(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293062 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.17

(22) Дата подачи заявки
2021.04.26

(51) Int. Cl. ***C07K 16/24*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(54) МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

(31) **63/015,889; 63/015,894; 63/015,902**
(32) **2020.04.27**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2021/053429**
(87) **WO 2021/220140 2021.11.04**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Бенсли Карен, Кларк Майкл, Лой Джослин, Сюй Чжэньхуа (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям и способам, в которых используют антитела к ФНО, например антитело к ФНО голимумаб, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, для применения в лечении ювенильного идиопатического артрита (JIA), и в частности полиартикулярного ювенильного идиопатического артрита (pJIA).

202293062 A1

202293062 A1

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЮВЕНИЛЬНОГО ИДОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

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 в виде файла с именем JBI6307USNP1SeqListing.txt, созданного 20 апреля 2021 г., размером 25 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, в которых используют антитела к ФНО, например антитело к ФНО голимумаб, имеющее тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, для применения в лечении ювенильного идиопатического артрита (JIA), и в частности полиартикулярного ювенильного идиопатического артрита (pJIA).

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 немоноцитарные 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. Раковые пациенты страдают от потери веса, обычно обусловленной анорексией.

Обширное истощение, связанное с раком и другими заболеваниями, известно как «кахексия». Кахексия включает прогрессирующие снижение веса, анорексию и устойчивую потерю безжировой массы тела в ответ на появление злокачественного образования. Кахексическое состояние приводит к повышению онкологической заболеваемости и смертности. Существуют доказательства того, что ФНО-альфа играет роль 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 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 при ревматоидном артрите с подавлением воспаления.

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 ведения 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.

Химерные, поликлональные (например, антисыворотки) и/или моноклональные антитела (мАт) и их фрагменты (например, продукты протеолитического расщепления или полученные из них слитные белки) от не относящихся к человеку млекопитающих 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 неприемлемым для терапии, и тем самым снижать терапевтический эффект для пациента и ограничивать повторное введение антитела или фрагмента. Например, повторное введение антител или фрагментов, содержащих нечеловеческие участки, может привести к 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.

В связи с необходимостью создания ингибиторов ФНО, преодолевающих одну или более из этих проблем, были разработаны представленные в настоящее время на рынке антитела к ФНО и другие ингибиторы ФНО, например, антитела к ФНО, такие как REMICADE® (инфликсимаб), HUMIRA® (адалимумаб) и SIMPONI® (голимумаб). Другие ингибиторы ФНО включают, например, CIMZIA® (цертолизумаб пегол),

пегилированный фрагмент антитела, и ENBREL® (этанерцепт), растворимый слитный белок ФНО-рецептора. Обзор ингибиторов ФНО см., например, в публикации Lis et al., *Arch Med Sci.* 2014 Dec 22; 10(6): 1175–1185.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общие и предпочтительные варианты осуществления изобретения определены, соответственно, независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, прилагаемыми к настоящему документу, которые для краткости включены в настоящий документ путем ссылки. Другие предпочтительные варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания в комбинации с прилагаемыми на фигурах чертежами.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >30% пациентов детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA ACR после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии

ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 >30% пациентов детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA ACR после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения и указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава,

содержащего антитела к ФНО, причем 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 педиатрические пациенты соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а в/в доза состава составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения и способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >10% пациентов детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA ACR после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО,

причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии ювенильного идиопатического артрита (JIA) Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 >30% пациентов детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA ACR после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а указанный

ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а в/в доза состава составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии ювенильного идиопатического артрита (JIA) Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а указанные пациенты детского возраста находятся в возрасте от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) является полиартикулярным ювенильным идиопатическим артритом (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют минимальную оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют минимальную оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО пациентам детского возраста, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71),

соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, а в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и каждые 8 недель в последующем.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а указанные пациенты детского возраста находятся в возрасте от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста

соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) является полиартикулярным ювенильным идиопатическим артритом (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а в/в доза состава включает 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациентам детского возраста внутривенно (в/в) дозы композиции, состоящей из антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют минимальную оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, а возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, а указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы состава, содержащего антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, и в/в доза состава включает 80 мг/м^2 антитела к ФНО неделях 0 и 4, а затем каждые 8 недель в последующем.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% пациентов детского возраста имеют оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания, после 52 недель лечения, а способ дополнительно включает введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **Фиг. 1** показано графическое представление, демонстрирующее анализ способности мАт TNV в супернатантах клеток гибридомы ингибировать связывание ФНОα 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 ФНОα. Смесь переносили в 96-луночные планшеты Optiplates, которые были предварительно покрыты p55-SF2, рекомбинантным слитным белком рецептора ФНО/IgG. Количество ФНОα, 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. Каждый образец испытывали в двух повторностях. Представленные результаты отражают репрезентативные данные, полученные в ходе двух независимых экспериментов.

На **Фиг. 2A-B** показаны последовательности ДНК вариабельных 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 вариабельной области. 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) были

связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии в данный момент времени. В тяжелых цепях мАт TNV используется соединительная область J6.

На **Фиг. 3** показаны последовательности ДНК вариабельных областей легкой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии является репрезентативным членом семейства Vг/38K человеческих генов зародышевой линии вариабельной области 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 вариабельной области. 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 вариабельных 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 области (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 вариабельных 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 области (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена легкой цепи зародышевой линии Vг/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 rTNV148B-экспрессирующих клеток C466. p1783 — плазмида тяжелой цепи, а p1776 — плазмида легкой цепи. Домены, кодирующие вариабельную и константную области rTNV148B, показаны черными прямоугольниками. Энхансеры иммуноглобулинов в интронах J-C показаны серыми прямоугольниками. Показаны значимые сайты рестрикции. Ориентация плазмид показана таким образом, что транскрипция генов антител проходит в направлении по часовой стрелке. Плазмида p1783 имеет длину 19,53 т.п.н., а плазмида p1776 имеет длину 15,06 т.п.н. Известны полные нуклеотидные последовательности обеих плазмид. Последовательность, кодирующая вариабельную область в p1783, может быть легко заменена другой последовательностью вариабельной области тяжелой цепи путем замены рестрикционного фрагмента BsiWI/BstBI. Последовательность, кодирующая вариабельную область в p1776, может быть заменена другой последовательностью вариабельной области путем замены рестрикционного фрагмента SalI/AflII.

На **Фиг. 7** показано графическое представление анализов кривых роста пяти продуцирующих rTNV148B клеточных линий. Культуры инициировали на 0 день, высевая клетки во флаконы T75 в среде I5Q+MHX с плотностью жизнеспособных клеток 1,0 X 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 T-флаконах тщательно

ресуспендировали и извлекали аликвоту культуры 0,3 мл. Исследования кривых роста завершали, когда количество клеток падало ниже 1,5 X 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 C466A и C466B размораживали в среде, не содержащей МНХ (IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамина) 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 T75 высевали культуры с начальной плотностью 1 X 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 rTNV148B 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 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. 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.

На **Фиг. 11A–C** представлено прогрессирование тяжести заболевания, по данным индекса артрита, как показано в примере 4. 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.

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. 13A–C** представлены графики, демонстрирующие прогрессирование тяжести заболевания в примере 5 по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг cA2, 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 cA2, 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 cA2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) cA2 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 cA2.

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 (cA2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг cA2.

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, причем 5 мг/кг cA2 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 cA2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как cA2, 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** представлена схема плана клинического исследования pJIA. DBL — блокировка базы данных, LTE — долгосрочная расширенная фаза, MSE — главный вторичный конечный показатель, PE — основной конечный показатель. В/в инфузии голимумаба 80 мг/м^2 отмечены стрелкой в указанные моменты времени. Пациенты также получали коммерческий MTX по меньшей мере до недели 28 в одной и той же еженедельной дозе, рассчитанной по площади поверхности тела (BSA), что и на момент регистрации в исследовании.

На **Фиг. 19** показана диаграмма распределения пациентов на протяжении всего исследования. * В сумме получается 51, поскольку у 1 пациента было более 1 причины исключения из исследования. НЯ — нежелательное явление; JIA — ювенильный идиопатический артрит; n — число пациентов.

