикла производили от 98 до 124 $\cdot$ г/мл, что по меньшей мере в 2 раз превышало субклоны первого цикла. Этим 653

клеточным линиям были присвоены С-кодовые обозначения, показанные в таблице 5.

Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 из rTNV148B трансфекции 1 были субклонированы. Два цикла субклонирования родительской линии 1.73 привели к выявлению клона, продуцирующего 25 μ г/мл в отработанных культурах в 24-луночных культурах. Данная клеточная линия Sp2/0 была обозначена как C467A (таблица 5).

Клеточные линии с наибольшей продукцией rTNV14

Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 после rTNV14-трансфекции 3 были субклонированы один раз. Было обнаружено, что субклон 3.27-1 является наиболее эффективным продуцентом в отработанных 24-луночных культурах с продукцией 19 μ г/мл. Данная клеточная линия была обозначена как C476A (таблица 5).

Таблица 5. Сводные данные по отобранным продуцирующим клеточным линиям и их С-коды

Первая цифра названий исходных клонов указывает на то, на какой клеточной линии проводили трансфекцию. Все описанные в настоящем документе клеточные линии с С-кодами получали путем трансфекции полными плазмидами тяжелой и легкой цепей, линеаризованными рестрикционными ферментами.

Название		Отработанные 24-луночные		
<u>мАт</u>	<u>исходного гена</u>	<u>Код С</u>	<u>Клетка-хозяин</u>	<u>Экспрессия</u>
rTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103:г/мл
	2.320-20-111	C466B	653	102:г/мл
	2.320-17-4	C466C	653	98:г/мл
	2.320-20-99	C466D	653	124:г/мл
	1.73-12-122	C467A	Sp2/0	25:г/мл
rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19:г/мл

Определение характеристик субклонированных клеточных линий

Для более точного определения характеристик роста клеточной линии и определения уровней продукции мАт в более широком масштабе проводили анализ кривых роста с использованием культур во флаконах Т75. Результаты показали, что каждая из четырех клеточных линий C466 достигала пиковой плотности клеток в диапазоне от $1,0 \times 10^6$ до $1,25 \times 10^6$ клеток/мл и максимального уровня накопления мАт в диапазоне от 110 до 140 μ г/мл (Фиг. 7). Напротив, наиболее эффективно продуцирующий субклон Sp2/0, C467A, достигал пиковой плотности клеток $2,0 \times 10^6$ клеток/мл и максимальных уровней накопления мАт 25 μ г/мл (Фиг. 7). Анализ кривой роста не

проводили на rTNV14-продуцирующей клеточной линии C476A.

Был проведен дополнительный анализ кривой роста для сравнения темпов роста при различных концентрациях реагента для селекции МНХ. Это сравнение было сделано по последним наблюдениям, что клетки C466, культивированные в отсутствие МНХ, очевидно, быстрее растут, чем те же клетки, культивированные при нормальном количестве МНХ (1X). Поскольку цитотоксические концентрации соединений, таких как микофеноловая кислота, как правило, измеряют порядками величины, было сочтено, что использование более низкой концентрации МНХ может приводить к значимому сокращению времени удвоения клеток без ущерба для стабильности продукции мАт. Клеточные линии C466A и C466B культивировали в следующих условиях: без МНХ, с 0,2X МНХ или 1X МНХ. Подсчет живых клеток производили с интервалами 24 часа в течение 7 дней. Результаты показали зависимость от концентрации МНХ скорость роста клеток (Фиг. 8). Клеточная линия C466A демонстрировала время удвоения 25,0 часа при 1X МНХ, но всего лишь 20,7 часа без МНХ. Аналогичным образом, для клеточной линии C466B время удвоения составило 32,4 часа при 1X МНХ, но составило всего 22,9 часа без МНХ. Важно отметить, что время удвоения обеих клеточных линий при 0,2X МНХ было более сходным с наблюдаемым при концентрации 1X МНХ (Фиг. 8). Эти данные повышают вероятность того, что увеличения продуктивности клеток в биореакторах, для которых важным параметром является время удвоения, можно достичь при использовании меньшего количества МНХ. Однако, хотя результаты исследования стабильности (см. ниже) свидетельствуют, что клеточная линия C466D способна стабильно продуцировать rTNV148B в течение по меньшей мере 60 дней даже в отсутствие МНХ, исследование стабильности также показало более высокие уровни продукции мАт при культивировании клеток в присутствии МНХ по сравнению с отсутствием МНХ.

Для оценки продукции мАт различными клеточными линиями в течение приблизительно 60 дней проводили исследования стабильности в культурах, которые содержали или не содержали селекционный реагент МНХ. Не все клеточные линии поддерживали высокий уровень продукции мАт. Спустя всего две недели культивирования продукция у клона C466A была приблизительно на 45% меньше, чем в начале исследования. Продукция у клона C466B также существенно падала. Однако клоны C466C и C466D сохраняли довольно стабильную продукцию, где C466D демонстрировал самые высокие абсолютные уровни продукции (Фиг. 9).

Закключение

Из начальной панели из восьми человеческих мАт против человеческого ФНО α было выбрано антитело TNV148B в соответствии с несколькими критериями, которые включали белковую последовательность и эффективность нейтрализации ФНО, а также TNV14. Получали клеточные линии, продуцирующие более 100 μ г/мл rTNV148B и 19 μ г/мл rTNV14.

Пример 5: Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей с использованием однократной болюсной инъекции

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг cA2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым в период 3-7 недель. Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования. (см. Фиг. 10.)

На Фиг. 11А-С представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг cA2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг cA2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг cA2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг cA2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

Пример 6: Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей в качестве многократных болюсных доз

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на основании массы тела и получали внутрибрюшинную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытуемого препарата оценивали в группах 1-6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При анализе массы тела как изменения относительно уровня до введения препарата значимых отличий не было выявлено. Животные, получавшие 10 мг/кг cA2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. (см. Фиг. 12.)

На Фиг. 13А-С представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным

индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные, получавшие 3 мг/кг TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сА2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3-5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сА2.

Пример 7: Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутрибрюшинной болюсной дозы

В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу антитела (сА2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сА2.

При анализе массы тела как изменения относительно уровня перед введением дозы препарата, все виды лечения обеспечили сходный прирост массы. Животные, получавшие либо 3, либо 5 мг/кг TNV148, либо 5 мг/кг сА2, значимо набирали массу тела в начале исследования (на 2 и 3 неделях). Только животные, получавшие TNV148, сохраняли значимый прирост массы в более поздние моменты времени. Животные, получавшие 3, так и 5 мг/кг TNV148, демонстрировали значимый прирост через 7 недель, а у животных, получавших 3 мг/кг TNV148, значимое повышение наблюдалось и через 8 недель после инъекции. (см. Фиг. 14.)

На Фиг. 15 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, где 5 мг/кг сА2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1-3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сА2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сА2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами лечения (за исключением

контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

Пример 8: Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутрибрюшинной болюсной дозы, со сравнением между антителом к ФНО и модифицированным антителом к ФНО

Сравнение эффективности однократного внутрибрюшинного введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг cA2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот набор массы был значимым на неделях 1 и 3-8 неделях. Животные, получавшие 1 мг/кг TNV148, также достигали значимого прироста массы тела на 5, 6 и 8 неделях исследования. (см. Фиг. 16.)

На Фиг. 17 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг cA2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг cA2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутрибрюшинного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг cA2, не давала существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг cA2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в AI между группой, получавшей 1 мг/кг cA2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148B, в любой момент исследования.

Пример 9: Антитело к TNF для лечения или профилактики анкилозирующего спондилита

РЕЗЮМЕ

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование голимумаба, моноклонального антитела к ФНО- α , введенного внутривенно, у субъектов с активным псориатическим артритом.

SIMPONI® (голимумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и изотипом легкой цепи каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (HC), имеющую SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), имеющую SEQ ID NO:37. Молекулярная масса

голимумаба составляет от 149 802 до 151 064 дальтон. Голимумаб связывается с человеческим фактором некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) с высокими аффинностью и специфичностью и нейтрализует биологическую активность ФНО- α .

ЦЕЛИ И ГИПОТЕЗА

Главная цель

Основная цель данного исследования заключается в оценке эффективности в/в введения голимумаба 2 мг/кг субъектам с активным анкилозирующим спондилитом (AS) путем оценки уменьшения признаков и симптомов AS.

Вторичные цели

Вторичной целью является оценка в отношении голимумаба следующего:

- эффективности, связанной с улучшением физической функции, диапазона движений, качества жизни, связанного со здоровьем, и других результатов для здоровья;
- безопасности;
- фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и иммуногенности.

Гипотеза

Для достижения основной цели исследования статистическая гипотеза (альтернативная гипотеза) заключается в том, что голимумаб 2 мг/кг статистически превосходит плацебо в отношении уменьшения признаков и симптомов у субъектов с активным AS на основании основного конечного показателя эффективности.

Основным конечным показателем этого исследования является доля субъектов, достигших 20%-го улучшения относительно исходного уровня по критериям Международной рабочей группы по анкилозирующему спондилиту (ASAS) (ASAS20) на 16 неделе. Этот критерий оценки был выбран, поскольку он хорошо принимается регулирующими органами и клиническим сообществом AS.

ОБЗОР СХЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Это многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 эффективности и безопасности в/в введения голимумаба по сравнению с плацебо у пациентов с активным AS с неадекватной реакцией или непереносимостью НПВС. Приблизительно 200 субъектов будут рандомизированы в приблизительно 40 исследовательских центрах. Все субъекты будут случайным образом назначаться для получения в/в инфузий голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделях 0, 4, и каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого до 52 недели. На неделе 16 все субъекты, получавшие инфузии плацебо, будут переведены в другие группы и начнут получать в/в инфузии голимумаба.

Субъекты из группы в/в введения голимумаба будут продолжать получать в/в инфузии голимумаба. Блокировки базы данных запланированы на неделях 28 и 60. У субъектов будут отслеживать нежелательные явления (НЯ) и серьезные нежелательные явления (СНЯ) по меньшей мере в течение 8 недель после последнего введения исследуемого лечения. Окончание исследования определяют как время совершения последним субъектом посещения на неделе 60.

ПОПУЛЯЦИЯ СУБЪЕКТОВ

Субъектами, пригодными для участия в исследовании, будут мужчины или женщины в возрасте 18 лет или старше с диагнозом AS в течение по меньшей мере 3 месяцев, определяемым как « определенный » по модифицированным критериям Нью-Йорк, и симптомами активного заболевания, о чем свидетельствует индекс активности пахучего анкилозирующего спондилита (BASDAI) ≥ 4 и визуальная шкала Алога (VAS) для общей боли в спине ≥ 4 , каждая по шкале от 0 до 10 см. Субъекты должны иметь уровень С-реактивного белка (CRP) $\geq 0,3$ мг/дл.

Другими основными признаками исследуемой популяции являются следующие:

- Допускаются существующие пользователи метотрексата (MTX), сульфасалазина (SSZ), гидроксихлорохина (HCTQ) и низких доз пероральных кортикостероидов, и они должны входить в исследование в стабильных дозах этих лекарственных средств.
- Пациенты с предварительным воздействием не более чем одного биологического агента анти-ФНО- α (кроме голимумаба) могут быть включены в исследование, но будут ограничены не более чем 20% исследуемой популяции.
- Субъекты с полным анкилозом позвоночника, определяемые как мостиковые синдесмофиты, присутствующие на всех межпозвоночных уровнях шейного и поясничного отдела позвоночного отдела, визуализированного на снимках позвоночного отдела, можно включить в исследование, но они будут ограничены не более 10% исследуемой популяции.

Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будет проводиться в течение 6 недель до введения исследуемого агента.

Субъекты также должны удовлетворять критериям включения и исключения.

ДОЗА И СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ

При начальном скрининговом посещении будет получено информированное согласие у всех субъектов, которые окажутся потенциально пригодными в соответствии с установленными протоколом критериями включения и исключения для регистрации в исследовании. При посещении для рандомизации будут выполнять повторную оценку субъектов, и при соблюдении всех установленных критериев включения и исключения субъекты будут рандомизированы для получения либо в/в инфузий голимумаба, либо в/в инфузий плацебо. Рандомизация будет стратифицирована географическим регионом и предшествующим применением терапии антител к ФНО- α .

Перед первой инфузией субъекты будут случайным образом распределены в соотношении 1 : 1 в одну из следующих двух групп лечения:

Группа 1 (n=100): Субъекты будут получать в/в инфузии плацебо на неделях 0, 4 и 12. Субъекты перейдут на в/в введение голимумаба в дозе 2 мг/кг на неделе 16, а затем получают препарат на неделях 16, 20, а затем каждые 8 недель.

Группа 2 (n=100): Субъекты получают голимумаб в/в 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель. Субъекты получают в/в инфузию плацебо на неделе 16 для поддержания слепого режима.

Все инфузии будут выполнены в течение 30 ± 10 минут.

ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ/КОНЕЧНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Оценки эффективности, выбранные для данного исследования, были установлены в предыдущих исследованиях биологических терапевтических агентов для лечения AS. Сообщаемые пациентом результаты (PRO), выбранные для данного исследования, согласуются с клинически значимыми измерениями, приведенными в медицинской литературе для других исследований AS и применимых нормативных документах США/ЕС.

Оценка реакции на анкилозирующий спондилит включает в себя:

- Батский функционализированный индекс анкилозирующего спондилита (BASDAI);

- Общая оценка пациента
- Общее количество боли в спине
- Батский показатель активности анкилозирующего спондилита (BASDAI);
- краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36);
- Батский метрولوجический индекс анкилозирующего спондилита (BASDAI);
- Анкилозирующий вопросы по качеству спондилита (ASQoL)
- Расширение грудной клетки
- Ночная боль в спине
- Индекс энтезита
- Шкала клинического исследования результатов
- опросник для оценки ограничения работоспособности (WLQ);
- визуальная аналоговая шкала эффективности
- опросник EuroQol-5D (EQ-5D)

Основной конечный показатель

Основным конечным показателем данного исследования является доля субъектов ASAS 20 на неделе 16. Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ASAS 20 на неделе 16 будет статистически значимо выше в группе голиумаба по сравнению с группой плацебо.

Главные вторичные конечные показатели

Будут выполнены следующие основные вторичные анализы. Следующие конечные показатели перечислены в порядке их значимости, как указано ниже:

1. Доля субъектов, которые достигли ASAS 40 на неделе 16.
2. Доля субъектов, которые достигли по меньшей мере 50% улучшения относительно исходного уровня BASDAI на неделе 16.
3. Изменение относительно исходного уровня BASFI на неделе 16.

ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Пробы крови будут собирать при определенных посещениях для оценки ФК голиумаба после в/в введения у взрослых субъектов с AS. Если во время этого посещения вводят исследуемый агент, пробы для оценки фармакокинетики будут брать из

другой руки, не той, в которой установлена инфузионная система. Во время посещений на неделях 0, 4, 12, 20, 36 и 52 будут брать 2 пробы для оценки сывороточных концентраций голимумаба: пробу 1 - непосредственно перед инфузией, а другую - через один час после завершения инфузии. Для каждого из оставшихся посещений будет собран только 1 образец для сывороточных концентраций голимумаба. Этот образец следует собирать перед инфузией, если при этом посещении вводят инфузию исследуемого агента. Кроме того, будут брать случайную пробу для оценки ФК для популяционного анализа ФК между визитами на 12-й и 20-й неделях, за исключением посещений на 12-й, 16-й или 20-й неделе; эту пробу необходимо брать по меньшей мере за 24 часа перед или после инфузии исследуемого агента. В применимые моменты времени сыворотки для измерения как концентрации голимумаба, так и антител к голимумабу будут получены из крови, взятой во время одного и того же забора.

ОЦЕНИВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ

Для оценки иммуногенности голимумаба у взрослых субъектов с AS будут брать пробы сыворотки для обнаружения антител к голимумабу в соответствии с графиком проведения мероприятий.

ОЦЕНКА БИОМАРКЕРОВ

Будут брать пробы для оценки биомаркеров с получением молекулярного понимания межсубъектной вариабельности клинических результатов, чтобы выявить подгруппы населения, по-разному отвечающие на лекарственное средство. Пробы для оценки биомаркеров также можно использовать для того, чтобы решить возникающие проблемы и обеспечить более безопасное, более эффективное и, в конечном счете, индивидуализированное лечение в будущем.

ОЦЕНКА ФАРМАКОГЕНОМИКИ (ДНК)

Будет проведено исследование генома для поиска связей конкретных генов с заболеванием или ответом на лекарственное средство. Будет проведено только исследование ДНК, относящееся к голимумабу или заболеваниям, для лечения которых разработано данное лекарственное средство. В данном исследовании у предоставивших согласие субъектов будет проведен обширный фармакогеномический и/или эпигенетический анализ. Субъекты, участвующие в этой части исследования, должны подписать отдельное информированное согласие. Кроме того, субъект может отозвать такое согласие в любое время, и это не повлияет на участие в других аспектах настоящего исследования или на участие в исследовании в будущем.

При необходимости пробы крови для фармакогеномического анализа будут собраны для проведения исследований в области фармакогеномики (если это позволяют местные правила). Участие субъектов в фармакогеномическом исследовании является необязательным.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

На основании профиля безопасности других средств против ФНО- α , а также данных о безопасности голимумаба на сегодняшний день было выявлено несколько

интересующих НЯ, которые будут отслеживаться и оцениваться в данном исследовании. Они включают реакции на инфузии, патологические изменения лабораторных показателей, предназначенных для оценки гепатобилиарной системы, инфекции, включая ТБ, и злокачественные новообразования.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Для суммирования большинства данных будут использовать простую описательную сводную статистику, такую как n , среднее, СО, медианное значение, межквартильный размах, минимум и максимум для непрерывных переменных, а также абсолютные значения и процентные доли для дискретных переменных.

Если не указано иное, для сравнения таких категориальных переменных, как доля субъектов, отвечающих на лечение, будет использоваться критерий Кохрана-Мантеля-Гензеля (СМН), стратифицированный по предшествующему использованию терапии против ФНО α . В целом, если не указано иное, для анализа непрерывных переменных будет использоваться ANOVA с использованием терапии против ФНО α на исходном уровне в качестве фактора. Все статистические исследования будут выполнены при $\alpha=0,05$ (2-сторонний). Кроме статических анализов, графическое отображение данных (например, линейные графики) и списки субъектов также можно использовать для обобщения/представления данных.

Группа пациентов

Набор популяций будет представлять собой популяцию для лечения (т. е. всех рандомизированных субъектов). Данные по субъектам, включенным в анализы эффективности, будут обобщенно представлены согласно группам с распределенным лечением, вне зависимости от того, получали ли они назначенное лечение.

Анализ безопасности и ФК будут включать всех субъектов, которым по меньшей мере один раз ввели исследуемое лечение.

Анализ конечных показателей

Анализ Основных Конечных Показателей

Для решения первичной цели долю субъектов с ответом ASA 20 на неделе 16 (первичная конечная точка) сравнивают между группами плацебо и голиумаба с использованием теста СМН, стратифицированного по предыдущему применению терапии антитело к ФНО- α (Yes/No) при уровне значимости 0,05 (2-сторонний). В этом основном анализе эффективности данные всех рандомизированных субъектов будут проанализированы в соответствии с группой лечения, в которую они распределены, независимо от фактического полученного лечения. Процедуру переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) будут использовать для ввода пропущенных компонентов ASAS при наличии у субъектов данных по меньшей мере для 1 компонента ASAS на неделе 16. Если у субъектов на неделе 16 нет данных для всех компонентов ASAS, они будут считаться не ответившими на лечение пациентами.