На **Фиг. 20A-B** показаны наблюдаемые минимальные концентрации голимумаба в сыворотке крови в стационарном состоянии (мкг/мл) (**A**) и спрогнозированные

моделью AUC_{ss} концентрации голимумаба в сыворотке крови (мкг·сут/мл) (**B**) на неделе 28 в разбивке по возрастным группам у пациентов с pJIA и во взрослой контрольной популяции RA. Горизонтальные линии внутри прямоугольников представляют медианы, нижние края прямоугольников представляют 1-й квартиль, а верхние края прямоугольников представляют 3-й квартиль. «Усы» представляют собой самые экстремальные наблюдения в пределах 1,5-кратного межквартильного диапазона. AUC_{ss} — площадь под кривой «концентрация-время» в равновесном состоянии; JIA — ювенильный идиопатический артрит; n — количество пациентов в популяции; RA — ревматоидный артрит; НД — неделя.

На **Фиг. 21A-D** показана клиническая эффективность до недели 52; процент пациентов с JIA ACR 30/50/70/90, ответивших на лечение (**A**) процент пациентов с JIA ACR в неактивной форме или с клинической ремиссией на фоне приема препаратов (**B**), среднее значение (стандартное отклонение) оценки боли по шкале CHAQ и родителями (**C**) и среднее значение (95% доверительный интервал) оценки JADAS 71 (**D**). Для (A) N=127 во всех временных точках для JIA ACR 30, 50, 70 и 90; на основании принципа ITT недостающие данные обрабатывали методами NRI и LOCF. Для (B) N=127 во всех временных точках для неактивного заболевания и клинической ремиссии при приеме лекарственного препарата. Клиническая ремиссия при приеме лекарственного препарата была определена как неактивное заболевание на каждом визите в течение ≥6 месяцев при приеме лекарственного препарата от pJIA (все визиты, охватывающие по меньшей мере 24 недели до достижения неактивных критериев заболевания). Согласно принципам ITT, для неактивного заболевания и клинической ремиссии отсутствующие данные обрабатывались в соответствии с LOCF и NRI. Для (C) оценки боли и CHAQ были основаны на наблюдаемых данных. Для (D) оценка JADAS была основана на наблюдаемых данных. 95% доверительный интервал основан на нормальной аппроксимации: среднее значение ±1,96 x SD/√N. ACR — Американская коллегия ревматологов; BSL — исходный уровень; CHAQ — опросник по оценке состояния здоровья детей; HDA — высокая активность заболевания; ID — неактивное заболевание; ITT — выборка «все рандомизированные пациенты согласно назначенному лечению»; JADAS — Оценка активности ювенильного артрита (JADAS); JIA — ювенильный идиопатический артрит; LDA — низкая активность заболевания; LOCF — использование последнего документированного значения; N — все пациенты, получавшие лечение; n — количество пациентов, подлежащих оценке; NRI — замена

недостающих значений данными об отсутствии ответа на лечение; СО — стандартное отклонение.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении обеспечены композиции, содержащие антитела к ФНО, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO:37, а также способы получения таких антител к ФНО.

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 лиганд-связывающий участок, вариабельная 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), Facb (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-кодонов ближе к концу от сайта естественной остановки. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи $F(ab')_2$, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен CH_1 и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные участки антител можно химически соединять обычными способами или можно 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, каркасная область, домены C_L, C_H (например, C_H1, C_H2 и CH3), шарнир, (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 продуцироваться 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, например DuoBody® (биспецифическое антитело), 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, причем 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, причем только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка нужной молекулы, которую обычно выполняют с помощью аффинной хроматографии, может быть затруднительной и иметь низкий выход продукта, и для облегчения продукции биспецифических антител были разработаны различные стратегии.

Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в CH3-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо in vitro в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей

с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение CH3-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. CH3-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждые из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

Термин «гомодимеризация» в данном документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности CH3. Термин «гомодимер» в данном документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Термин «гетеродимеризация» в данном документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности CH3. Термин «гетеродимер» в данном документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию PCT № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами CH3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов CH3 и тем самым способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в CH3, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи / модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной

поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи / модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций в CH3-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образования биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации международной патентной заявки № WO2011/131746. В способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене CH3, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии

по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5–8, например при pH = 7,0 или при pH = 7,4.

Специфичные к ФНО антитела (также называемые антителами к ФНО), используемые в способах и композициях настоящего изобретения, могут необязательно характеризоваться высокой аффинностью связывания с ФНО, причем необязательно и предпочтительно они имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, причем отдельные компоненты, такие как вариабельная область, константная область и каркасная область, 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 HANA, HACA или HAMA 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 μг/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 вариабельные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все вариабельные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, можно необязательно получать с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных 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 гибридому получают путем слияния приемлемой иммортализованной 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, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, или т. п., или гетеромиломы, 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., причем 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 вариабельные, или каркасные области 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 и т. п.; например, производства компаний Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Великобритания; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Германия; Biovation, Aberdeen, Scotland, Великобритания; BioInvent, Lund, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, 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; (Xoma); 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), причем 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, Cambridge, MA; 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 генной 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» вариабельных, 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/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www. cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www. jerini.de/frproducts.html;
www. patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al.,
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 вариабельных 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, PCT: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, причем 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), Tuaillon *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), причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки). По существу эти 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 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 нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях PCT № 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 PCT № 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 (Carlsbad, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, выданные Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, выданные Dyax, 5427908, 5580717, выданные Affymax; 5885793, выданный Cambridge antibody Technologies; 5750373, выданный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435,

5693493, 5698417, выданные Xoma, Colligan, упомянутое; 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., причем каждый из них 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, причем их биологическая активность была эквивалентна активности белков, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., Adv. Порядок 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. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен 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) × 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 вариабельные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все вариабельные 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 некодирующей 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 вариабельной 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 врожденности 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, вариабельную область HC и вариабельную 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 (a) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (c) 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, pH 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 антисмысловую 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., упомянутое; Ausubel, et al., упомянутое; причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. По существу 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 конструкты дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области — сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодирующий участок зрелых транскриптов, экспрессируемых конструктами, предпочтительно содержит сайт инициации трансляции в начале, а также терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем 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, упомянутое, главы 1–4 и 16–18; Ausubel, упомянутое, главы 1, 9, 13, 15, 16.

По меньшей мере одно антитело настоящего изобретения можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитный 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 клеточные линии 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 hep G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т. п., например, производства Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США. Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки CHO и клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Особенно предпочтительны клетки-хозяева CHO, P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851).

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 T-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для продукции нуклеиновых кислот или белков настоящего изобретения используют и другие известные и/или поставляемые клетки, например, по каталогу «Американская коллекция типовых культур клеточных линий и гибридом», либо из других известных или коммерческих источников.

В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор, как правило, 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 гидроксилапатите 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, причем 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, причем гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие способы

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

Примеры антител к ФНО

Выделенные антитела настоящего изобретения, содержащие все вариабельные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все вариабельные 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 зависимую 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 зависимую 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, γ1, γ2, γ3, γ4)), 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

В различных вариантах осуществления ингибитор ФНО содержит антитело к ФНО SIMPONI® (голимумаб) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, показанные ниже. Дополнительную информацию об антителе к ФНО SIMPONI® (голимумаб) и других антителах к ФНО см., например, патенты США №: 7,250,165; 7,691,378; 7,521,206; 7,815,909; 7,820,169; 8,241,899; 8,603,778; 9,321,836; и 9,828,424.

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

CDR тяжелой цепи (HCDR) и CDR легкой цепи (LCDR) указаны по Кабат.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (HC) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO:36)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS <u>SYAMH</u>WVRQA PGNGLEWVA<u>F</u>
<u>MSYDGSNKKY</u>

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GIAAGGNYYY 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 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL

361 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT

421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 456

Аминокислотная последовательность легкой цепи (LC) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (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 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO:38)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAF MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GIAAGGNYYY YGMDVWGQGT

121 TVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи (VL) голимумаба с подчеркнутыми CDR: (SEQ ID NO:39)

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT V

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HCDR1) голимумаба: (SEQ ID NO:40)

SYAMH

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (HCDR2) антитела голимумаб: (SEQ ID NO:41)

FMSYDGSNKKYADSVKG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (HCDR3) голимумаба: (SEQ ID NO:42)

DRGIAAGGNYYYYGMDV

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (LCDR1) голимумаба: (SEQ ID NO:43)

RASQSVYSYLA

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (LCDR2) голимумаба: (SEQ ID NO:44)

DASNRAT

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (LCDRL) голимумаба: (SEQ ID NO:45)

QQRSNWPPFT

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, причем 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 стандартных способов получения и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью стандартных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

Специфичное антитело к ФНО может содержать по меньшей мере одну из вариабельных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ФНО содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и/или по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, причем антитела, которые связываются с ФНО человека и которые содержат определенный вариабельный 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. Если требуется, можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие иммортализованные клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитело, 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).