Анализ главных вторичных конечных показателей

Следующие анализы главных вторичных конечных показателей будут выполнены в

порядке важности, описанном ниже.

1. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов, которые достигли ASAS 40 на неделе 16, между группами лечения.

2. Долю субъектов, которые достигли по меньшей мере 50% улучшения относительно исходного уровня В BASDAI на неделе 16, будут сравнивать между группами лечения.

3. Сравнение данных об изменении относительно исходного уровня BASFI на неделе 16 между группами лечения.

Для контроля частоты ошибок I рода на множественность первый главный вторичный конечный показатель будет проверен только в том случае, если основной конечный показатель достигнет статистической значимости на уровне значимости 0,05 (2-сторонний). Последующие главные вторичные конечные показатели будут проанализированы только в том случае, если различия в основном конечном показателе и предыдущем (-их) главном (-ых) вторичном (-ых) конечном (-ых) показателе (-ях) будут статистически значимыми при уровне значимости 0,05 (2-сторонние).

Обзор анализа безопасности

Будут выполнены регулярные оценки безопасности. Данные о частотах возникновения и типах НЯ, СНЯ и имеющих обоснованную связь с лечением НЯ, включая реакции на инфузии и инфекции, включая туберкулез, будут обобщены по группам лечения. Будут обобщены данные о числе субъектов с патологическим изменением лабораторных параметров (гематологических и биохимических) на основании оценки токсичности NCI CTCAE. Кроме того, будут обобщены данные о числе субъектов с ANA и антителами к дцДНК и о взаимосвязи реакций на инфузии и с антителами к голиумабу.

Все анализы безопасности будут выполнены с использованием популяции всех субъектов, получавших по меньшей мере 1 дозу исследуемого агента. Анализы будут выполнены с учетом лечения, которое субъекты получали фактически.

Кроме того, графическое отображение данных (например, линейные графики) и списки субъектов также можно использовать для обобщения/представления данных.

СОКРАЩЕНИЯ

НЯ нежелательное явление

AS анкилозирующий спондилит

ASAS 20 Оценка при анкилозирующем спондилите 20

ASQoL Качество жизни анкилозирующего спондилита

ASSERT Исследование на основе анкилозирующего спондилита для оценки рекомбинантной терапии инфликсимабом

BASDAI Батский показатель активности анкилозирующего спондилита

BASFI Индекс функции анкилозирующего спондилита

BASMI Индекс анкилозирующего спондилита

БЦЖ Бацилла Кальмета-Герена

ЗСН застойная сердечная недостаточность

CMH Кошран-Мантел-Гензель
 СРБ С-реактивный белок
 DAS индекс активности заболевания
 DBL Блокировка базы данных
 DMARD модифицирующие течение заболевания противоревматические препараты
 DMC Комитет по мониторингу данных
 ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
 ЭКГ электрокардиограмма
 eCRF электронная индивидуальная регистрационная карта
 EDC электронная система регистрации данных
 EQ-5D EuroQol-5D
 EQ-VAS визуальная аналоговая шкала EQ
 ЕС Европейский союз
 GCP надлежащая клиническая практика
 ВГВ вирус гепатита В
 НСQ гидроксихлорохин
 ВГС вирус гепатита С
 ВИЧ вирус иммунодефицита человека
 HRQoL связанное со здоровьем качество жизни;
 IB Брошюра исследователя
 ICF форма информированного согласия
 ICH Международная конференция по гармонизации
 IEC Независимый комитет по этике
 IgG 1 иммуноглобулин G 1
 IMA независимый специалист по оценке опорно-двигательного аппарата
 IRB Экспертный совет учреждения
 в/в внутривенный
 IWRS интерактивная система веб-ответа
 MCS общий показатель психического компонента
 MOS-SS Шкала сна для исследования медицинских результатов
 MMP-1 матриксная металлопротеиназа-1
 MMP-3 матриксная металлопротеиназа-3
 MTX Метотрексат
 НПВС нестероидное противовоспалительное лекарственное средство
 PCS общий показатель физического компонента
 ФД фармакодинамика
 ФК фармакокинетика
 PQS претензия к качеству препарата
 PRO сообщаемый пациентом результат

PsA псориатический артрит

q8w один раз в 8 недель

RA ревматоидный артрит

RBC эритроцит

СНЯ серьезное нежелательное явление

SAP План статистического анализа

п/к подкожное введение

SF-36 краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов

SSZ сульфасалазин

ТБ туберкулез

ФНО α фактор некроза опухоли альфа;

TST туберкулиновая кожная проба

США Соединенные Штаты Америки

VAS визуальная аналоговая шкала.

WBC лейкоцит

WLQ Опросник для оценки ограничения работоспособности

Введение

Голимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и изотипом легкой цепи каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (HC), имеющую SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), имеющую SEQ ID NO:37. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149 802 до 151 064 дальтон. Голимумаб представляет собой моноклональное антитело человека, которое образует высокоаффинные стабильные комплексы как с растворимой, так и с трансмембранной биоактивной формой фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) человека, что предотвращает связывание ФНО- α с его рецепторами. Связывания с другими лигандами суперсемейства ФНО α не наблюдали; в частности, голимумаб не связывает или не нейтрализует человеческий лимфотоксин. ФНО- α синтезируется главным образом активированными моноцитами, макрофагами и Т-клетками в виде трансмембранного белка, который самоассоциируется с образованием биоактивного гомотримера и быстро высвобождается с поверхности клетки путем протеолиза. Связывание ФНО- α с рецепторами ФНО p55 или p75 приводит к кластеризации цитоплазматических доменов рецептора и инициирует сигнализацию. Фактор некроза опухоли α был идентифицирован как ключевой сигнальный цитокин, который продуцируется в ответ на различные стимулы и вследствие этого стимулирует воспалительный ответ посредством активации пути каспаза-зависимого апоптоза и ядерного фактора транскрипции (NF)- κ B и активирующего белка-1 (AP-1). Фактор некроза опухоли α также модулирует иммунный ответ за счет его роли в организации иммунных клеток внутри зародышевых центров. Повышенная экспрессия ФНО- α была связана с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит (РА), а также с спондилоартропатиями, такими как псориатический артрит (ПА) и

анкилозирующий спондилит (АС), и является важным медиатором воспаления и структурного повреждения суставов, характерного для этих заболеваний.

Анкилозирующий спондилит

Анкилозирующий спондилит (АС) представляет собой хроническое воспалительное заболевание неизвестной этиологии, которое включает в себя сахароподвздошные суставы и часто осевой скелет, энтезы и периферические суставы. АС влияет на мужчин чаще, чем женщин, и его распространенность в США составляет 0,2-0,5% населения. Хроническое воспаление придатков приводит к формированию новой кости, синдесмофитам и анкилолозу суставов, главным образом, в осевом скелете. Именно этот осевой анкилоз может привести к резкой потере диапазона движений и к невозможности. Заболевание также может иметь внеклеточные проявления, включая увеит, кардит, легочный фиброз, воспаление кишечника и нарушения сердечной проводимости. Анкилозирующий спондилит, который считается подгруппой спондилоартропатий, сильно связан с присутствием антигена лейкоцитов человека-B27 (HLA-B27).

Хотя пациенты могут испытывать различные мышечно-скелетные симптомы (проксимальные артралгии, боли в грудной клетке и сухость вокруг периферических суставов от энтезита), наиболее распространенным симптомом, представляющим собой хроническую боль в пояснице. Боль в пояснице обычно начинается до возраста 40 лет, является инвалидизивной в начале, ассоциированной с утренней жесткостью и, в конечном счете, является симметричной. Эти мышечно-скелетные симптомы могут быть связаны с конститутивными симптомами, такими как усталость, лихорадка и потеря веса. До утверждения ингибиторов ФНО- α лечение АС имело ограниченную эффективность и состояло главным образом из физической нагрузки и НПВС, играя роль в пероральном сульфасалазине (SSZ) в подгруппе пациентов с периферическим артритом. В рандомизированных контролируемых исследованиях было показано, что биологические ингибиторы ФНО- α значительно улучшают признаки и симптомы, подвижность и физическую функцию у пациентов с АС.

Роль ФНО- α в анкилозирующем спондилите

Профиль эффективности и безопасности терапии антител к ФНО- α по различным показаниям, в том числе ПО АС, хорошо охарактеризован. Фактор некроза опухоли α считается ключевым воспалительным медиатором, который проявляет широкий спектр функциональных активностей. Аномально высокие уровни TNF α были задействованы в патофизиологии нескольких иммуноопосредованных заболеваниях, включая RA, AS и AS. Связывание ФНО- α антителом антител к ФНО- α предотвращает связывание мишени с рецепторами ФНО- α на клеточной поверхности и, следовательно, предотвращает последующие сигнальные каскады и вредные эффекты неправильной или избыточной экспрессии ФНО- α . Повышенные уровни TNF α наблюдались как в синовиальной ткани периферической крови, так и в синовиальной ткани пациентов с активным АС. Было высказано предположение, что ФНО- α , вероятно, играет определенную роль в сахарите

AS как в случае синовита RA. В исследовании, проведенном у 5 пациентов с активным AS, которые оценивали с помощью рассчитанных биопсий, направленных на томографию сахароподвздошных суставов, иммуногистологический анализ выявил клеточные инфильтраты, состоящие в основном из Т-клеток и макрофагов, а исследования гибридизации *in situ* образцов биопсии 3 субъектов выявили наличие TNF α .

Ряд открытых и двойных слепых плацебо-контролируемых исследований показал существенную эффективность инфликсимаба, рекомбинантного человеческого химерного моноклонального антитела к ФНО- α IgG1-к, в отношении уменьшения признаков и симптомов AS. Инфликсимаб был первым агентом антител к ФНО- α , исследованным в качестве лечения AS, и схема индукции инфузий инфликсимаба в дозе 5 мг/кг через 0, 2 и 6 недель у субъектов с AS или у субъектов с диагностированной спондилоартропатией, в том числе ПРИВОДИЛА к быстрому улучшению показателей активности заболевания.

Два рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследования инфликсимаба у пациентов с AS одолетней спондилоартропатией, включая AS, показали, что терапия инфликсимабом привела к быстрому и значительному улучшению клинических показателей исхода. В исследовании ASSERT (большое многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое исследование инфликсимаба с участием 279 субъектов с AS) оценка частоты ответа на анкилозирующий спондилит 20 (ASA 20) через 24 недель составила 60% у субъектов, получавших лечение инфликсимабом, а у группы, получавшей плацебо, - 18%. Также наблюдалось существенное улучшение показателей физической функции, диапазона качества движения жизни и оценки активности заболевания на MPT. Терапия инфликсимабом у пациентов с AS, как правило, хорошо переносилась.

Ингибирование α фактора некроза опухоли при использовании подкожных (SC) лекарственных средств, включая этанерцепт, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб, также было показано эффективным в рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях. Хотя точная роль ФНО α в патофизиологии PsA до сих пор неясна, уже существует множество весомых доказательств того, что ингибирование ФНО α имеет большое терапевтическое преимущество при этом заболевании.

Общее обоснование исследования

Хотя терапия ингибиторами ФНО- α успешно применялась при лечении воспалительных артритов, ингибиторы ФНО- α имели ограничения, связанные с безопасностью, режимом дозирования, стоимостью и/или иммуногенностью. Для устранения некоторых из этих ограничений полностью человеческое mAb антитело к ФНО- α , обозначенное голимумабом (также известное как CNTO 148 и rTNV148B). Голимумаб, являющийся полностью человеческим mAb антитело к ФНО- α , связывается с высокой аффинностью с ФНО- α человека и ингибирует биоактивность ФНО- α . Кроме того, голимумаб ингибирует TNF α -опосредованную цитотоксичность клеток и TNF α -опосредованную активацию эндотелиальных клеток. Голимумаб также индуцирует

активацию опосредованного комплементом клеточного лизиса и уменьшает развитие артрита у мышей со сверхэкспрессией ФНО α человека.

Было показано, что лечение агентами антител к ФНО- α , включая П/К голимумаб, значительно улучшает признаки и симптомы, физическую функцию и качество жизни, связанное с состоянием здоровья (HRQOL), у субъектов, которым страдает AS. Глобальное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 проводили для подкожного введения голимумаба у субъектов с AS (исследование C0524T09) для оценки долгосрочной безопасности и эффективности П/К голимумаба в течение 5 лет последующего наблюдения. Показано, что подкожный голимумаб эффективен в улучшении признаков и симптомов AS. Анализ безопасности показал, что голимумаб п/к в целом хорошо переносился и продемонстрировал профиль безопасности, аналогичный профилю безопасности, наблюдаемому при применении других ингибиторов ФНО- α .

Учитывая известную безопасность и эффективность голимумаба при п/к введении предположили, что голимумаб при в/в введении также будет иметь приемлемый профиль безопасности, соответствующий другим ингибиторам ФНО- α , применяющимся при ревматических заболеваниях, таких как РА, ПА и АС. Голимумаб для внутривенного введения окончательно изучали в исследовании фазы 3 (CNTO148ART3001), результаты которого легли в основу одобрения препарата для лечения РА. Исследование CNTO148ART3001 представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое 2-стороннее исследование эффективности и безопасности в/в применения голимумаба в дозе 2 мг/кг в виде инфузий, вводимых в течение 30 ± 10 минут в недели 0, 4 и после этого каждые 8 недель (один раз в 8 недель), у субъектов с активным РА, несмотря на сопутствующую терапию метотрексатом (МТ). Субъектов с активным РА, несмотря на МТ, рандомизировали для получения либо инфузий плацебо, либо голимумаба внутривенно, вводимого в дозе 2 мг/кг в недели 0, 4 и каждые 8 недель до недели 24. Начиная с недели 24, всем субъектам вводили в/в голимумаб до недели 100. Продemonстрировано, что голимумаб при в/в введении обеспечивал значительные преимущества в улучшении признаков и симптомов РА, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья, а также замедление прогрессирования структурного повреждения.

Голимумаб, вводимый внутривенно при лечении РА (CNTO148ART3001), показал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности при низкой частоте реакций на инфузии. Данное предложенное исследование фазы 3 предназначено для демонстрации эффективности и безопасности голимумаба при в/в введении для лечения субъектов с активным AS. Проводят оценку в/в способа введения у субъектов с PsA, поскольку доступные настоящее время ингибиторы ФНО- α для в/в введения имеют ограничения, связанные с иммуногенностью и реакциями на инфузии и для них требуется более длительное время инфузии (от 60 до 120 минут) по сравнению с предложенной длительностью инфузий голимумаба для в/в введения, составляющей 30 ± 10 минут.

Пациенты также могут предпочитать поддерживающую схему в/в введения q8w голимумаба, чем более частые п/к введения по препаратам. Таким образом, в/в введение голимумаба может быть важным дополнением к доступным в настоящее время способам лечения.

Режим дозирования для этого исследования составляет 2 мг/кг голимумаба, вводимого посредством в/в инфузии в течение 30 минут на неделях 0 и 4, а затем один раз в 8 недель.

ДИЗАЙН И ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обзор схемы исследования

Это многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 эффективности и безопасности в/в введения голимумаба по сравнению с плацебо у пациентов с активным AS с неадекватной реакцией или непереносимостью НПВС. Приблизительно 200 субъектов будут рандомизированы в приблизительно 70 исследовательских центрах. Субъекты будут случайным образом назначаться для получения в/в инфузий голимумаба 2 мг/кг или плацебо на неделях 0, 4, 12 и 12. На неделе 16 все субъекты, получавшие инфузии плацебо, будут переведены в другие группы и начнут получать в/в инфузии голимумаба на неделях 16, 20 и затем каждые 8 недель до недели 52. Субъекты из группы в/в введения голимумаба будут получать инфузию плацебо на неделе 16 для поддержания слепого режима и продолжать получать в/в инфузии голимумаба на неделях 20 и 1 раз в 8 недель после этого до недели 52. Блокировки базы данных (DBL) запланированы на неделях 28 и 60.

У субъектов будут отслеживать нежелательные явления (НЯ) и серьезные нежелательные явления (СНЯ) по меньшей мере в течение 8 недель после последнего введения исследуемого лечения. Окончание исследования определяют как время совершения последним субъектом посещения на неделе 60.

Схема исследования представлена на Фиг. 18.

Обоснование дизайна исследования

Исследуемая популяция

Целевой исследуемой популяцией являются субъекты с активным веществом AS, как определено в соответствии с модифицированными критериями Нью-Йорка, в течение по меньшей мере 3 месяцев до первого введения исследуемого агента.

Группы лечения, доза и интервал между введениями дозы

Субъекты будут рандомизированы на неделе 0-1 в 2 группы лечения следующим образом:

- Группа 1 (n=100): в/в инфузия плацебо;
- группа 2 (n=100): В/в инфузия голимумаба в дозе 2 мг/кг.

Субъекты, случайным образом назначенные голимумабу, будут получать в/в инфузии в дозе 2 мг/кг на 0, 4 и q8w неделях после этого до недели 52. На неделе 16 субъекты, рандомизированные для голимумаба, будут получать инфузию плацебо для поддержания слепого состояния. Все субъекты, случайным образом назначенные для

получения в/в инфузий плацебо на 0, 4 и 12 неделях, будут пересекаться с активным лечением на неделе 16 и получать в/в инфузии голимумаба 2 мг/кг на неделях 16, 20 и q8w после этого до недели 52. Субъекты из группы в/в введения голимумаба будут продолжать получать в/в инфузии голимумаба.

Фазы исследования и продолжительность лечения

В данном исследовании будет 4 фазы: скрининг, двойное слепое плацебо-контролируемое активное лечение и последующее наблюдение для оценки безопасности. Фаза скрининга продолжительностью до 6 недель обеспечит достаточно времени для проведения скрининговых оценок и определения пригодности для участия в исследовании. Вторая фаза исследования будет представлять собой двойную слепую плацебо-контролируемую фазу с недели 0 до недели 16. Третья фаза исследования будет представлять собой фазу активного лечения с недели 16 до недели 52. Четвертая стадия исследования будет представлять собой фазу последующего наблюдения для оценки безопасности и будет длиться 8 недель после последнего введения исследуемого агента. Последующее наблюдение для оценки безопасности позволяет осуществлять мониторинг субъекта в течение периода, эквивалентного приблизительно 5-кратному периоду полужизни голимумаба. Информация о первоначально назначенном каждому субъекту лечению не доступна ни исследовательским центрам, ни субъектам в течение 60 недель исследования. Эта продолжительность обеспечит достаточное количество времени для демонстрации эффективности и безопасности в/в введения голимумаба в качестве поддерживающей терапии при AS.

Исследование завершится после последнего запланированного посещения последнего субъекта (посещение на неделе 60).

Контроль исследования, рандомизация и маскировка

Рандомизацию будут применять для того, чтобы свести к минимуму ошибки при отнесении субъектов к группам лечения, повысить вероятность того, что известные и неизвестные свойства субъекта (например, демографические и исходные характеристики) будут равномерно распределены по группам лечения, и чтобы повысить надежность статистических сравнений между группами лечения. Кроме того, рандомизация будет стратифицирована на основании географического региона и до применения терапии антитело к ФНО- α (да или нет).