ОДНОБУКВЕННЫЙ КОД	ТРЕХБУКВЕННЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
O	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
П	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 настоящего изобретения, 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 настоящего изобретения 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, причем 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. Количество таких подпоследовательностей может дополнительно 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 95–100% 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 полувыведения из сыворотки *in vivo*). 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 поливинилпиролидон, 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, полиаспартат 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, PEG_{5000} и $PEG_{20,000}$, где нижний индекс означает среднечисленную 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 аминогруппу, 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 (C_{12}, лаурат), н-тетрадеканоат (C_{14}, миристат), н-октадеканоат (C_{18}, стеарат), н-эйкозаноат (C_{20}, арахидат), н-докозаноат (C_{22}, бегенат), н-триаконтаноат (C_{30}), н-тетраконтаноат (C_{40}), *цис*-Δ9-октадеканоат (C_{18}, олеат), полностью *цис*-Δ5,8,11,14-эйкозатетраеноат (C_{20}, 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 C_1–C_{12}, 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-Boc-алкилдиамина (например, моно-Boc-этилендиамина, моно-Boc-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 Boc 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 C- 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, сульфасалазина), 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, минерального вещества, 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), причем 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 термолабильный энтеротоксин (LT) *E. coli*, термостабильный энтеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, энтеротоксины *Aeromonas*, токсин-1 синдрома токсического шока

(TSST-1), стафилококковый энтеротоксин A (SEA), B (SEB) или C (SEC), стрептококковые энтеротоксины и т. п. Такие бактерии включают, без ограничений, штаммы видов энтеротоксигенной *E. coli* (ETEC), энтерогеморрагической *E. coli* (например, штаммы серотипа 0157:H7), виды Staphylococcus (например, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes*), виды *Shigella* (например, *Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii u Shigella sonnei*), виды *Salmonella* (например, *Salmonella typhi, Salmonella cholera-suis, Salmonella enteritidis*), виды *Clostridium* (например, *Clostridium perfringens, Clostridium dificile, Clostridium botulinum*), виды *Camphlobacter* (например, *Camphlobacter jejuni, Camphlobacter fetus*), виды *Heliocbacter*, (например, *Heliocbacter pylori*), виды *Aeromonas* (например, *Aeromonas sobria, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides, Yersinia enterocolitica, Vibrio* (например, *Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus*), *Klebsiella*, *Pseudomonasaeruginosa* 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 (rHA), 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 трометамина 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, фиколлы (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, сахариды 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, феноксиэтанола, 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, причем 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, причем 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 полоксамер 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 процесса 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 температуре от около 2 С до около 40 °С, причем биологическая активность белка сохраняется в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке может быть предусмотрена этикетка, на которой сказано, 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, полугода, 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 стандартных 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 процесса 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 Dickensen (Franklin Lakes, штат Нью-Джерси, США www. bectondickenson.com),

Disetronic (Бургдорф, Швейцария, www. disetronic.com;)

Bioject, г. Портланд, штат Орегон, США (www. bioject.com);

Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www. weston-medical.com),

Medi-Ject Corp (г. Миннеаполис, штат Миннесота, США, 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 процесса 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/обратные процедуры 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, синдром респираторного дистресса 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 B, 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 лекарственного средства 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 (COPD), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, дерматологические состояния, псориаз,

алопеция, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острая почечная недостаточность, гемодиализ, уремия, токсичность, преэклампсия, терапия OKT3, 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, артериальная 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, аневризма аорты и периферических сосудов, расслоение аорты, воспаление аорты, окклюзия брюшной аорты и ее ветвей, болезни периферических сосудов, окклюзионные артериальные расстройства, атеросклеротические заболевания периферийных 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 (A, B или C 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 A, 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), B-клеточный, T-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 хорея Хантингтона и старческая хорея; 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 паралич; 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, абеталипопротеимия, 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 Крейцфельдта-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, причем 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, сульфасалазина), 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, минерального вещества, 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), причем 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 включающим 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 (MAP); 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 (ACE) (например, каптоприл); и соединения, которые блокируют и/или ингибируют продукцию ФНО и/или синтез ФНО, такие как ингибиторы MAP-киназ.