Отдельные субъекты и исследователи будут сохранять маскировку на протяжении всего исследования. Лечение в слепом режиме будет применяться для уменьшения потенциальной погрешности во время сбора данных и оценки клинических конечных показателей. В настоящем исследовании планируют две DBL на неделях 28 и 60. Первая DBL будет происходить после посещения всех субъектов на неделе 28 или прерывании участия в исследовании. Вторая DBL будет происходить либо после посещения всех субъектов на неделе 60, либо после прерывания участия в исследовании. На неделе 28 база данных будет заблокирована, и данные об уровне суммирования будут неидентифицированы на основании данных об уровне субъекта в DBL для анализов

данных и анализа данных для выбранных субъектов. Никому из сотрудников исследовательского центра и субъектов не будет известно о назначенном лечении, за исключением фармацевта, до DBL на неделе 60.

Оценка эффективности

Оценки эффективности, выбранные для данного исследования, были установлены в предыдущих исследованиях биологических терапевтических агентов для лечения AS. Сообщаемые пациентом результаты (PRO), выбранные для данного исследования, также согласуются с клинически значимыми измерениями, приведенными в медицинской литературе для других исследований AS и применимых нормативных документах США/ЕС.

Оценка реакции на анкилозирующий спондилит включает в себя:

- Батский функционализированный индекс анкилозирующего спондилита (BASDAI);

- Общая оценка пациента
- Общее количество боли в спине
- Батский показатель активности анкилозирующего спондилита (BASDAI);
- краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36);
- Батский метрولوجический индекс анкилозирующего спондилита (BASDAI);
- Анкилозирующий вопросы по качеству спондилита (ASQoL)
- Расширение грудной клетки
- Ночная боль в спине
- Индекс энтезита
- Шкала клинического исследования результатов
- опросник для оценки ограничения работоспособности (WLQ);
- визуальная аналоговая шкала эффективности
- опросник EuroQol-5D (EQ-5D)

ПОПУЛЯЦИЯ СУБЪЕКТОВ

Субъектами, пригодными для участия в исследовании, будут мужчины или женщины в возрасте 18 лет или старше с диагнозом AS в течение по меньшей мере 3 месяцев, определенным как « определенный » по модифицированным критериям Нью-Йорк, и симптомами активного заболевания, о чем свидетельствует BASDAI ≥ 4 , а также визуальная аналоговая шкала (VAS) для общей боли в спине ≥ 4 , каждая по шкале от 0 до 10 см. Субъекты должны иметь уровень С-реактивного белка (CRP) $\geq 0,3$ мг/дл.

Другими основными признаками исследуемой популяции являются следующие:

- Допускаются существующие пользователи, содержащие MTX, SSZ и гидроксихлорохин (HCQ) и пероральные кортикостероиды с низкой дозой, и они должны входить в исследование в виде стабильных доз этих лекарственных средств.

- Пациенты с предварительным воздействием не более чем одного биологического агента анти-ФНО- α (кроме голимумаба) могут быть включены в исследование, но будут ограничены не более чем 20% исследуемой популяции.

- Субъекты с полным анкилозом позвоночника, определяемые как мостиковые синдесмофиты, присутствующие на всех межпозвоночных уровнях шейного и поясничного отдела позвоночного отдела, визуализированного на снимках позвоночного отдела, можно включить в исследование, но они будут ограничены не более 10% исследуемой популяции.

Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будет проводиться в течение 6 недель до введения исследуемого агента.

Критерии включения и исключения для регистрации в исследовании субъектов описаны в следующих 2 подразделах. При наличии вопроса о приведенных ниже критериях включения или исключения исследователю следует обращаться к соответствующему представителю спонсора до регистрации субъекта в исследовании.

Критерии включения

Каждый потенциальный субъект должен удовлетворять всем приведенным ниже критериям для включения в исследование.

1. Субъект должен быть мужчиной или женщиной в возрасте 18 лет или старше.
2. Субъект должен быть стабильным с медицинской точки зрения на основании физического осмотра, анамнеза, основных показателей жизнедеятельности и электрокардиограммы в 12 отведениях (ЭКГ), проведенных при скрининге. Это определение должно быть зафиксировано в первичных документах субъекта и заверяется исследователем.

3. Субъект должен быть стабильным с медицинской точки зрения на основании клинических лабораторных анализов, проведенных при скрининге. Если результаты биохимических анализов сыворотки, включая ферменты печени или гематологию, находятся за пределами нормальных референсных диапазонов, субъекта включают только в том случае, если исследователь оценит патологические изменения или отклонения от нормы как не имеющие клинической значимости или соответствующие и обоснованные для исследуемой популяции. Это определение должно быть зафиксировано в первичных документах субъекта и заверяется исследователем. В отношении анализов, описанных в критериях включения № 6 и № 16, результаты ДОЛЖНЫ находиться в пределах разрешенных диапазонов, установленных в критериях включения № 6 и № 16.

4. Имеют диагноз определенного состояния AS, как определено в соответствии с модифицированными критериями Нью-Йорк, по меньшей мере в течение 3 месяцев до первого введения исследуемого агента.

Должен быть выполнен как рентгенографический критерий, так и, по меньшей мере, один клинический критерий:

- a. Рентгенографический критерий: Сахароанилит класса ≥ 2 двухсторонний или сахаролитит класса 3-4 односторонне.

- b. Клинические критерии (по меньшей мере 1):

- i. Боль в пояснице и жесткость в течение более 3 месяцев, которые улучшаются при физической нагрузке, но не ослабляются в состоянии покоя.

ii. Ограничение движения поясничного отдела позвоночника как в сагиттальной, так и в передней плоскостях.

iii. Ограничение расширения грудной клетки относительно нормальных значений, скорректированных по возрасту и полу.

5. Имеют симптомы активного заболевания при скрининге и на исходном уровне, о чем свидетельствует балл BASDAI ≥ 4 и балл VAS для общей боли в спине ≥ 4 , каждый по шкале от 0 до 10 см.

6. Иметь уровень CRP $\geq 0,3$ мг/дл при скрининге.

7. Либо имеет недостаточный ответ на по меньшей мере 2 НПВС в течение 4 недель в целом с максимальными рекомендованными дозами НПВС, либо не может получать полную 4 недели максимальной терапии НПВС из-за непереносимости, токсичности или противопоказания к НПВС.

8. При использовании НПВС или других анальгетиков для лечения AS субъект должен получать стабильную дозу по меньшей мере в течение 2 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время НПВС или другие анальгетики не используются для лечения AS, субъект не должен получать НПВС или другие анальгетики для лечения AS в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента.

9. При использовании кортикостероидов для перорального применения субъект должен получать стабильную дозу, эквивалентную ≥ 10 мг преднизона/день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время кортикостероиды не используются, кортикостероиды для перорального применения не должны приниматься в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента.

10. При использовании MTX, SSZ или HCQ лечение должно начаться по меньшей мере за 3 месяца до первого введения исследуемого агента и не должно иметь серьезных побочных токсических эффектов, связанных с модифицирующим течение заболевания противоревматическим лекарственным средством (DMARD). Способы введения и дозы ≤ 25 мг/неделя метотрексата должны быть стабильными в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента. При использовании SSZ или HCQ субъект должен получать стабильную дозу по меньшей мере в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Если в настоящее время MTX, SSZ или HCQ не используются, DMARD не должен приниматься в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента.

11. Перед рандомизацией женщина должна:

- не обладать детородным потенциалом: пременопауза; постклимактерический период (возраст > 45 лет с аменореей в течение по меньшей мере 12 месяцев); быть необратимо стерилизованными (например, перевязка маточных труб, гистерэктомия, двусторонняя сальпингэктомия); или быть иным образом неспособными к беременности.
- иметь детородный потенциал и использовать высокоэффективный способ

контрацепции, соответствующий местным правовым нормам в отношении применения способов контрацепции для субъектов, участвующих в клинических исследованиях, например, использовать одобренные для применения пероральные, инъекционные или имплантируемые гормональные методы контрацепции; размещения внутриматочных спиралей или внутриматочных систем; барьерные способы: презерватив со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или окклюзионный колпачок (мембрана или шеечный/вагинальный колпачок) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием; стерилизацию мужчины-партнера (вазэктомизированный партнер должен быть единственным партнером для данного субъекта); полное воздержание (если это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни субъекта).

12. Женщина с детородным потенциалом должна иметь отрицательный результат исследования сыворотки на беременность (β -хорионический гонадотропин человека [β -ХГЧ]) при скрининге и отрицательный результат исследования мочи на беременность на неделе 0 перед рандомизацией.

13. Женщина должна дать согласие не беременеть или не становиться донором яйцеклеток (ооцитов) для искусственного оплодотворения во время исследования и в течение 4 месяцев после получения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

14. Мужчина, находящийся в сексуальных отношениях с женщиной с детородным потенциалом и не подвергавшийся вазэктомии, должен согласиться на применение барьерного способа контрацепции, например презерватива со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или окклюзионного колпачка (мембраны или шеечного/влагалищного колпачка) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием у партнерши во время исследования и в течение 4 месяцев после последней дозы исследуемого агента. Все мужчины также не допускаются к донорству спермы во время исследования и в течение 4 месяцев после получения последней дозы исследуемого агента.

15. Считаются пригодными для участия в соответствии со следующими критериями скрининга туберкулеза (ТВ).

а. перед скринингом в анамнезе отсутствуют латентный или активный ТВ. Исключение сделано для субъектов, которые имеют латентный ТВ в анамнезе и в настоящее время получают лечение латентного ТВ, начнут получать лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого агента или имеют документальное подтверждение завершения соответствующего лечения латентного ТВ в течение 5 лет перед первым введением исследуемого агента.

б. Отсутствуют признаки или симптомы, указывающие на активный ТВ, при сборе анамнеза и/или физическом осмотре.

с. В последнее время не было близкого контакта с человеком с активным ТВ или, при наличии такого контакта, будет выполнено направление к врачу,

специализирующемуся на ТВ, для дополнительного обследования, и, если это необходимо, проведено надлежащее лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого агента.

d. В течение 6 недель перед первым введением исследуемого агента получен отрицательный результат теста QuantiFERON®-TB Gold, либо впервые получен положительный результат теста QuantiFERON®-TB Gold, при этом исключен активный ТВ, и начато соответствующее лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого агента. В течение 6 недель перед первым введением исследуемого агента дополнительно требуется отрицательный результат кожной туберкулиновой пробы (TST) или впервые полученный положительный результат TST, при этом исключен активный ТВ, а также начато соответствующее лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого агента, если тест QuantiFERON®-TB Gold не одобрен/не зарегистрирован в этой стране или TST является обязательным согласно предписанию местных органов здравоохранения.

i. Субъекты с устойчиво неопределенными результатами теста QuantiFERON® (TB Gold) могут быть введены в исследование без лечения латентного ТВ, если активный ТВ исключен, на рентгенограмме грудной клетки не видно никаких отклонений, указывающих на ТВ (активный или застарелый неактивный ТВ), и субъект не имеет дополнительных факторов риска по ТВ, определенных исследователем.

ii. Тест QuantiFERON®-TB Gold и TST не требуются при скрининге для субъектов с латентным ТВ в анамнезе, которые в настоящее время получают лечение латентного ТВ или у которых имеется документальное подтверждение проведенного надлежащего лечения, как описано выше; субъекты с документально подтвержденным проведением адекватного лечения, как описано выше, **не нуждаются** в проведении дополнительного лечения латентного ТВ.

e. Есть рентгенограмма грудной клетки (заднепередняя проекция), полученная в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента и с оценкой квалифицированного радиолога, без признаков текущего активного ТВ или старого, неактивного ТВ.

16. Результаты скрининговых лабораторных исследований находятся в пределах следующих диапазонов:

- a. гемоглобин $\geq 8,5$ г/дл;
- b. лейкоциты $\geq 3,5 \times 10^3$ /μл;
- c. нейтрофилы $\geq 1,5 \times 10^3$ /μл;
- d. тромбоциты $\geq 100 \times 10^3$ /μл;
- e. сывороточный креатинин $\geq 1,5$ мг/дл;

f. уровни АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы должны превышать ВГН для лаборатории, в которой выполняется исследование, не более чем в 1,5 раза.

17. Субъект должен иметь готовность и возможность соблюдать указанные в настоящем протоколе запреты и ограничения.

18. Каждый субъект должен подписать форму информированного согласия (ICF), указывая, что понимает цели и процедуры, которые требуются для исследования, и добровольно участвует в исследовании.

19. Каждый субъект должен подписать отдельную форму информированного согласия, если согласится предоставить необязательную пробу ДНК для исследования (если это разрешено местным законодательством). Отказ от предоставления согласия на взятие необязательной пробы ДНК не исключает возможности участия субъекта в клиническом исследовании.

20. Субъект готов воздержаться от применения дополнительных видов терапии, включая аюрведическую медицину, традиционное (-ые) китайское (-ые) лекарственное (-ые) средство (-а) и иглоукалывание, в течение 2 недель перед введением первого исследуемого агента и на протяжении всего исследования.

Критерии исключения

Любой потенциальный субъект, удовлетворяющий любому из следующих критериев, будет исключен из исследования.

1. Имеются другие воспалительные заболевания, которые могут повлиять на оценку пользы от терапии голимумабом, включая, без ограничений, РА, PsA, системную красную волчанку или болезнь Лайма.

2. Беременность, кормление грудью, планирование беременности или зачатия ребенка во время участия в исследовании или в течение 4 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

3. Получали любые системные иммуносупрессоры или DMARD, кроме MTX, SSZ, или HCQ, в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Лекарственные средства из этих категорий включают в себя, без ограничений, хлорохин, азатиоприн, циклоспорин, микофенолятмофетил, золото и пеницилламин. Кортикостероиды не включены в этот критерий; см. другие критерии пригодности для участия в кортикостероидах.

4. Получал лефлуномид в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента (независимо от того, проводили ли процедуру выведения лекарственного средства) или получал лефлуномид в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента и не прошел процедуру выведения лекарственного средства.

5. Получал эпидуральные, внутрисуставные, в/м или в/в кортикостероиды, включая адренокортикотропный гормон, в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента.

6. Никогда не получал голимумаб.

7. В течение 3 месяцев до первого введения исследуемого агента инфликсимаб (включая биоподобные агенты антитело к ФНО- α), адалимумаб или цертолизумаб пегол.

8. Получили этанерцепт или изаипу в течение 6 недель до первого введения исследуемого агента.

9. Получили более одного агента антител к ФНО- α предшествующего уровня

техники.

10. У всех предыдущих агентов антител к ФНО- α наблюдалась первичная неудача (определяемая как отсутствие ответа, оцениваемое исследователем или прекращение действия по причине отсутствия эффективности в течение первых 16 недель лечения).

11. Ранее получали биологическую терапию, отличную от агентов антител к ФНО- α , включая, без ограничений, тоцилизумаб, алфептит, эфализумаб, натализумаб, абатацет, анакинир, устекинумаб, бродалумаб, превикинумаб, иксекизумаб и средства для истощения В-клеток.

12. Когда-либо получал тофацитиниб или любые другие ингибиторы Янус-киназы (JAK).

13. Иметь известную гиперчувствительность к белкам иммуноглобулина человека.

14. Когда-либо применял цитотоксические лекарственные средства, включая хлорамбуцил, циклофосфамид, азотистый иприт или другие алкилирующие агенты.

15. Наличие в анамнезе активной гранулематозной инфекции, включая гистоплазмоз или кокцидиоидомикоз, перед скринингом. Информацию о пригодности к участию с наличием в анамнезе скрытого ТВ см. в критериях включения.

16. Выполненная вакцинация против бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) в течение 12 месяцев после скрининга.

17. Наличие рентгенограммы грудной клетки, полученной в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, на которой продемонстрирована аномалия, свидетельствующая о злокачественной опухоли или активной в настоящее время инфекции, включая ТВ.

18. Наличие нетуберкулезной микобактериальной инфекции или оппортунистической инфекции (например, цитомегаловирус, пневмоцистоз, аспергиллез) в течение 6 месяцев перед скринингом.

19. Наличие в настоящее время или перенесенная инфекция опоясывающего герпеса в течение 2 месяцев после первого введения исследуемого агента.

20. Получал, или ожидается, что получит любую живую вирусную или бактериальную вакцину в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, в течение исследования или в течение 3 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

21. Наличие в анамнезе инфицирования протеза сустава или получение когда-либо антибиотиков в связи с подозрением на инфекцию протеза сустава, если этот протез не был удален или заменен.

22. Наличие в прошлом серьезной инфекции (включая, без ограничений, гепатит, пневмонию, сепсис или пиелонефрит), или госпитализация по поводу инфекции, или лечение в/в антибиотиками по поводу инфекции в течение 2 месяцев перед первым введением исследуемого агента.

23. Наличие в анамнезе или в настоящее время хронического или рецидивирующего инфекционного заболевания, включая, без ограничений, хроническую

почечную инфекцию, хроническую легочную инфекцию (например, бронхоэктаз), синусит, рецидивирующую инфекцию мочевыводящих путей (например, рецидивирующий пиелонефрит), открытую, дренированную или инфицированную кожную рану или язву.

24. Субъект имеет положительный результат анализа на антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) в анамнезе, или получен положительный результат на ВИЧ при скрининге.

25. Наличие инфекции гепатита В. Субъекты должны проходить скрининг на вирус гепатита В (ВГВ). Как минимум, подразумевается исследование на HBsAg (поверхностный антиген ВГВ), антитела к HB (антитело к поверхности ВГВ) и общее количество антител к HBc (общее количество антител к ядерному антигену ВГВ).

26. Субъекты, серопозитивные по антителам к вирусу гепатита С (ВГС), если только у них нет 2 отрицательных результатов теста на РНК ВГС с интервалом 6 месяцев перед скринингом, а затем третий отрицательный результат теста на РНК ВГС при скрининге.

27. Наличие в анамнезе известных демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз или неврит зрительного нерва.

28. В настоящее время есть признаки или симптомы тяжелых, прогрессирующих или неконтролируемых почечных, печеночных, гематологических, желудочно-кишечных, эндокринных, легочных, сердечных, неврологических, церебральных или психических заболеваний.

29. Имеет в анамнезе или сопутствующую застойную сердечную недостаточность (ЗСН), включая контролируемую лекарственными средствами асимптоматическую ЗСН.

30. Наличие в анамнезе лимфопролиферативного заболевания, включая лимфому, или признаков и симптомов, указывающих на возможное лимфопролиферативное заболевание, такое как лимфаденопатия необычного размера или местоположения, клинически значимая спленомегалия или моноклональная гаммопатия с неопределенной значимостью.

31. У субъекта имеется злокачественное новообразование в анамнезе в течение 5 лет до скрининга (исключениями являются плоскоклеточные и базальноклеточные карциномы кожи, которые были излечены без признаков рецидива в течение по меньшей мере 3 месяцев до введения первого исследуемого агента, и карцинома шейки матки *in situ*, которая была излечена хирургическим путем).

32. У субъекта отмечаются известные аллергии, гиперчувствительность или непереносимость голимумаба или его эксципиентов (см. Голимумаб IB).

33. Субъект получал любые запрещенные виды терапии до запланированной первой дозы исследуемого лекарственного средства.

34. Субъект получал экспериментальное лекарственное средство (включая экспериментальные вакцины) в течение 5 периодов полужизни или 3 месяцев, в зависимости от того, что длиннее, или применял инвазивное экспериментальное

медицинское устройство в течение 3 месяцев до запланированной первой дозы исследуемого лекарственного средства, либо в настоящее время включен в экспериментальное исследование.

35. Субъект имеет какое-либо состояние, в связи с которым, по мнению исследователя, участие не будет лучшим решением для данного субъекта (например, ухудшится самочувствие) или которое может не допускать, ограничивать или искажать указанные в протоколе оценки.

36. Субъект подвергался крупному хирургическому вмешательству (например, требующему общей анестезии) в течение 1 месяца перед скринингом, или полностью не восстановился после вмешательства, или у субъекта запланировано хирургическое вмешательство в то время, когда субъект предположительно должен будет участвовать в исследовании или в течение 1 недели после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

37. Трансплантация органа (за исключением трансплантата роговицы в течение > 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента).

38. В течение последних 3 лет у субъекта наблюдалась проблема зависимости от веществ (лекарств или алкоголя).

39. Субъект не может или не желает подвергаться множеству венепункций в связи с плохой переносимостью или отсутствием легкого доступа к венам.

40. Субъект является сотрудником исследователя или исследовательского центра, непосредственно участвующим в намеченном исследовании или в других исследованиях под руководством данного исследователя или исследовательского центра, а также членом семей сотрудников или исследователя.

ПРИМЕЧАНИЕ. Исследователи должны обеспечить соблюдение всех критериев включения при скрининге и еще раз перед рандомизацией. Если состояние субъекта изменяется (включая результаты лабораторных исследований или получение дополнительных медицинских данных) после скрининга, но перед введением первой дозы исследуемого лекарственного средства так, что он или она перестают соответствовать всем критериям включения, то субъект должен быть исключен из исследования.

Запреты и ограничения

Потенциальные субъекты должны демонстрировать готовность и способность придерживаться следующих запретов и ограничений в ходе исследования для того, чтобы иметь право на участие в нем.

1. Как гетеросексуальные ведущие половую жизнь женщины с детородным потенциалом, так и мужчины, способные зачать ребенка, должны согласиться на применение высокоэффективного способа контрацепции и продолжать применение контрацепции в течение всего исследования и в течение 4 месяцев после последнего введения исследуемого агента.

2. Применение следующих лекарственных средств запрещено одновременно с в/в введением исследуемого агента:

- Системные иммуносупрессоры или DMARD (кроме MTX, SSZ и HCQ), включая хлорохин, азатиоприн, пероральный циклоспорин А, такролимус, микофенолята мофетил, лефлуномид, пероральное или парентеральное золото. Системные иммуносупрессоры не относятся к кортикостероидам; См. другие ограничения в отношении кортикостероидов.

- Биологические агенты, нацеленные на снижение ФНО α (включая, без ограничений, инфликсимаб, голимумаб п/к, цертолизумаб пегол, этанерцепт, йисайпу, СТ-P13 [Remsima] и адалимумаб);

- IL-1ra (анакинра);

- тоцилизумаб или любой другой биологический агент, нацеленный на IL-6 или рецептор IL-6;

- тофацитиниб или любой другой ингибитор JAK;

- средства уменьшения числа В-клеток (например, ритуксимаб);

- цитотоксические лекарственные средства, такие как циклофосфамид, хлорамбуцил, азотистый иприт, или другие алкилирующие агенты

- абатацепт;

- устекинумаб;

- агенты к IL-17 (например, бродалумаб, секукинумаб и иксекизумаб);

- исследуемые лекарственные средства.

3. Субъект должен согласиться не получать живую вирусную или живую бактериальную вакцину во время исследования. Субъект должны также согласиться не получать живую вакцину в течение 3 месяцев после последнего введения исследуемого агента. Субъект не должен получать вакцину против бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) в течение 12 месяцев после скрининга.

4. Субъект должен согласиться не получать какое-либо исследуемое медицинское устройство или исследуемое лекарственное средство помимо исследуемого агента для данного исследования.

5. Субъекты, получавшие НПВС, включая аспирин и селективные ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)-2, а также другие анальгетики, должны получать обычные присутствующие на рынке дозы, одобренные в стране, в которой проводится исследование. Рецепты на НПВС и другие анальгетики не следует корректировать в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого лекарственного средства и до недели 16, и их можно изменять только в том случае, если у субъекта разовьются неприемлемые побочные эффекты. После недели 16 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы; в противном случае рецепты на НПВС и другие анальгетики могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

Допускается применение местных анальгетиков, включая капсаицин и диклофенак.

6. Субъекты, получавшие перорально кортикостероиды, должны получать стабильную дозу, эквивалентную ≤ 10 мг преднизона в день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента и продолжать получать эту дозу до

недели 16. После недели 16 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы кортикостероидов для перорального применения; в противном случае доза и тип кортикостероида для перорального применения могут быть изменены по усмотрению исследователя только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

Эпидуральное, в/м или в/в введение кортикостероидов не допускается в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента и не допускается для лечения AS на протяжении всего исследования. Следует прилагать все возможные усилия, чтобы избежать применения эпидуральных, в/м и в/в кортикостероидов во время исследования по любым показаниям, кроме AS. На протяжении недели 60 не допускается длительное (> 2 недель) применение пероральных или в/в кортикостероидов по любым показаниям, кроме AS. Краткосрочное (≤ 2 недель) применение пероральных, в/в, в/м или эпидуральных кортикостероидов по любым показаниям, кроме AS, должно быть ограничено ситуациями, в которых, по мнению лечащего врача, не существует адекватных альтернатив.

Внутрисуставные стероиды не следует вводить в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Следует прилагать усилия, чтобы избежать внутрисуставных инъекций кортикостероидов, особенно в течение первых 16 недель исследования. Однако при необходимости субъекты могут получать до 2 инъекций кортикостероида внутрь сустава, в сухожильное влагалище или синовиальную сумку, не более чем в 2 пораженных участка в течение 60 недель исследования.

7. Использование дополнительных терапевтических средств, которые могут влиять на активность или оценку заболевания AS, включая, без ограничений, традиционную медицину (например, китайскую медицину, иглоукалывание, аюрведическую медицину), запрещено до недели 60.

ПРЕДШЕСТВУЮЩАЯ И СОПУТСТВУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

Следует приложить все возможные усилия, чтобы не вносить изменений в прием сопутствующих лекарственных средств до недели 16 или в соответствии с указанным для AS терапии в следующих разделах. Возможно уменьшение дозы сопутствующего лекарственного средства или временное прекращение приема лекарственного средства из-за ненормальных лабораторных показателей, побочных эффектов, сопутствующих заболеваний или выполнения хирургического вмешательства, но изменения и причины изменений следует четко зафиксировать в медицинской документации субъекта.

Субъекты не должны начинать никакое новое лечение В течение 60-недельного периода исследования.

Оценка сопутствующих лекарственных средств будет проводиться при посещениях исследования, указанных в графике проведения мероприятий.

Метотрексат, сульфасалазин или гидроксихлорохин

Субъектам разрешено регистрироваться в исследовании при приеме стабильных доз MTX, SSZ или HCQ.

Если субъекты получают MTX, SSZ или HCQ, лечение должно начинаться по меньшей мере за 3 месяца перед первым введением исследуемого агента. Способы введения и дозы ≤ 25 мг/неделя MTX должны быть стабильными в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента. Рекомендуется, чтобы все субъекты, принимающие MTX в данном исследовании, получали перорально по меньшей мере 5 мг фолата или 5 мг фолиниевой кислоты еженедельно. При использовании SSZ или HCQ субъекты должны получать стабильную дозу по меньшей мере в течение 4 недель перед первым введением исследуемого агента.

Субъекты, не получающие лечение MTX, SSZ или HCQ, должны были прекратить лечение в течение по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого агента и не должны получать MTX, SSZ или HCQ до недели 60.

Следует предпринять все усилия для поддержания стабильных доз и путей введения MTX, SSZ и HCQ до недели 60 исследования у субъектов, получавших данное лекарственное средство. Инструкции по корректировке дозы в случае токсичности MTX включены в файл исследовательского центра.

Кортикостероидная терапия

Субъекты, получавшие перорально кортикостероиды для лечения AS, должны получать стабильную дозу, эквивалентную ≤ 10 мг преднизона в день, в течение по меньшей мере 2 недель перед первым введением исследуемого агента, и продолжать получать эту дозу до недели 16. После недели 16 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы кортикостероидов для перорального применения; в противном случае доза и тип кортикостероида для перорального применения могут быть изменены по усмотрению исследователя только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты. Субъекты, которые не получали кортикостероиды для перорального применения на исходном уровне, должны были прекратить прием кортикостероидов для перорального применения по меньшей мере за 2 недели до первого введения исследуемого агента, и они не должны получать пероральные кортикостероиды для лечения AS до недели 60.

Внутривенное, внутримышечное или эпидуральное введение кортикостероидов для лечения AS запрещено до 60 недели.

На протяжении недели 60 не допускается длительное (> 2 недель) применение пероральных или в/в кортикостероидов по любым показаниям, кроме AS. Краткосрочное (≤ 2 недель) применение пероральных, в/в, в/м или эпидуральных кортикостероидов по любым показаниям, кроме AS, должно быть ограничено ситуациями, в которых, по мнению лечащего врача, не существует адекватных альтернатив. На протяжении всего исследования допускается ингаляционный, ушной, глазной, интраназальный и другие способы доставки кортикостероидов в слизистую оболочку.

Следует прилагать усилия, чтобы избежать внутрисуставных инъекций кортикостероидов, особенно в течение первых 16 недель исследования. Однако при необходимости субъекты могут получать до 2 инъекций кортикостероида внутрь сустава,

в сухожильное влагалище или синовиальную сумку, не более чем в 2 пораженных участка в течение 60 недель исследования. В случае выраженной болезненности или припухлости в одном суставе предполагается, что перед выполнением внутрисуставной инъекции кортикостероида необходима оценка субъекта на наличие инфекции.

Нестероидные противовоспалительные средства и другие анальгетики

Допускается применение стабильных доз НПВС и других анальгетиков.

Субъекты, получавшие НПВС, включая аспирин и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2, а также другие анальгетики, должны получать обычные коммерческие дозы, одобренные в стране, в которой проводится исследование, и должны получать стабильную дозу по меньшей мере за 2 недели перед первым введением исследуемого агента. До недели 16 доза и тип НПВС и других анальгетиков могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты. После недели 16 и до недели 60 допускается однократное снижение дозы; в противном случае рецепты на НПВС и другие анальгетики могут быть изменены только в том случае, если у субъекта развиваются неприемлемые побочные эффекты.

Допускается применение местных анальгетиков, включая капсаицин и диклофенак.

В этом исследовании аспирин считается НПВС, за исключением малых доз аспирина, назначаемых для лечения сердечно-сосудистых или цереброваскулярных заболеваний.

Модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства/синергические иммуносупрессоры

Прием модифицирующих течение заболевания противоревматических препаратов/системных иммуносупрессорных агентов, за исключением MTX, SSZ и HCQ, должен быть прекращен по меньшей мере за 4 недели перед первым введением исследуемого агента и запрещен до недели 60. Такие DMARD включают в себя, без ограничений, хлорохин, препараты золота, пеницилламин и лефлуномид. Если субъект получал лефлуномид в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого агента, субъект должен пройти процедуру выведения лекарственного средства. Запрещенные системные иммуносупрессорные лекарственные средства до недели 60 включают в себя, без ограничений, циклоспорин, такролимус, микофенолата мофетил и азатиоприн. Системные иммуносупрессоры не относятся к кортикостероидам.

Биологические агенты, цитотоксические лекарственные средства или экспериментальных агенты

Применение биологических агентов (например, голимумаба п/к, анакинры, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, алефакета, эфализумаба, ритуксимаба, натализумаба), цитотоксических агентов (например, хлорамбуцила, циклофосфамида, азотистого иприта, других алкилирующих средств) или экспериментальных лекарственных средств не допускается в течение 60 недель исследования. При использовании любого из этих лекарственных средств субъекту прекратят дальнейшие инфузии исследуемого агента.

Дополнительные виды терапии

Применение дополнительных видов терапии, включая аюрведическую медицину, традиционные китайские лекарственные средства или немедикаментозную терапию, такую как иглоукалывание, не допускается в течение 60 недель исследования.

ОЦЕНКИ В РАМКАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность

Оценки

Батский показатель активности анкилозирующего спондилита

BASDAI определен ниже:

Самооценивание субъектов с использованием VAS (от 0 до 10 см) по следующим критериям:

- A. Утомляемость
- B. Боль в позвоночнике
- C. Боль в суставах
- D. Энтезит
- E. Качественная утренняя жесткость
- F. Количественная утренняя жесткость

$BASDAI = 0,2 (A+B+C+D+0,5[E+F])$.

Функциональный индекс анкилозирующего спондилита в ванне

BASFI представляет собой самооценку субъекта, представленную средним значением (VAS; 0-10 см) из 10 вопросов, 8 из которых относятся к функциональной анатомии субъекта, а 2 из которых относятся к способности субъекта справляться с повседневной жизнью. Увеличение по шкале указывает на ухудшение условий.

Общая оценка пациента

Глобальная оценка активности заболевания у пациента будет записана на VAS (от 0 до 10 см; 0=очень хорошо, 10=очень плохо).

Общее количество боли в спине

Субъектов просят оценить среднюю общую боль в спине в течение последней недели на BAS (от 0 до 10 см; 0=боль отсутствует, 10=наиболее тяжелая боль).

Ночная боль в спине

Субъектов просили оценить боль в ночное время в спине в течение последней недели на BAS (от 0 до 10 см; 0=боль отсутствует, 10=наиболее тяжелая боль).

Оценки скелетно-мышечной структуры

Оценки скелетно-мышечной системы будут включать каждый компонент BASMI, индекса энтезита и экспансии грудной клетки.

В каждом исследовательском центре будет назначен независимый специалист по оценке опорно-двигательного аппарата (ИМА) с соответствующей подготовкой и опытом в проведении оценок опорно-двигательного аппарата для выполнения всех оценок опорно-двигательного аппарата. Настоятельно рекомендуется, чтобы тот же ИМА, который выполнял оценки опорно-двигательного аппарата у субъекта на исходном уровне, также

выполнял оценки у этого субъекта при каждом последующем посещении до недели 52.

Спонсор будет проводить обучение для каждого исследовательского центра, обозначенного IMA, перед скринингом первого субъекта в каждом исследовательском центре. Запасной IMA должен пройти обучение перед проведением оценки суставов во время посещения субъекта в рамках исследования. Документацию о проведенном обучении каждого IMA следует хранить в исследовательском центре. По возможности согласованный эксперт для исследования не должен меняться в ходе исследования.

Если спонсор проводил обучение IMA в предыдущем клиническом исследовании в течение последних 3 лет и имеется надлежащее документальное подтверждение этого обучения (сертификат), это обучение будет считаться достаточным для данного исследования; однако перед началом исследования рекомендуется провести повторное обучение.

Все IMA, выполняющие оценку суставов в исследовательском центре, должны быть записаны в журнале со списком сотрудников в исследовательском центре и должны быть внесены в исходную документацию во время каждого посещения.

После недели 28 эксперт по оценке суставов необязательно должен быть независимым. Однако рекомендуется не менять эксперта по оценке суставов в ходе исследования.

Показатель анкилозирующего спондилита в ванне

BASMI представлен в виде совокупного балла по 5 компонентам (в диапазоне от 0 до 10) и будет рассчитан с использованием расчета van der Heijde, как показано в таблице 6.

Таблица 6: Уравнения, предлагаемые для преобразования оценок (A) в баллы (И) для пяти компонентов BASMI_{lin}

	S=0 если:	от 0 до 10;	S=10 если:
Боковой изгиб поясничного отдела* (см)	$A \geq 21,1$	$S=(21,1 - A)/2,1$	$A \leq 0,1$
Расстояние от длины до стенки* (см)	$A \leq 8$	$S=(A - 8)/3$	$A \geq 38$
Люмбийский изгиб (модифицированный Schober) (см)	$A \geq 7,4$	$S=(7,4 - A)/0,7$	$A \leq 0,4$
Межмальеоларное расстояние (см)	$A \geq 124,5$	$S=(124,5 - A)/10$	$A \leq 24,5$
Угол вращения шейки матки* (°)	$A \geq 89,3$	$S=(89,3 - A)/8,5$	$A \leq 4,3$

* Для бокового изгиба поясничного отдела, расстояния между косыми стенками и шейного вращения следует принимать среднее значение справа и слева. Если оценка выходит за пределы диапазона 0-10, необходимо использовать значения 0 или 10 соответственно.

BaSMI_{lin} представляет собой среднее значение пяти оценок S.

Оценки (A) 5 компонентов будут собраны на участках, а оценка (-и) будет (-ут) рассчитана (-ы) программно на основании оценок при выполнении анализа.

Оценка по критериям ответа на лечение анкилозирующего спондилита

Улучшение ответа на 20% в соответствии с критериями Международной рабочей группы ПО качеству ОБСЛУЖИВАНИЯ (ASA 20) определяют как:

1. Улучшение $\geq 20\%$ относительно исходного уровня и абсолютное улучшение относительно исходного уровня по меньшей мере на 1 по шкале от 0 до 10 см в по меньшей мере 3 из следующих 4 доменов:

- i. Глобальный пациент
- ii. Общая боль в спине
- iii. Функция (BASFI)
- iv. Воспаление (среднее из последних 2 вопросов BASDAI относительно утренней жесткости)

2. Отсутствие ухудшения относительно исходного уровня ($\geq 20\%$ и ухудшение по меньшей мере 1 по шкале от 0 до 10 см) в потенциальном оставшемся домене.

ASA 40 определяется как улучшение на $\geq 40\%$ в 3 из 4 доменов с абсолютным улучшением по меньшей мере 2 по шкале от 0 до 10 см и без ухудшения в остальной области.

ASA 5/6 определяется как улучшение любого 5 из 6 доменов боли на $\geq 20\%$ (VAS от 0 до 10 см), глобального состояния пациента (VAS от 0 до 10 см), функции (балл BASFI), утренней жесткости (от BASDAI), CRP и подвижности позвоночника (поясничный изгиб).

Минимальная активность заболевания

Низкий уровень активности заболевания будет измерен по критериям «частичной ремиссии ASA», определенным как значение ниже 2 по шкале от 0 до 10 см в каждом из 4 доменов ASA, описанных выше.

Оценка активности заболевания для анкилозирующего спондилита

Оценка международного общества спондилоартрита (ASA) разработала оценку активности заболевания (DAS) для применения в AS, ASDAS. Для данного исследования будет использована следующая формула для расчета балла ASDAS:

$ASDAS = 0,121 \times \text{общая боль в спине} + 0,058 \times \text{продолжительность утренней жесткости} + 0,110 \times \text{общая оценка пациентов} + 0,073 \times \text{периферическая боль/отек} + 0,579 \times \ln(\text{CRP (мг/л)} + 1)$.