В настоящем документе «антитело к фактору некроза опухоли», «антитело к ФНО», «антитело к ФНОα» или его фрагмент и т. п. уменьшает, блокирует, ингибирует, уничтожает или нарушает активность ФНОα в условиях *in vitro, in* situ и/или предпочтительно in *vivo*. Например, приемлемое человеческое антитело к ФНО настоящего изобретения может связываться с ФНОα и включает антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты, а также их определенные мутанты или домены, которые специфически связываются с ФНОα. 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 cA2 состоит из антигенсвязывающей вариабельной области высокоаффинного нейтрализующего мышиного антитела типа IgG1 к человеческому ФНОα, обозначенного как A2, и константных областей человеческого IgG1, каппа-иммуноглобулина. Область Fc человеческого IgG1 улучшает эффекторную функцию аллогенного антитела, увеличивает его период полувыведения из сыворотки и уменьшает иммуногенность антитела. Авидность и эпитопная специфичность химерного антитела cA2 обусловлены вариабельной областью мышиного антитела A2. В конкретном варианте осуществления предпочтительным источником нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельную область мышиного антитела A2, является гибридомная клеточная линия A2.

Химерное антитело A2 (cA2) дозозависимым образом нейтрализует цитотоксический эффект как природного, так и рекомбинантного человеческого ФНОα. С помощью анализов связывания химерного антитела cA2 и рекомбинантного человеческого ФНОα было рассчитано, что константа аффинности химерного антитела cA2 составляет $1{,}04 \times 10^{10}\ M^{-1}$. Предпочтительные способы определения специфичности и аффинности моноклональных антител посредством конкурентного ингибирования можно найти в публикациях Harlow, *etal.*, *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 мышиное моноклональное антитело A2 продуцируется клеточной линией, обозначенной как c134A. Химерное антитело cA2 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 ФНОα 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 ФНОα 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 гибридная молекула иммунорецептора к ФНО является слитный 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 к ФНО относится к участку молекулы рецептора к ФНО или к участку последовательности молекулы рецептора к ФНО, которая кодирует молекулу рецептора к ФНО, и имеет достаточный размер и последовательность для функционального сходства с молекулами рецептора к ФНО, которые могут быть использованы в настоящем изобретении (например, связываются с ФНОα 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 ФНОα 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, CopewithCytokines.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, причем 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, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического

лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерального вещества, 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 кФНО голимумаба) относится к благоприятному соотношению риск: польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ) по сравнению со стандартным лекарственным препаратом или другим препаратом сравнения, отличным от агентов-антител к ФНО. Нежелательное 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 нежелательных 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 достижения улучшения состояния пациента, связанного с ювенильным идиопатическим артритом (JIA), и в частности при полиартикулярном ювенильном идиопатическом артрите (pJIA). Эффективность лечения JIA и/или pJIA можно определять, например, по соответствию пациентов критериям неактивного заболевания, причем пациенты имеют улучшение относительно исходного уровня, соответствующее ответу согласно Американской коллегии ревматологов (JIA ACR), выбранному из JIA ACR 30, JIA ACR 50, JIA ACR 70 и/или JIA ACR 90, и/или при этом пациенты имеют уменьшение величины оценки активности ювенильного артрита (JADAS) относительно исходного уровня, выбранное из JADAS 10, JADAS 27 и/или JADAS 71.

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин «клинически доказанный» (используемый независимо или для модификации терминов «безопасный» и/или «эффективный») означает, что доказательство было получено в клиническом исследовании фазы III, причем клиническое исследование соответствовало стандартам Управления по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов США, Европейского агентства лекарственных средств (EMEA) 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 μг/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 понадобиться выполнение повторного введения, т. е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, причем 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, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 и/или 5000 μг/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 методиками.