Основное улучшение ASDAS определяют как уменьшение $\geq 2,0$. Клиническая ремиссия определяется как показатель $ASDAS < 1,3$;

Клинически важное улучшение ASDAS определяется как снижение $\geq 1,1$

Индекс энтезита

Энтезит является важным признаком AS и других спондилоартропатий. Текущий индекс энтезита Калифорнийского университета в Сан-Франциско (UCSF), используемый в клинических исследованиях, будет выполнен в рамках данного исследования. Оценка перечисленных энтезов IMA позволит определить общий балл энтезита (Таблица 7).

Таблица 7: Индекс энтезита

Энтезит UCSF

C1-2 X

C7-T1 X

T12-L1 X

Изохронная труба L/ R

Лобковый симфиз X

5-й поясничный остистый отросток X

гребень подвздошной кости L/ R

большой вертел L/ R

Медиальный бедренный мыщелок L/ R

Присоединение ахиллова сухожилия L/ R

Подошвенное прикрепление L/ R

ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЭЛЕМЕНТОВ 17

Энтезиты оцениваются как 0 (нонтендер) или 1 (тендер).

Расширение грудной клетки

Расширение грудной клетки представляет собой разность между окружностью грудной клетки при максимальном вдыхании и максимальном истечении. Ее измеряют на уровне четвертого межреберного пространства у мужчин и чуть ниже груди у женщин.

Краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов

Опросник для оценки состояния здоровья SF-36 для определения результата лечения в исследовании был разработан в рамках эксперимента по страхованию здоровья RAND и состоит из 8 многокомпонентных шкал:

- ограничения в физическом функционировании из-за проблем со здоровьем;
- ограничения в повседневной деятельности из-за проблем с физическим здоровьем;
- боль в теле;
- общее психологическое состояние (психологический стресс и благополучие);
- ограничения в повседневной деятельности в связи с личными или эмоциональными проблемами;
- ограничения в социальном функционировании из-за проблем с физическим или психическим здоровьем;
- жизненный тонус (энергия и усталость);
- общее восприятие состояния здоровья.

Эти шкалы оценивают от 0 до 100, где более высокие оценки указывают на лучшее состояние здоровья. Другой алгоритм предоставляет 2 сводных балла, общий показатель физического компонента (PCS) и общий показатель психического компонента (MCS). Эти сводные оценки также масштабируются при помощи более высоких оценок, указывающих на лучшее здоровье, но оцениваются с помощью системы, основанной на нормальном уровне, в которой линейные трансформации выполняют для преобразования оценок в среднее значение 50 и стандартные отклонения 10 на основании общих норм США. Концепции, измеряемые SF-36, не специфичны ни к одному возрасту, заболеванию или группе лечения, что позволяет сравнивать относительную нагрузку различных заболеваний и относительную пользу различных видов лечения.

Шкала клинического исследования результатов

Степень проблем со сном будет оцениваться с помощью MOS-SS. По данным MOS-SS измеряют шесть размеров сна, включая инициирование, техническое обслуживание (яйца, остановку сна), количество, адекватность, сонливость (яйца, сонливость) и нарушения дыхания (яйца, нехватку дыхания, храп). Шкала сна MOS является общей мерой здоровья, оценивающей состояние здоровья, связанное с состоянием здоровья (HRQOL) - сон, который имеет отношение к состоянию здоровья и благополучию всех людей и который, как известно, напрямую зависит от заболевания и лечения. Таким образом, MOS-SS не является специфичным для какой-либо возрастной группы, заболевания или группы лечения. Надежность и достоверность MOS-SS оценивали в ряде областей заболевания, включая нейропатическую боль и RA.

Анкилозирующий вопросы по качеству спондилита (ASQoL)

Анкилозирующее качество жизни спондилита представляет собой самостоятельно введенный пациентский инструмент результатов. Он состоит из 18 пунктов, запрашивающих утвердительный или отрицательный ответ на вопросы, связанные с влиянием боли на сон, настроение, мотивацию, способность справиться, деятельность повседневной жизни, независимость, взаимоотношения и социальную жизнь. Оценку 1 дают ответу « ДА » на каждом элементе, и все показатели элемента суммируют с общим показателем в диапазоне 0-18. Более высокие показатели указывают на худшее качество жизни, связанное со здоровьем. Субъекты могут завершить работу инструмента менее чем за четыре минуты.

Опросный лист EQ-5D

EuroQol-5D (EQ-5D) представляет собой стандартизованную меру состояния здоровья, разработанную группой EuroQoL, чтобы обеспечить простую общую меру здоровья для клинического и экономического аппетита (группа EuroQoL, 1990). EQ-5D применима к широкому спектру состояний здоровья и способов лечения. EQ-5D по существу состоит из 2 элементов: Из описательной системы EQ-5D и визуальной аналоговой шкалы EQ (EQ-VAS). Описательная система EQ-5D содержит следующие 5 аспектов: подвижность, самоуход, обычная деятельность, боль/дискомфорт и тревожность/депрессия. Каждый размер имеет 5 уровней: нет проблем, незначительных проблем, умеренных проблем, серьезных проблем и экстремальных проблем. Респондента просят указать состояние здоровья, отметив (или поставив крестик) поле напротив наиболее подходящего утверждения в каждом из 5 параметров. Это решение приводит к однозначному номеру, выражающему уровень, выбранный для этого размера. Цифры для 5 измерений могут быть объединены в 5-значный номер, описывающий состояние здоровья респондента, которое может быть преобразовано в единый сводный индекс (EQ-5D) путем применения формулы, которая присоединяет значения (также называемые весами) к каждому из уровней в каждом измерении. EQ VAS регистрирует самооценку состояния респондента на вертикальной линии, VAS, где конечные точки обозначены как « наилучшее видимое состояние здоровья » и « худшее состояние здоровья, которое только можно представить ». EQ VAS можно использовать в качестве количественной меры

клинического результата в отношении здоровья, оцениваемого отдельными ответами.

Конечные показатели

Основной конечный показатель

Основным конечным показателем данного исследования является доля субъектов, достигших ASAS 20 на неделе 16.

Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ASAS 20 на неделе 16 будет статистически значимо выше в группе голимумаба по сравнению с группой плацебо.

Главные вторичные конечные показатели

Следующие главные вторичные конечные показатели перечислены в порядке их значимости, как указано ниже:

1. Доля субъектов, которые достигли эффекта ASAS 40 на неделе 16.
2. Доля субъектов, которые достигли по меньшей мере 50% улучшения относительно исходного уровня BASDAI на неделе 16.
3. Изменение относительно исходного уровня BASFI на неделе 16.

Другие вторичные конечные показатели

Контролируемые вторичные конечные показатели (с контролем частоты ошибок I рода для множественности).

В дополнение к основным и главным вторичным конечным показателям будут проанализированы следующие контролируемые вторичные конечные показатели, перечислены в порядке важности, как указано ниже:

1. Изменение относительно исходного уровня показателя SF-36 PCS на неделе 16;
2. изменение относительно исходного уровня показателя SF-36 MCS на неделе 16.
3. Доля субъектов, достигших низкого уровня активности заболевания (частичная ремиссия ASA) на неделе 16.
4. Изменение относительно исходного уровня показателя ASQoL на неделе 16.
5. Изменение относительно исходного уровня BASMI на неделе 16.

Для контроля на множественность вышеуказанные конечные показатели будут последовательно тестировать в вышеуказанном порядке, только если основные и все главные вторичные конечные показатели достигнут статистической значимости.

Другие вторичные конечные показатели включают в себя

В дополнение к основным, главным вторичным и контролируемым вторичным конечным показателям будут оцениваться следующие конечные показатели.

1. Доля субъектов, которые достигли эффекта ACR 20 на неделе 2.
2. Доля субъектов, достигших ответов ASAS 20 и ASAS 40 с течением времени.
3. Доля субъектов, которые достигли низкой активности заболевания (частичная ремиссия ASA) с течением времени.
4. Изменение данных по BASFI относительно исходного уровня с течением времени;
5. Изменение данных по BASMI относительно исходного уровня с течением

времени.

6. Изменение относительно исходного уровня показателя PCS и показателя MCS SF-36 с течением времени.

7. Доля субъектов, которые достигли улучшения BASDAI <3 баллов с течением времени.

8. Изменение данных по ASDAS относительно исходного уровня с течением времени.

9. Доля субъектов, которые достигли существенного улучшения ASDAS (снижение $\geq 2,0$) с течением времени.

10. Доля субъектов, которые достигли неактивного заболевания ASDAS ($<1,3$) с течением времени.

11. Изменение относительно исходного уровня оценки энтезита у субъектов с энтезитом на исходном уровне и доля субъектов с энтезитом с течением времени.

12. Изменение относительно исходного уровня баллов по ASQoL с течением времени.

ЗАВЕРШЕНИЕ/ПРЕКРАЩЕНИЕ УЧАСТИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ СУБЪЕКТОМ

Завершение участия

Субъект будет считаться завершившим исследование после выполнения оценок на неделе 60 исследования. Субъекты, преждевременно прекратившие исследуемое лечение по любой причине, не будут считаться завершившими исследование.

Прекращение участия в исследовании

Субъект будет исключен из исследования по любой из следующих причин:

- невозможность последующего наблюдения;
- отзыв согласия;
- летальный исход.

В случае невозможности последующего наблюдения за субъектом персонал исследовательского центра должен приложить все целесообразные усилия, чтобы связаться с субъектом и определить причину отмены лечения/исключения из исследования. Меры, принятые для осуществления последующего наблюдения, должны быть зафиксированы в документации.

Если субъект выходит из исследования до его завершения, то причина исключения должна быть отражена в индивидуальной регистрационной карте (eCRF) и в первичном документе. Исследуемое лекарственное средство, предназначенное для выбывшего субъекта, не может быть назначено другому субъекту. Для выбывших субъектов замена не предусмотрена. Если субъект прекращает введение исследуемого агента до завершения лечения, следует выполнить оценки после лечения.

Прекращение участия в сборе дополнительных проб для научных исследований, но продолжение участия в основном исследовании

Субъект может отозвать согласие на сбор необязательных проб, при этом он остается в исследовании. В таком случае необязательные пробы будут уничтожены.

Способ уничтожения проб будет осуществляться, как описано выше.

Отказ от использования проб в будущих научных исследованиях

Субъект может отозвать согласие на использование проб в будущих научных исследованиях. В таком случае пробы будут уничтожены после того, как они станут ненужными для клинического исследования. Подробная информация о сохранении пробы для научных исследований представлена в основной форме информированного согласия (ICF) и в отдельной ICF для необязательных проб для научных исследований.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Для суммирования большинства данных будут использовать простую описательную сводную статистику, такую как n , среднее, СО, медианное значение, межквартильный размах, минимум и максимум для непрерывных переменных, а также абсолютные значения и процентные доли для дискретных переменных.

Если не указано иное, для сравнения таких категориальных переменных, как доля субъектов, отвечающих на лечение, будет использоваться критерий Кохрена-Мантеля-Гензеля (CMH), стратифицированный по предшествующему использованию терапии против ФНО α . В целом, если не указано иное, для анализа непрерывных переменных будет использоваться ANOVA с использованием терапии против ФНО α на исходном уровне в качестве фактора. Все статистические исследования будут выполнены при $\alpha=0,05$ (2-сторонний). Кроме статических анализов, графическое отображение данных (например, линейные графики) и списки субъектов также можно использовать для обобщения/представления данных.

Анализ эффективности и обобщенные сведения о субъектах будут основаны на популяции пациентов, получавших лечение (т. е. всех рандомизированных субъектов). Данные по субъектам, включенным в анализы эффективности, будут обобщенно представлены согласно группам с распределенным лечением, вне зависимости от того, получали ли они назначенное лечение.

Анализ безопасности и ФК будут включать всех субъектов, которым по меньшей мере один раз ввели исследуемое лечение.

Анализ эффективности

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ КОНЕЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Основным конечным показателем данного исследования является доля субъектов, достигших ASAS 20 на неделе 16.

Для решения основной цели долю субъектов, достигших эффекта ЛЕЧЕНИЯ ASA 20 на неделе 16, сравнивают между группами плацебо и голиумаба с использованием теста CMH, стратифицированного по предыдущему применению терапии антитело к ФНО- α (да или нет) на уровне значимости 0,05 (2-сторонний).

В этом основном анализе эффективности данные всех рандомизированных субъектов будут проанализированы в соответствии с группой лечения, в которую они распределены, независимо от фактического полученного лечения. Процедуру переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) будут использовать для ввода

пропущенных компонентов ASAS при наличии у субъектов данных по меньшей мере для 1 компонента ASAS на неделе 16. Если у субъектов на неделе 16 нет данных для всех компонентов ASAS, они будут считаться не ответившими на лечение пациентами. Кроме того, будут применяться правила для определения неэффективности лечения.

Кроме того, будет выполнен анализ подгрупп для оценки однородности основного конечного показателя эффективности в зависимости от демографических характеристик, исходных характеристик заболевания и принимаемых на исходном уровне лекарственных средств. При необходимости также будет выполнен анализ взаимодействия между подгруппами и группой лечения.

Анализы главных вторичных конечных показателей

Следующие анализы главных вторичных конечных показателей будут выполнены в порядке важности, описанном ниже.

1. Обобщение и сравнение данных о доле субъектов, которые достигли ответа ASAS 40 на неделе 16, между группами лечения.
2. Долю субъектов, которые достигли по меньшей мере А 50% улучшения относительно исходного уровня В BASDAI на неделе 16, будут сравниваться и обобщаться между группами лечения.
3. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня BASFI на неделе 16 между группами лечения.

Поскольку существует только 2 группы лечения (1 статистическое сравнение), нет необходимости в коррекции на множественность в пределах каждого конечного показателя эффективности.

Для контроля частоты ошибок I рода на множественность первый главный вторичный конечный показатель будет проверен только в том случае, если основной конечный показатель достигнет статистической значимости на уровне значимости 0,05 (2-сторонний). Последующие главные вторичные конечные показатели будут проанализированы только в том случае, если различия в основном конечном показателе и предыдущем (-их) главном (-ых) вторичном (-ых) конечном (-ых) показателе (-ях) будут статистически значимыми при уровне значимости 0,05 (2-сторонние).

Другие запланированные анализы эффективности

Контролируемые вторичные конечные показатели (с контролем частоты ошибок I рода для множественности).

В дополнение к анализам основного и главных вторичных конечных показателей будут выполнены следующие анализы эффективности.

1. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня SF-36 PCS на неделе 16 между группами лечения.
2. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня SF-36 MCS на неделе 16 между группами лечения.
3. Доля субъектов, достигших низкого уровня активности заболевания (частичная ремиссия ASA) на неделе 16, будут сравниваться и обобщаться между группами лечения.

4. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня ASQoL на неделе 16 между группами лечения.

5. Обобщение и сравнение данных об изменении относительно исходного уровня BASMI на неделе 16 между группами лечения.

Для контроля на множественность вышеуказанные анализы будут последовательно выполнять в вышеуказанном порядке, только если основные и главные вторичные конечные показатели достигнут статистической значимости. В противном случае будут приведены номинальные значения p .

Другие вторичные конечные показатели включают в себя

Приведенные ниже конечные показатели будут обобщены по группам лечения. Сводные данные будут представлены во времени до недели 52, если посещение для оценки конечного показателя не указано. Сравнения между группами лечения будут проводиться во время посещений перед и на неделе 16.

1. Обобщение данных о доле субъектов, которые достигли ответа ACR 20 на неделе 2, по группам лечения и сравнение между группами.

2. Доля субъектов, достигших ответов ASAS 20 и ASAS 40.

3. Доля субъектов, которые достигли низкой активности заболевания (частичная ремиссия ASA).

4. Изменение базового уровня BASFI.

5. Изменение BASMI относительно исходного уровня.

6. Изменение относительно исходного уровня показателя PCS и показателя MCS SF-36.

7. Доля субъектов, достигших балла BASDAI <3 .

8. Изменение ASDAS относительно исходного уровня.

9. Доля субъектов, которые достигли существенного улучшения ASDAS (снижение $\geq 2,0$).

10. Доля субъектов, которые достигли неактивного заболевания ASDAS ($<1,3$).

11. Изменение относительно исходного уровня оценки энтезита у субъектов с энтезитом на исходном уровне и доля субъектов с энтезитом.

12. Изменение показателей ASQoL относительно исходного уровня.

Критерии для конечных показателей

Исследование будет считаться положительным, если доля субъектов с ASAS 20 на неделе 16 будет статистически значимо выше в группе голимумаба по сравнению с группой плацебо.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИССЛЕДУЕМОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ

Физическое описание исследуемого лекарственного средства

Голимумаб

Конечный продукт во флаконе (FVP) голимумаб 50 мг для в/в введения поставляется в виде стерильного раствора для однократного применения, содержащего IgG CNTO 148, во флаконе из стекла типа I объемом 4 мл. В каждом флаконе содержится

4 мл раствора голимумаба 12,5 мг/мл в водной среде с содержанием гистидина, сорбита и полисорбата 80 при pH 5,5. Консерванты отсутствуют.

Плацебо

Нормальный физиологический раствор будет поставляться в виде стерильной жидкости для в/в инфузии в одноразовых инфузионных мешках. Консерванты отсутствуют.

Подготовка, обращение и хранение

В исследовательском центре флаконы с раствором голимумаба необходимо хранить в защищенном холодильнике при температуре от 2°C до 8 °C (от 35,6 °F до 46,4 °F) без замораживания и в защищенном от света месте. Следует избегать энергичного встряхивания продукта. Перед введением продукт следует визуально проверить на наличие частиц и изменение цвета. Если в растворе наблюдается изменение цвета, видимые частицы или другие инородные частицы, продукт не следует использовать.

Исследуемый агент в стеклянных флаконах будет готов к применению. Внутривенные инфузии исследуемого агента будут подготовлены фармацевтом или другим соответствующим образом лицензированным и уполномоченным персоналом, которому будет известна информация о назначенном лечении, в соответствии с весом субъекта. Фармацевт или другой соответствующим образом лицензированный и уполномоченный персонал подготовит необходимый объем исследуемого агента с использованием соответствующего числа флаконов.

Во время подготовки и введения исследуемого материала необходимо использовать асептические процедуры. Во время подготовки и введения следует избегать воздействия прямых солнечных лучей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОД

Результаты до 28 недели по безопасности и эффективности внутривенного введения голимумаба у взрослых пациентов с активным анкилозирующим спондилитом:

Введение.

GO-ALIVE - это многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3, предназначенное для оценки безопасности и эффективности внутривенного введения голимумаба у взрослых пациентов с активным AS. Пациенты (возраст ≥ 18 лет) имели диагноз определенного AS (согласно модифицированным критериям Нью-Йорк), а BASDAI ≥ 4 , шкала визуальных аналогов боли в спине ≥ 4 и CRP $\geq 0,3$ мг/дл. Пациентов рандомизировали (1:1) для в/в введения голимумаба в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4, а затем каждые 8 недель или плацебо на неделях 0, 4 и 12 с переходом на голимумаб на неделе 16. У до 20% пациентов могли бы иметься предшествующие агенты антител к ФНО-альфа (отличные от голимумаба), а у до 10% пациентов мог быть полный анкилоз позвоночника. Основным конечным показателем был ответ ASAS20 на неделе 16. Основными вторичными конечными точками были ASAS40, BASDAI50 и изменение балла BASFI на неделе 16. Другими статистически управляемыми оценками были BASMI, ASA частичная ремиссия, SF-36

PCS/MCS и ASQoL. Пациентов контролировали на предмет неблагоприятных последствий, и данные, полученные на протяжении недели 28, представлены в настоящем документе. Все исследователи и некоторые спонсоры будут оставаться незащищенными от назначения групп лечения к концу исследования (неделя 60); таким образом, в настоящем документе не приводятся отнесения к группам лечения отдельных пациентов.

Результаты:

Рандомизировали 208 пациентов и получали исследуемый агент (плацебо: 103; голимумаб: 105). Исходные демографические характеристики и характеристики заболевания были сходными в группах лечения. 78% пациентов были мужчинами, средний возраст составлял 39 лет; средняя продолжительность заболевания составляла 5,5 года, 89,9% были HLA-B27-положительными, 5,8% имели полный анкилоз позвоночника, 14,4% использовали ранее антитело к ФНО. На неделе 16 значительно более высокие доли пациентов с голимумабом по сравнению с плацебо имели ответы ASAS20 (73,3% по сравнению с 26,2%), ASAS40 (47,6% по сравнению с 8,7%) и BASDAI 50 (41,0% по сравнению с 14,6%) (все $p < 0,001$; Таблица). Снижение BASFI также было значительно выше при использовании голимумаба. Улучшения в SF-36 PCS/MCS и ASQoL были значительно выше в группе, получавшей голимумаб, по сравнению с плацебо на неделе 16. ASAS20 был значимо выше при использовании голимумаба по сравнению с плацебо уже на неделе 2 (37,1% и 19,4%; $p = 0,005$). Ответы в группе голимумаба сохранялись на протяжении недели 28. У пациентов с плацебо, скрещивавших с голимумабом, на неделе 16, наблюдали улучшения клинического ответа на этапе неделя 20, которые поддерживали на неделе 28. До недели 16 у 23,3% пациентов, получавших голимумаб, и 32,4% пациентов, получавших плацебо, было ≥ 1 НЯ; Инфекции были наиболее распространенными НЯ (плацебо, 7,8%; голимумаб, 11,4%). До недели 28, 34,8% всех пациентов, получавших лечение голимумабом, имели ≥ 1 АЕ; наиболее распространенным является назофарингит (5,4%). Два пациента (1,0%) имели СНЯ (панкреатит, $n=1$; пневмония, $n=1$). В течение недели 28 не наблюдалось оппортунистических инфекций, злокачественных опухолей или смертей, и скорость инфузионных реакций была низкой (1,4%). 3 пластинки имели 4 реакции; ни одна из них не была серьезной или тяжелой.

Вывод.

2 мг/кг в/в голимумаба были эффективны для уменьшения признаков и симптомов по сравнению с плацебо. Голимумаб также хорошо переносился до недели 28, и профиль безопасности был согласован с другими видами терапии к ФНО, включая п/к введение голимумаба.

Таблица 8: Клинический ответ

Эффективность на неделе 16.		
	Плацебо	Голимумаб 2 мг/кг
Рандомизированные пациенты, n	103	105
<u>Клиническая эффективность</u>		
ASAS20, n (%)	27 (26,2%)	77 (73,3%)**

ASAS40, n (%)	9 (8,7%)	50 (47,6%)**
BASDAI 50, n (%)	15 (14,6%)	43 (41,0%)**
Изменение относительно исходного уровня BASFI		
n	98	105
среднее (SD)	-0,5 (2,0)	-2,4 (2,1)**
ASA, частичная ремиссия, n (%)	4 (3,9%)	17 (16,2%)*
Изменение относительно исходного уровня BASMI (линейное)		
n	96	100
среднее (SD)	-0,1 (0,5)	-0,4 (0,6)**
<u>Связанное со здоровьем качество жизни</u>		
Изменение относительно исходного уровня балла по SF-36 PCS		
n	98	104
среднее (SD)	2,9 (6,2)	8,5 (7,5)**
Изменение относительно исходного уровня балла по SF-36 MCS		
n	98	104
среднее (SD)	0,8 (10,0)	6,5 (9,1)**
Изменение относительно исходного уровня ASQoL		
n	98	104
среднее (SD)	-1,8 (4,6)	-5,4 (5,0)**
*p < 0,01; **p ≤ 0,001. ASAS20/40, ≥20% /40% улучшение в отношении ASSING по критериям Международной рабочей группы по контролю за животными (ASA); ASQoL - анкилозирующий показатель жизни спондилита; BASDAI Батский показатель активности анкилозирующего спондилита BASFI, функциональный индекс черного анкилозирующего спондилита; BASMI, показатель анкилозирующего спондилита в крови; СО - среднее квадратичное отклонение; SF-36 PCS/MCS - общий показатель физического/психического компонента по краткому опроснику для оценки состояния здоровья из 36 пунктов		

Таблица 9: Число субъектов с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3) на неделе 28; полная выборка для анализа

	Плацебо	Голимуаб 2 мг/кг
Популяция анализа: полная выборка для анализа	103	105
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 2 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	0	10 (9,5%)
% различия (95% CI) ^b		9,6 (3,93, 15,19)
p-значение ^c		0.001

	Плацебо	Голимуаб 2 мг/кг
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 4 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	0	15 (14,3%)
% различия (95% ДИ) ^b		14,3 (7,60, 21,00)
р-значение ^c		< 0,001
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 8 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	3 (2,9%)	22 (21,0%)
% различия (95% ДИ) ^b		18,1 (9,66, 26,51)
р-значение ^c		< 0,001
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 12 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	1 (1,0%)	20 (19,0%)
% различия (95% ДИ) ^b		18,1 (10,34, 25,83)
р-значение ^c		< 0,001
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 16 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	3 (2,9%)	29 (27,6%)
% различия (95% ДИ) ^b		24,8 (15,62, 33,90)
р-значение ^c		< 0,001
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 20 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	29 (28,2%)	30 (28,6%)
Субъекты, способные оценивать неактивное заболевание ASDAS (<1,3) на 28 ^а неделе	103	105
Субъекты с неактивным заболеванием ASDAS (<1,3)	24 (23,3%)	31 (29,5%)
^a неактивное заболевание ASDAS (<1,3) основано на импортированных данных с использованием неудачной терапии (только до недели 16) и LOCF - на недостающих данных. ^b Доверительный интервал основан на статистическом контроле Вальда для использования MTX на исходном уровне (да, нет). ^c р-значение основано на контроле по критерию СМН для использования MTX на исходном уровне (да, нет).		

Влияние внутривенного лимумаба, моноклонального антитела к -ФНО-α, на

здоровое качество жизни пациентов с анкилозирующим спондилитом: 1-летние результаты исследования фазы III GO-ALIVE

Предпосылки создания изобретения/цель:

У пациентов с анкилозирующим спондилитом (AS) внутривенное введение антитела к ФНО α голимумаба (GLM-IV) приводило к улучшению комбинированных показателей различных аспектов заболевания (например, процент ответа ASA, BASDAI и BASFI), которые были больше, чем плацебо (PBO), на неделе 16 или раньше в исследовании GO-ALIVE (Deodhar et al. *J Rheum.* 2018;45:341). Улучшения сохранялись до 1 года лечения (Reveille et al. *J Ривей.* 2019. DOI: 10,3899: jrheum.180718). В данном случае мы изучаем эффекты лечения на качество жизни, связанное с состоянием здоровья (HRQoL).

Способы.

Взрослых пациентов с определенными AS (в соответствии с модифицированными критериями NY), BASDAI ≥ 4 , общей боли в спине ≥ 4 , CRP $\geq 0,3$ мг/дл и недостаточным ответом на НПВС рандомизировали на GLM-IV 2 мг/кг на неделях 0 и 4, затем каждые 8 недель или на PPBO на неделях 0 и 4 и GLM-IV на неделях 16 и 20, а затем каждые 8 недель. Стабильные дозы метотрексата (≤ 25 мг/неделя), сульфасалазина, гидроксихлорохина, НПВС, других анальгетиков и низких доз кортикостероидов для перорального введения допускали для пациентов, получавших эти лекарственные средства на исходном уровне. Показатели HRQoL включали в себя анкилозирующую оценку качества жизни анкеты спондилита (ASQoL), сводные показатели коротких физических и психических компонентов формы 36 (SF-36 PCS/MCS), шкалу спящего сна медицинских результатов (MOS-SS) и визуальную аналоговую шкалу EuroQoL (EQ VAS), каждую из которых измеряют на 16, 28 и 52 неделях. Представленные Р-значения являются номинальными и не скорректированными для множественности.

Результаты:

При первой оценке (неделя 8) пациенты, получавшие GLM IV, имели значительно более высокие улучшения относительно исходного уровня, чем пациенты, получавшие PBO в измерениях HRQoL; SF-36 PCS; SF-36 MCS; MOS-SS; и EQ VAS (таблица 10). На неделе 16 пациенты, получавшие GLM-IV, также имели более высокие улучшения относительно исходного уровня HRQoL, чем пациенты, получавшие PBO в каждом измерении соответственно (ASQoL, -5,4 против -1,8; SF-36 PCS, 8,5 против 2,9; SF-36 MCS, 6,5 по сравнению с 0,78; MOS-SS, 6,6 против 2,5; и EQ VAS, 20,3 против 4,8; все $p < 0,001$), см. таблицу 10. Изменения относительно исходного уровня сохранялись до недели 52 у пациентов, рандомизированных в группы GLM-IV. Пациенты, переведенные с PBO на GLM IV на 16 неделе, продемонстрировали улучшение относительно исходного уровня к 28 неделе, которое сохранялось до 52-й недели и было схожим с таковым у пациентов, получавших GLM IV на исходном уровне (таблица).

Вывод.

Улучшения HRQoL у пациентов с активностью, получавших GLM-IV, были

значительно выше, чем У PBO на неделе 8, и сохранялись до недели 52. У пациентов, переключающихся с PBO на GLM-IV на неделе 16, наблюдались улучшения HRQoL на неделе 28 и сохранялись улучшения до недели 52 на уровнях, сходных с уровнями у пациентов, изначально рандомизированных на GLM-IV.

Таблица 10: Изменения относительно исходного уровня измерений HR-QoL с недели 8 до недели 52 в рандомизированном исследовании фазы 3 у пациентов с анкилозирующим спондилитом

	GLM 2 мг/кг			PBO неделя 24 перекрестно GOL 2 мг/кг □		
	n	Показатель исходного уровня	Изменение относительно исходного уровня (среднее ± SD)	N	Показатель исходного уровня	Изменение относительно исходного уровня (среднее ± SD)
AS QoL						
Исходный уровень	104	12,8 ± 4,04		102	12,4 ± 4,1	
Неделя 8	104		-4,5 ± 4,7* ^f	102		1,5 ± 3,9
Неделя 16	104		-5,4 ± 5,0*	102		-1,8 ± 4,6
Неделя 28	104		-5,3 ± 5,2	102		-5,3 ± 4,8
Неделя 52	104		-5,5 ± 5,3	102		-5,4 ± 5,3
SF-36 PCS						
Исходный уровень	104	32,4 ± 5,6		102	32,1 ± 5,9	
Неделя 8	104		6,8 ± 6,9* ^f	102		2,1 ± 5,7
Неделя 16	104		8,5 ± 7,5*	102		2,9 ± 6,2
Неделя 28			9,1 ± 8,0	102		9,3 ± 7,1
Неделя 52	104		9,5 ± 8,8	102		9,7 ± 8,1
SF-36 MCS						
Исходный уровень	104	40,0 ± 10,4		102	41,9 ± 10,2	
Неделя 8	104		5,6 ± 9,3* ^f	102		1,7 ± 8,8
Неделя 16	104		6,5 ± 9,1*	102		0,78 ± 10,0
Неделя 28	104		6,2 ± 10,9	102		5,6 ± 9,7
Неделя 52	104		7,3 ± 10,6	102		5,1 ± 11,9
MOS-SS						
Исходный уровень	104	40,2 (7,8)		102	39,5 (8,3)	
Неделя 8	104		5,1 ± 7,9* ^f	102		1,7 ± 7,4
Неделя 16	104		6,6 ± 7,2* ^f	102		2,5 ± 8,2
Неделя 28	104		6,6 ± 8,1	102		5,9 ± 8,3
Неделя 52	104		6,9 ± 8,6	102		6,8 ± 9,2
VAS						

Исходный уровень	104	41,6 ± 22,7		102	41,3 ± 18,1	
Неделя 8	104		17,6 ± 24,0* [†]	99		6,6 ± 19,9
Неделя 16	104		20,3 ± 24,6* [†]	98		4,8 ± 23,5
Неделя 28	102		20,5 ± 27,9	97		22,5 ± 23,1
Неделя 52	101		21,9 ± 26,8	95		24,3 ± 23,7

* Р по сравнению с плацебо < 0,001. значения [†]Р являются номинальными и не скорректированными для мультиплетности.

Результаты ASQoL и SF-36 рассчитывали с использованием статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений. Результаты MOSS-SS и EQ VAS рассчитывали с использованием ковариационной модели анализа.

ASQoL=анкилозирующее качество спондилита Life EQ VAS= анкеты EuroQol-5D, визуальная шкала аналогов; HRQoL - связанное со здоровьем качество жизни; SF-36 PCS/MCS=сводные данные по физическому/медицинскому компоненту для формы-36

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 8-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

2. Способ по п. 1, в котором указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL = $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS = $8,5 \pm 7,5$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS = $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS = $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS = $20,3 \pm 24,6$ SD.

3. Способ по п. 1, которую вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

4. Способ по п. 3, дополнительно включающий введение указанной композиции с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без него.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной

гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

6. Композиция для применения в способе лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, где способ включает введение пациенту композиции, содержащей антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 8-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

7. Композиция по п. 6, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL = $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS = $8,5 \pm 7,5$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS = $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS = $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS = $20,3 \pm 24,6$ SD.

8. Композиция по п. 6, которую вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (один раз в 8 недель) после этого.

9. Композиция для применения в способе по п. 8, где способ дополнительно включает введение указанной композиции с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без него.

10. Композиция для использования по любому из методов по п. 6, в которой лечение дополнительно включает введение перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического

средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

11. Способ лечения активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение пациенту антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 8-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

12. Способ по п. 11, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL = $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS = $8,5 \pm 7,5$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS = $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS = $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS = $20,3 \pm 24,6$ SD.

13. Способ по п. 11, в котором указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят посредством внутривенной инфузии (в/в) так, что указанное антитело к ФНО антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (q8w) после этого.

14. Способ по п. 13, дополнительно включающий введение указанного антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента с метотрексатом (MTX), сульфасалазином

(SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без него.

15. Способ по п. 11, дополнительно включающий введение перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

16. Антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении активного анкилозирующего спондилита у пациента, включающий введение антитела к ФНО в клинически подтвержденном безопасном и клинически подтвержденном эффективном количестве, где антитело к ФНО содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. и при этом пациент отвечает на лечение и идентифицируется как имеющий статистически значимое улучшение активности заболевания на 8-й неделе лечения по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, где улучшение сохраняется или улучшается до недели 52 лечения, и при этом указанная активность заболевания определяется по ответу, выбранному из группы, состоящей из: среднее изменение качества жизни анкилозирующего спондилита относительно исходного уровня (AS QoL), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке физических компонентов (SF-36 PCS), среднее изменение по сравнению с исходным уровнем в сводке целевых компонентов Short-Form-36 (MCS SF-36), среднее изменение относительно исходного уровня в статистической модели смешанных эффектов для повторных измерений (MOS-SS) и среднее изменение относительно исходного уровня по визуальной аналоговой шкале EuroQol-5D (EQ-VAS).

17. Антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, где указанное статистически значимое улучшение активности заболевания на неделю 16 лечения выбрано из группы, состоящей из: среднее изменение относительно исходного уровня AS QoL = $-5,4 \pm 5,0$ стандартное отклонение (SD), среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 PCS = $8,5 \pm 7,5$ CO, среднее изменение относительно исходного уровня SF-36 MCS = $6,5 \pm 9,1$ SD, среднее изменение относительно исходного уровня в MOS-SS = $6,6 \pm 7,2$ SD и среднее изменение относительно исходного уровня в EQ-VAS = $20,3 \pm 24,6$ SD.

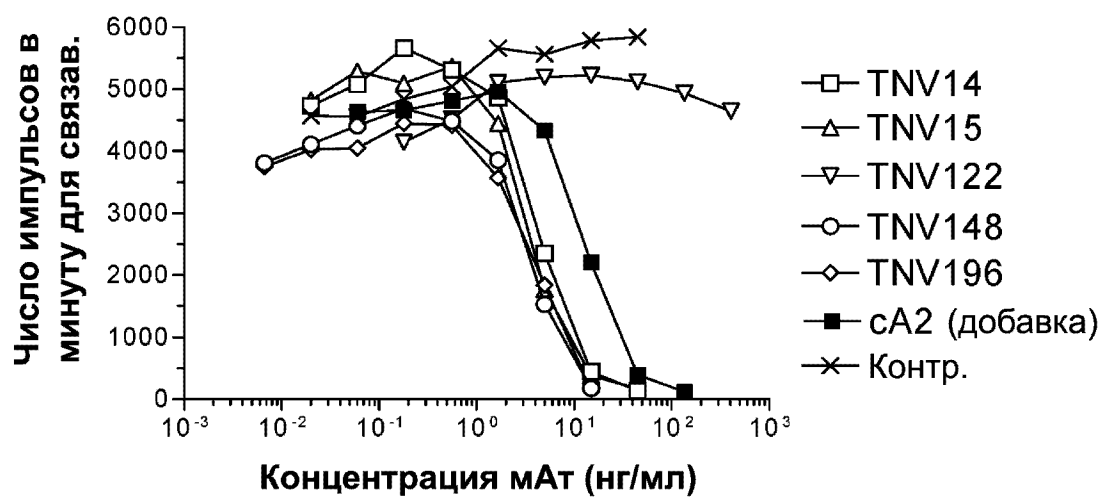
18. Антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, где указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят посредством внутривенной инфузии (IV) так, что указанное антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 2 мг/кг, вводят в течение 30 ± 10 минут, на 0 и 4 неделях, а затем каждые 8 недель (q8w) после этого.

19. Антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способе по п. 18, где способ дополнительно включает введение указанного антитела к ФНО или его антигенсвязывающего фрагмента с метотрексатом (MTX), сульфасалазином (SSZ) или гидроксихлорохином (HCTQ) или без них.

20. Антитело к ФНО или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способе по любому из пп. 16-19, в котором лечение дополнительно включает введение перед, одновременно или после указанного введения по меньшей мере одной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного из обнаруживаемой метки или репортера, антагониста ФНО, противоревматического средства, миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), обезболивающего средства, анестетического средства, седативного средства, местного анестетического средства, блокатора нервно-мышечного проведения, противомикробного средства, противопсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммуносупрессора, гормона роста, средства для заместительной гормональной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, психостимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингаляционного стероида, эпинефрина или аналога, цитокина или антагониста цитокина.

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2А

TNV	<u>ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGA</u>	
зародышевая	Q V Q L V E S G G G V	
линия	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG	
TNV	GGTGTCCAGTGT.....	
TNV148 (B)	GGTGTCCAGTGT.....A.....	
germline	V Q P G R S L R L S C A A S G	
TNV	GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA	
		
зародышевая	F T F S <u>S Y A M H</u> W V R Q A P	
линия	TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA	
TNV14,15		
TNV148 (B)	T.....	
TNV196	C.....	
зародышевая	G K G L E W V A <u>V I S Y D G S</u>	
линия	GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC	
TNV14	A....C.T.....T	
TNV15	T.....T.....T	
TNV148 (B)	C.....T....G.....	
TNV196	T.....	
зародышевая	<u>N K Y Y A D S V K G</u> R F T I S	SEQ ID NO:7
линия	AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC	SEQ ID NO:34
TNV14	.GC...A.G.....G.....A.....	
TNV15	..C...A.G.....C.....	
TNV148 (B)	A.G.....	
TNV196	A.G.C.....G.....	

ФИГ. 2В

зародышевая	R D N S K N T L Y L Q M N S L	
линия	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG	
TNV14		
TNV15	G.....	
TNV148	C.....	
TNV148B		
TNV196	T.....	
зародышевая	R A E D T A V Y Y C A R	
линия	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
TNV14, 15	GATCGAGGT	
TNV148 (B)	A	
TNV196	T.....	
зародышевая	<u>Y Y Y Y Y G M D V W</u>	
линия	ТАСТАСТАСТАСТАСГГТАТГГАСГТСТГГ	
TNV14	АТАСГАСГАГГТГГАА.....	
TNV15	G.C.....A.T..T.....	
TNV148 (B)	...G.....A.....	
TNV196	..TGG.....A.....	
зародышевая	G Q G T T V T V S S	SEQ ID NO:7
линия	GGGCAAGGGACCAACGGTCACCGTCTCCTCAG	SEQ ID NO:34
TNV14	..C.....	
TNV15	..C.....	
TNV148 (B)	..C.....	
TNV196	..C..G.....	

ФИГ. 3

TNV	<u>ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC</u>	
зародышевая линия	E I V L T Q S P A T	
TNV	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC CCAGATAACCACCGA.....	
зародышевая линия	L S L S P G E R A T L S C <u>R A</u>	
TNV	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC	
зародышевая линия	<u>S Q S V S S Y L A</u> W Y Q Q K P	
TNV14, 15	AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT	
TNV148, 196	TA.....	
зародышевая линия	G Q A P R L L I Y <u>D A S N R A</u>	
TNV	GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC	
зародышевая линия	<u>T</u> G I P A R F S G S G S G T D	
TNV	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC	
зародышевая линия	F T L T I S S L E P E D F A V	
TNV	TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT	
зародышевая линия	Y Y C <u>Q Q R S N W P P F T</u> F G	SEQ ID NO:8
TNV	TATTA CTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTTCGGCA.....	SEQ ID NO:35
зародышевая линия	P G T K V D I K R	
TNV	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT	

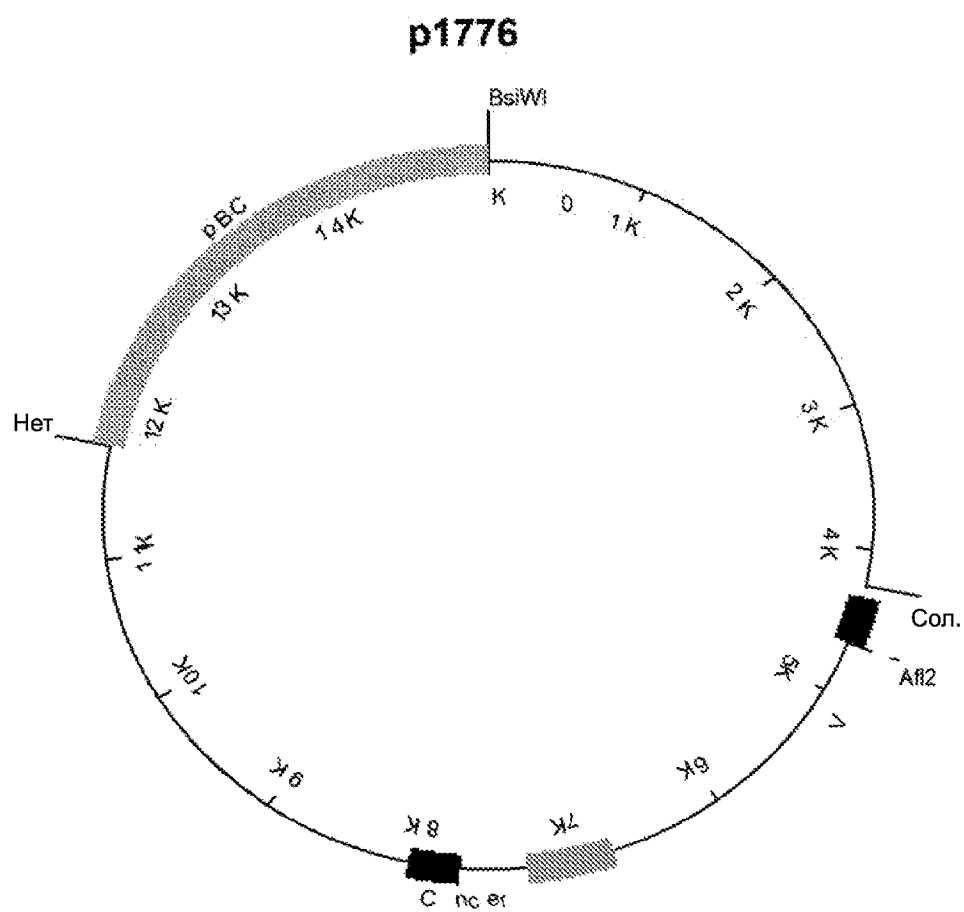
ФИГ. 4

зародышевая			
линия	<u>MGFGLSWVFLVALLRGVQC</u>	сигнальн.	SEQ ID NO: 32
TNV			
зародышевая			
линия	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS	FR1	SEQ ID NO: 7
TNV			
TNV148 (B)	I..		
зародышевая			
линия	SYAMH	CDR1	SEQ ID NO: 1
TNVs			
зародышевая			
линия	WVRQAPGKGLEWVA	FR2	SEQ ID NO: 7
TNV			
TNV148 (B)	N.....		
зародышевая			
линия	VISYDGSNKYYADSVKG	CDR2	SEQ ID NO: 2
TNV14	I.L....S.K.....D		
TNV15	F.L....K.....		
TNV148 (B)	FM.....K.....		
TNV196	F.....KS.....		
зародышевая			
линия	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	FR3	SEQ ID NO: 7
TNV14			
TNV15	A.....		
TNV148	P.....		
TNV148B			
TNV196	...V.....F.....F....		
зародышевая			
линия	-----YYYYYGMDV		
TNV14	DRGISAGGN.....	CDR3	SEQ ID NO: 3
TNV15	...V...N.....		
TNV148 (B)	...A...N.....		
TNV196	...G...N.....		
зародышевая			
линия	WGQGTTVTVSS	J6	SEQ ID NO: 7
TNV			

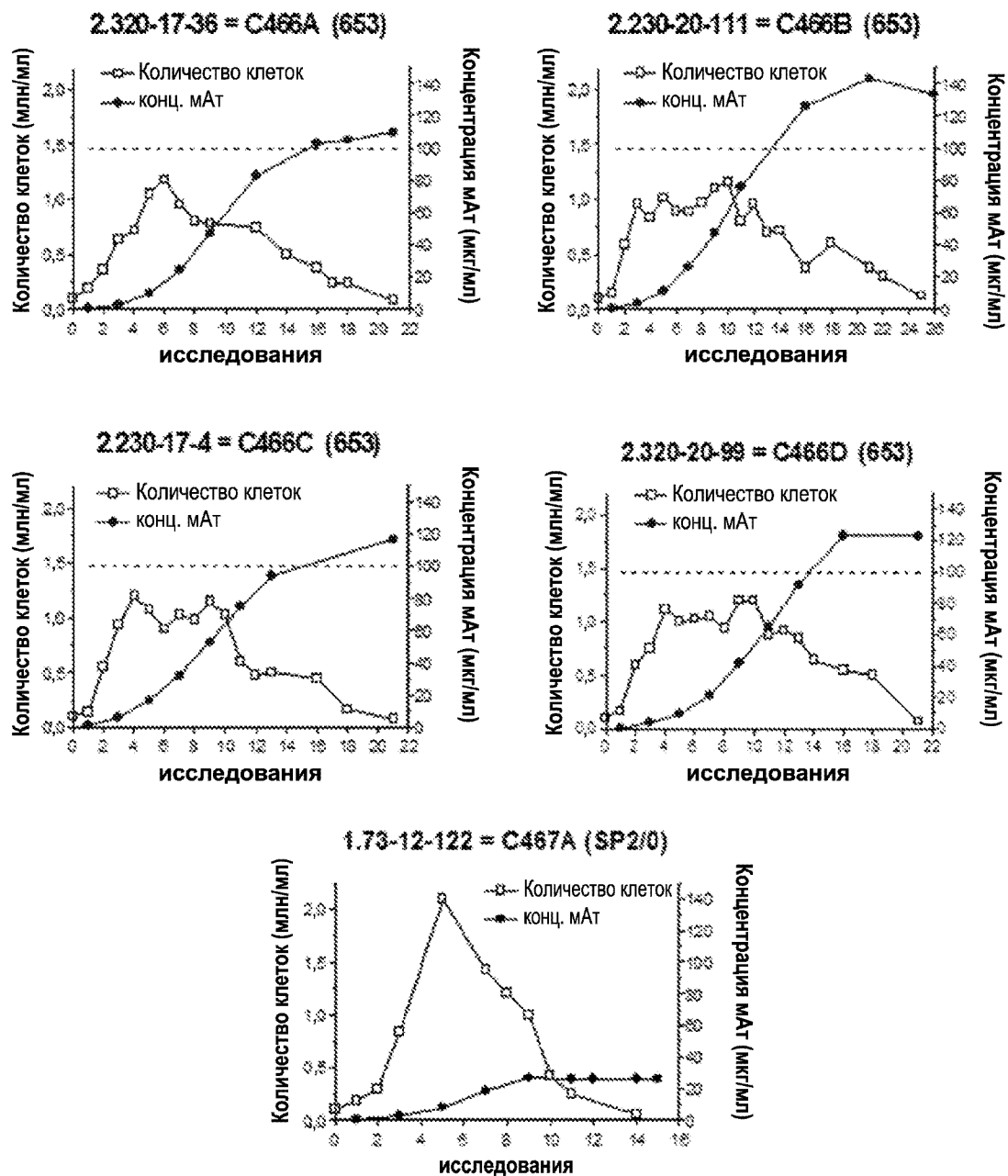
ФИГ. 5

TNV	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	СИГНАЛЬН. SEQ ID NO: 33
зародышевая линия TNV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1 SEQ ID NO: 8
зародышевая линия TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	RASQSVSSYLAY.....Y.....	CDR1 SEQ ID NO: 4
зародышевая линия TNV	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2 SEQ ID NO: 8
зародышевая линия TNV	DASNRAT	CDR2 SEQ ID NO: 5
зародышевая линия TNV	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC	FR3 SEQ ID NO: 8
зародышевая линия TNV	QQRSNWPPFT	CDR3 SEQ ID NO: 6
зародышевая линия TNV	FGPGTKVDIK	J3 SEQ ID NO: 8

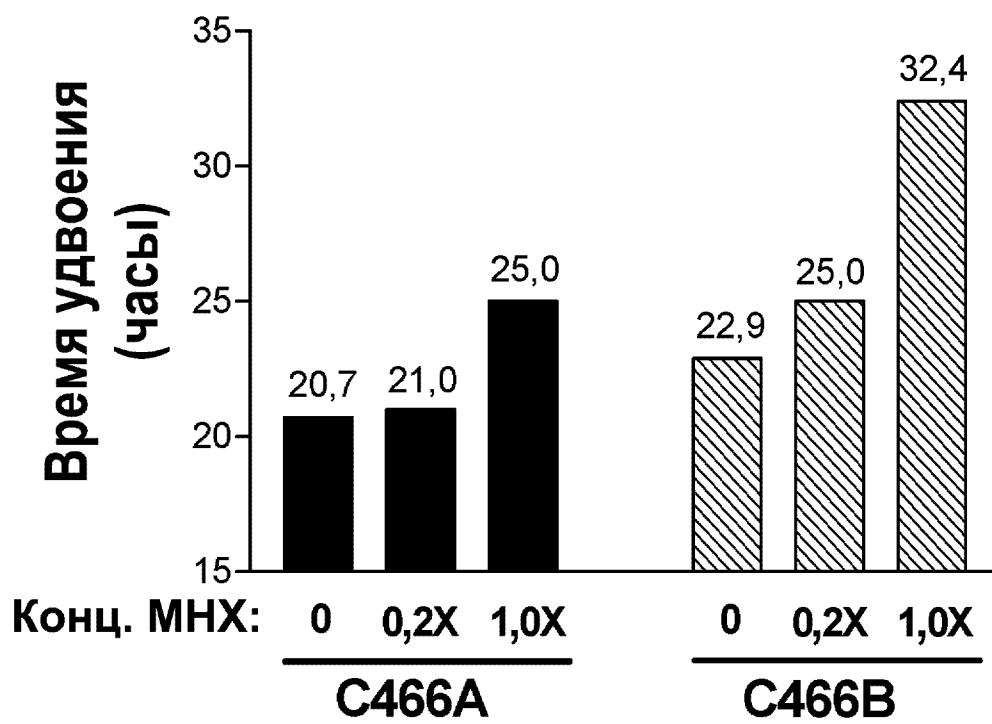
ФИГ. 6



ФИГ. 7

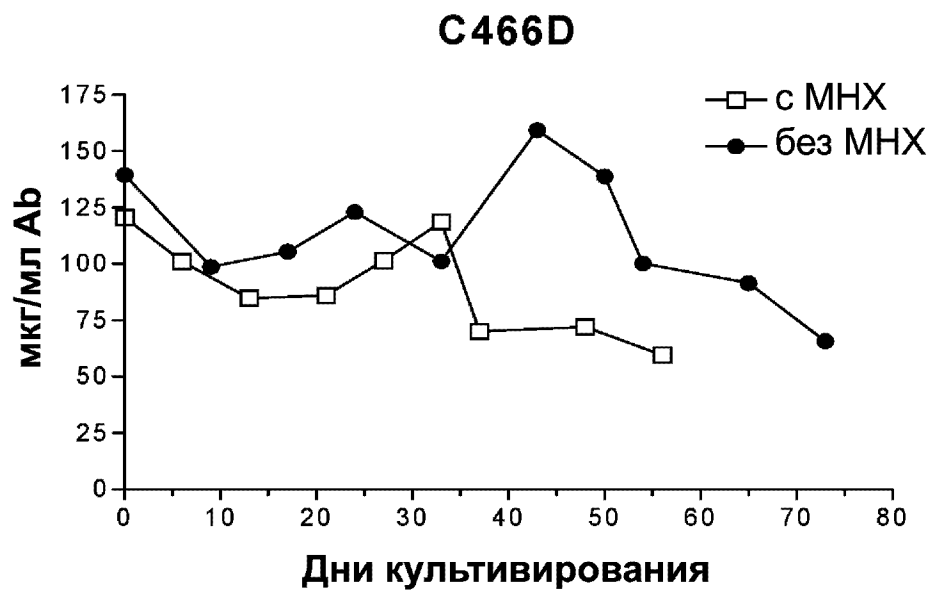
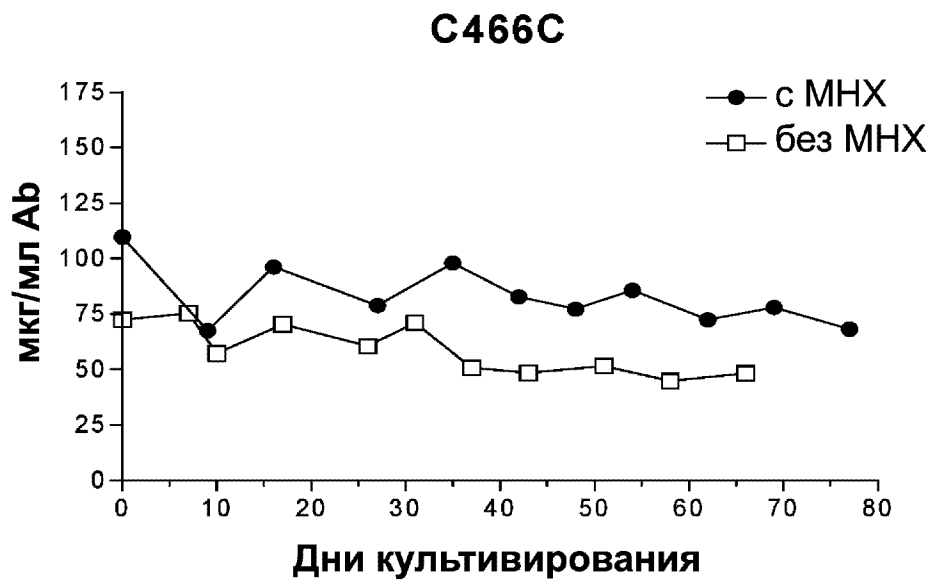


ФИГ. 8

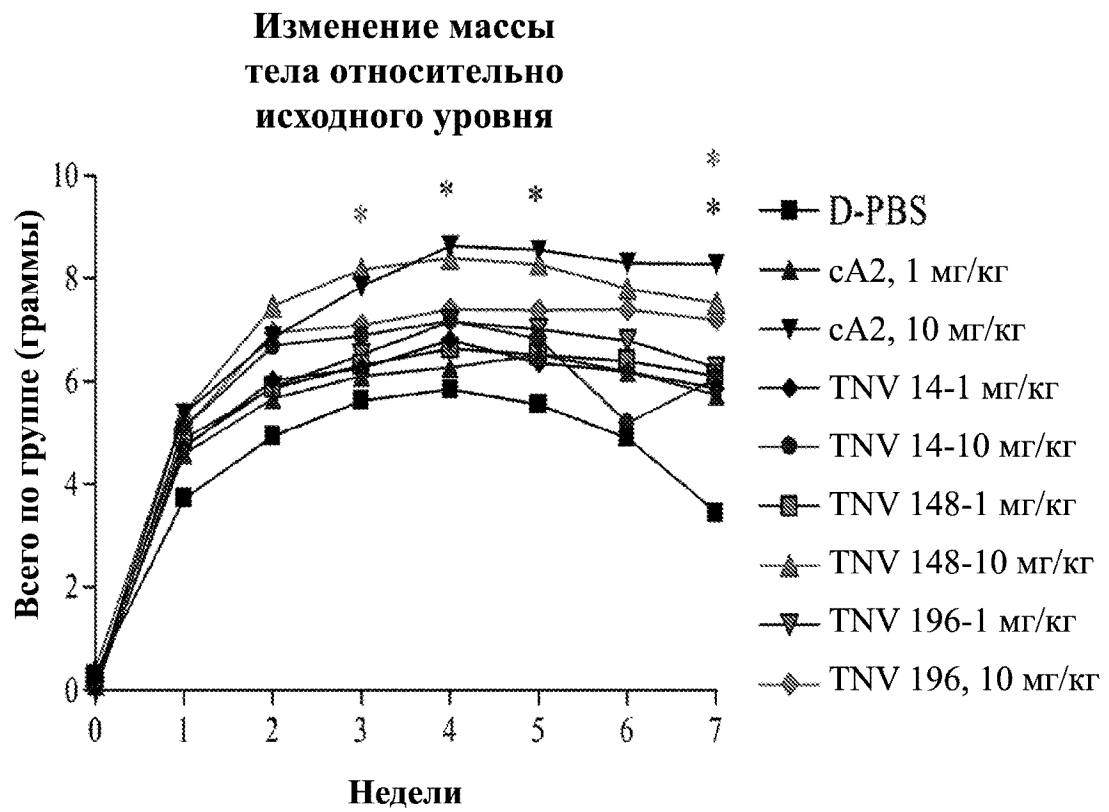


10/19

ФИГ. 9

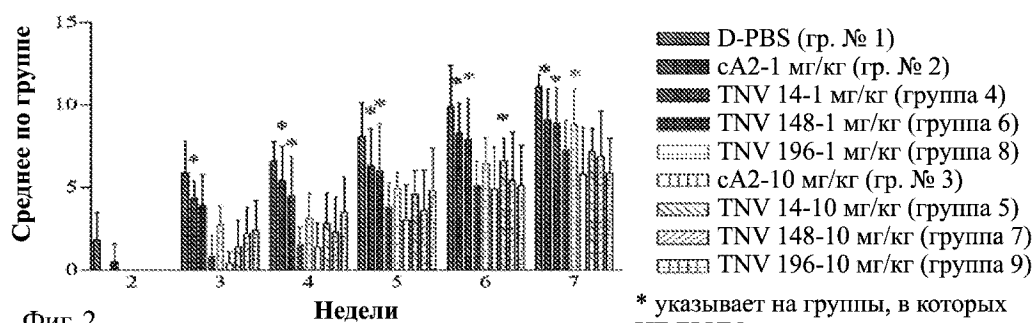


ФИГ. 10



ФИГ. 11А

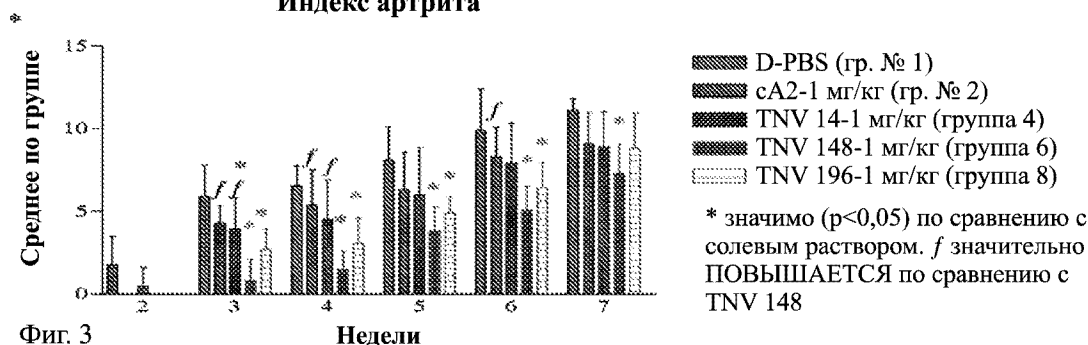
Индекс артрита



Фиг. 2

ФИГ. 11В

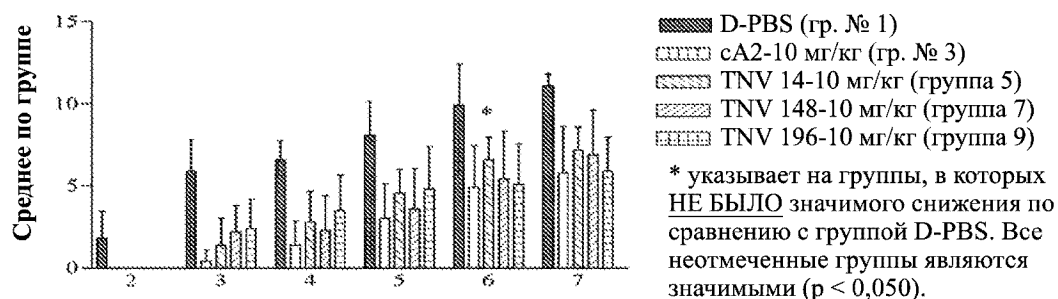
Индекс артрита



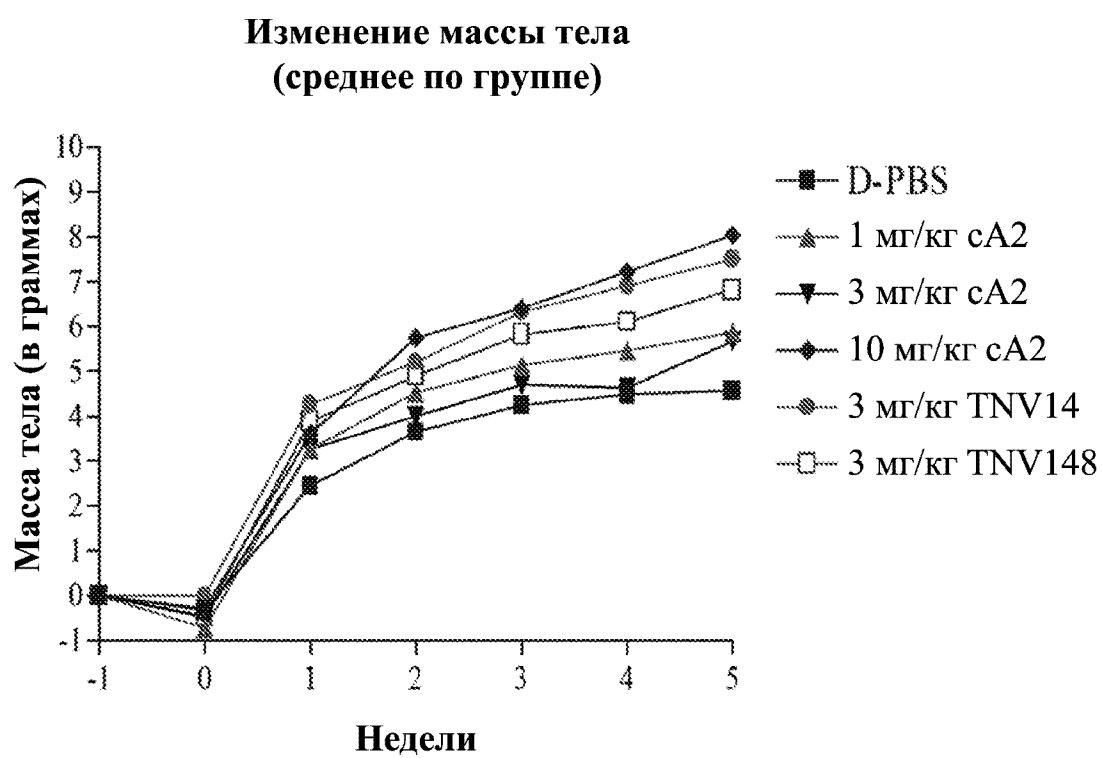
Фиг. 3

ФИГ. 11С

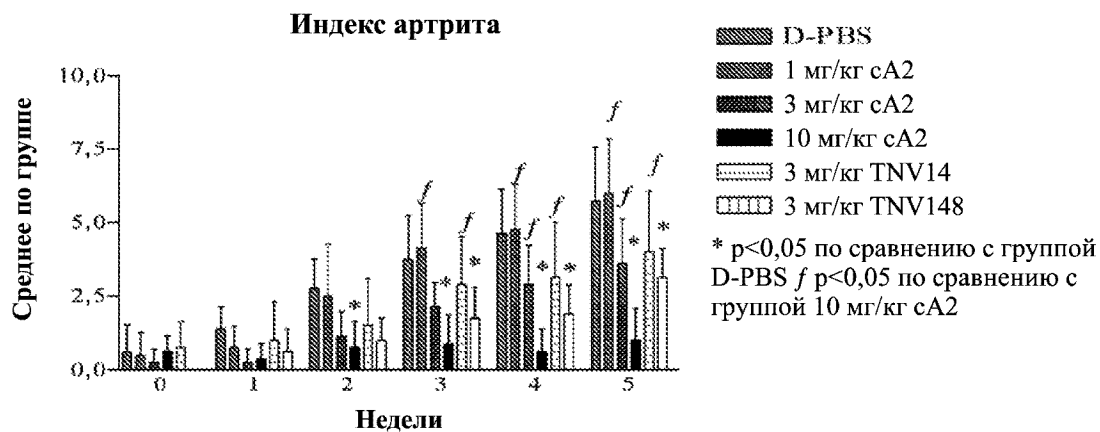
Индекс артрита



ФИГ. 12



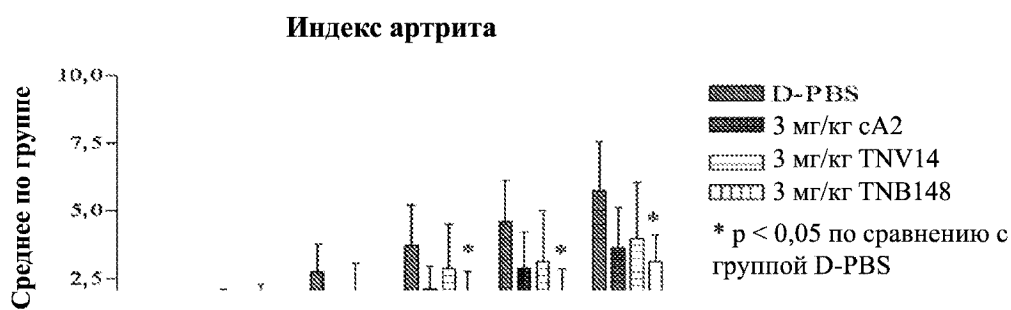
ФИГ. 13А



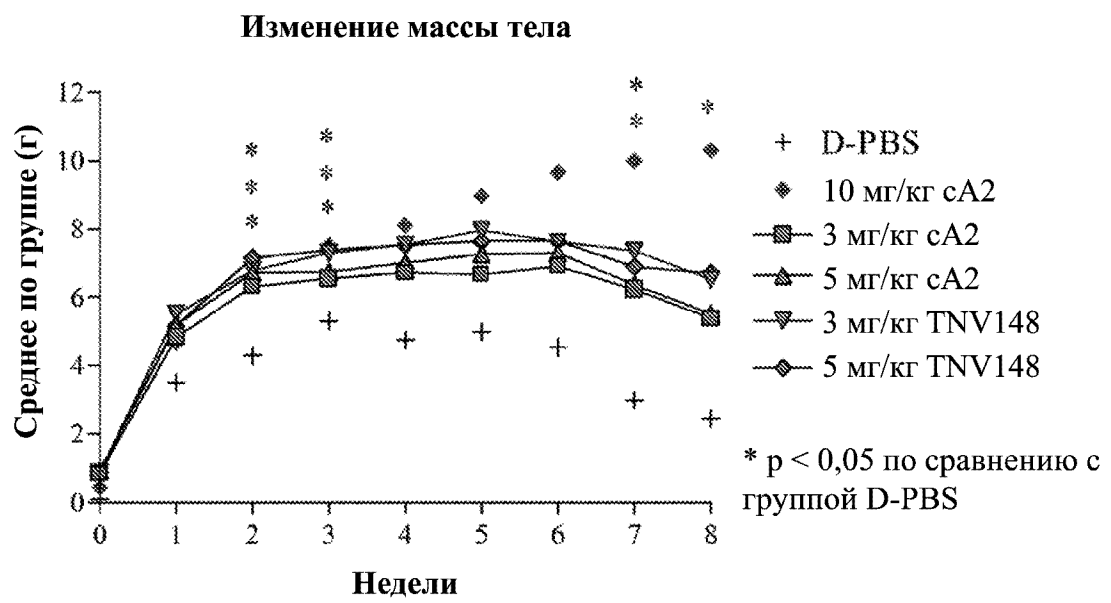
ФИГ. 13В



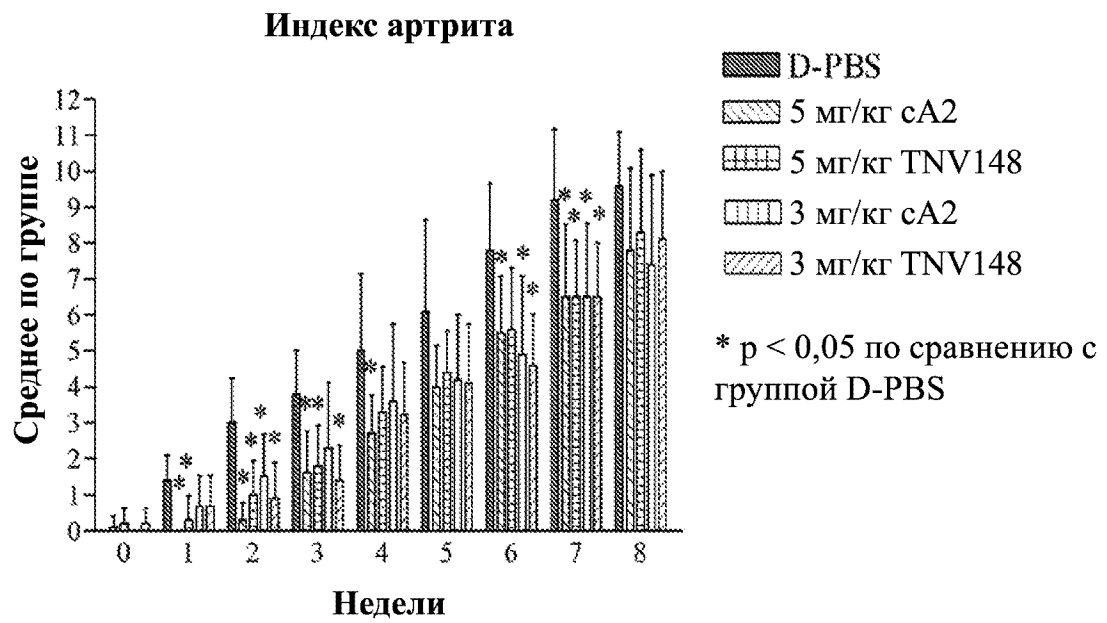
ФИГ. 13С



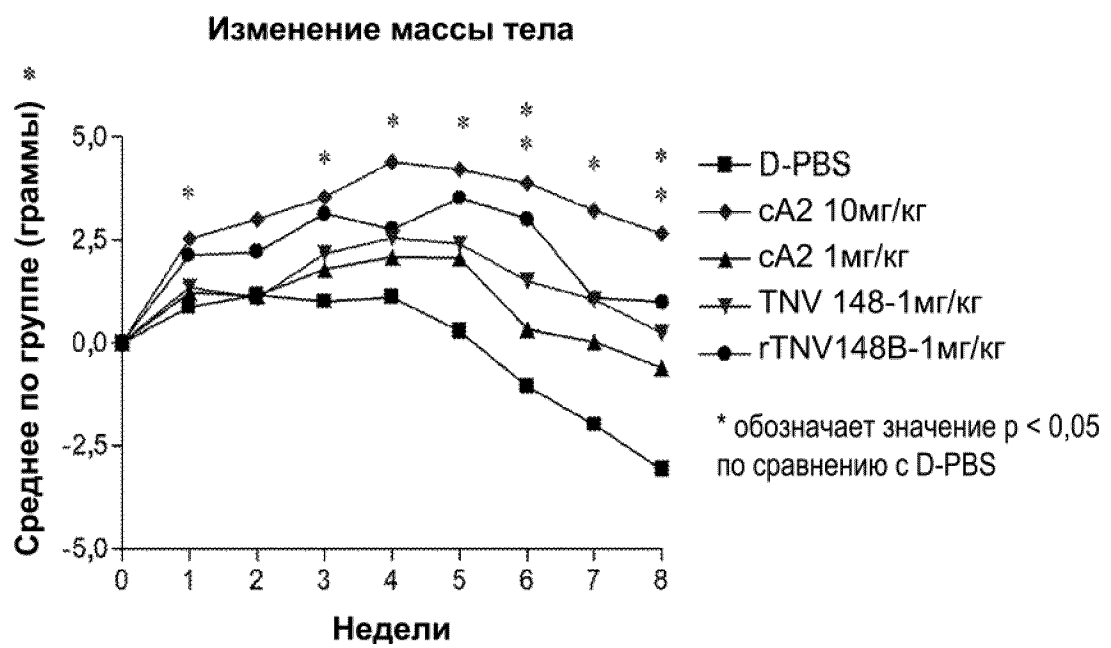
ФИГ. 14



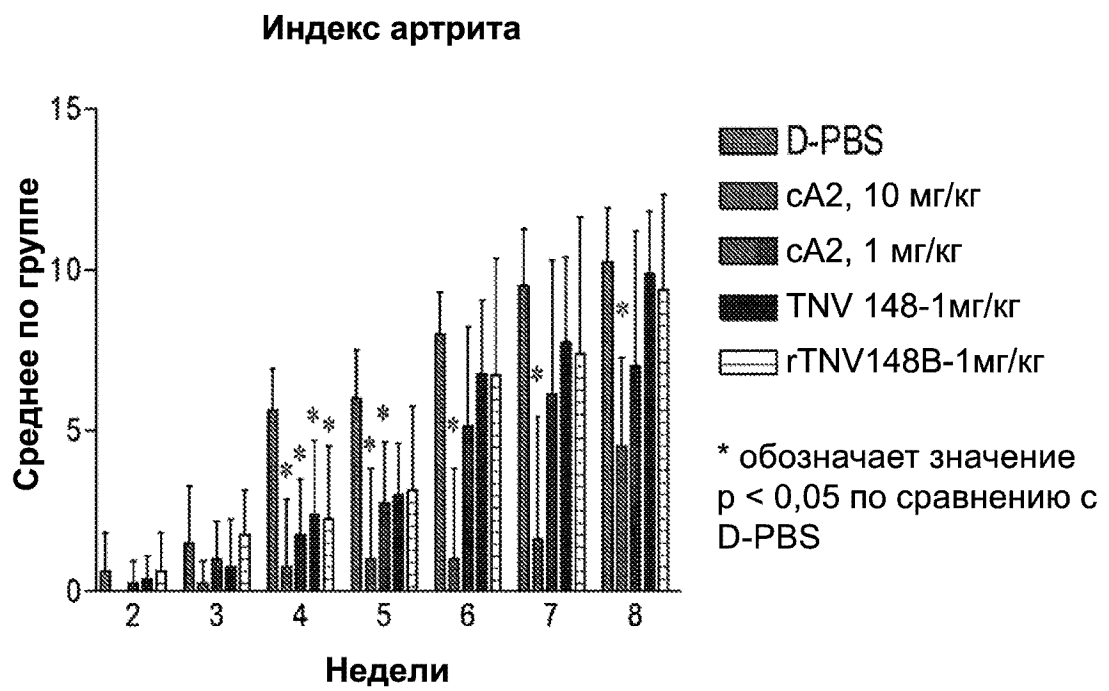
ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18

Схематический обзор исследования