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 ведения. 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, внутрихрящевого, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интраректального, интраренального, интраретинального, 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), причем 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 конкретные примеры доступных в продаже ингаляционных устройств предназначены для иллюстрации конкретных устройств, приемлемых для практического применения в настоящем изобретении, и не предназначены для ограничения объема 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 антитела 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 антитела 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 распылением раствора с распылением 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 полиоксиэтиленсорбитановые 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 полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, 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 3M 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 a (гидрофторалкан-134a), 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 № 5,5,871,753, 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 роговичный, 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, полиортоэфиры, 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 (a) соль присоединения кислоты с многоосновной кислотой, такой как фосфорная кислота, серная кислота, лимонная кислота, винная кислота, дубильная кислота, памоевая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинмоно-или дисульфоновая кислота, полигалактуроновая 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 (c) комбинации (a) 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, HTLVI, HIVI, 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 pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clonetech 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, мышиные клетки NIH3T3 и C127, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки перепела QC1-3, мышиные 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 Payca (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 мышиный 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 концевого повтора (LTR) вируса саркомы Payca (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 HTLVI. 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 теленка в ходе процедур, известных специалистам в данной области. Затем выделяют вектор из 1% агарозного геля.

Впоследствии ДНК, кодирующую выделенные вариабельную 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 μг) котранфицируют с 0,5 μг плазмиды pSV2-neo с помощью липофектина. Плазмида 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 μг/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 μг/мл G418. Примерно через 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 получат 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) F_2, имеющих трансгены человеческих вариабельного 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; CO_2 — диоксид углерода; DMSO — диметилсульфоксид; EIA — иммуноферментный анализ; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; H_2O_2 — перекись водорода; HRP — пероксидаза хрена; в/д — внутридермально; Ig — иммуноглобулин; ФНО — фактор некроза опухоли альфа; в/б — внутрибрюшинно; в/в — внутривенно; Мат или мАт — моноклональное антитело; OD — оптическая плотность; OPD — дигидрохлорид 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 мышиный 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 мк 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 адъювантом Фрейнда в конечном объеме 100–400 мкл (например, 200). Каждой мыши могут также необязательно вводить 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 х 2) ФНО, эмульгированным с равным объемом TITERMAX или неполным адъювантом 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 умертвить посредством смещения шейных позвонков, извлечь селезенки в асептических условиях и погрузить их в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина B (PSA). Спленоциты 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 мышиной 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 ^{o}C. Затем слияние можно останавливать путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes (37 ^{o}C) в течение 1 минуты. Слитые клетки центрифугируют в течение 5 минут при 500–1500 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде HAT (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% CO_2 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% (масс./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 часа

при КТ. Планшеты немедленно используют или замораживают при -20 °С 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 меченными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc, разведенными 1:30000 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 °С. Планшеты промывают и блокируют 1% BSA-PBS в течение одного часа при 37 °С и немедленно используют или замораживают при -20 °С. Неразбавленные супернатанты гибридомы инкубируют на планшетах в течение одного часа при 37 °С. Планшеты промывали и зондировали меченными HRP козьими антителами к каппа-цепи иммуноглобулина человека, разведенными 1:10 000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при 37 °С. 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-меченным 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 IgG1κ 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 козьим антителом к человеческому IgG_1 или меченным HRP козьим антителом к человеческому IgG_3, разведенным в соотношении 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 M HEPES, 0,15 M 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 подвижный буфер TBS/Ca/Mg/BSA (20 мМ Tris, 0,15 M 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 уравновешивания и гидролиза или кэпирования любых непрореагировавших сложных эфиров сукцинимида.

Антитела растворяют в подвижном 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, причем 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 пропусканием 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, c^{-1}), так и для ассоциации (k_a, моль$^{-1}$ c^{-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 IgG1κ.

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 (эпитопу). Следует отметить, что при связывании ФНО непосредственно с планшетом для EIA 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 BIAcore человеческих антител, и результаты показали, что некоторые из человеческих моноклональных антител имеют очень высокую аффинность с K_D в диапазоне от 1 x 10^{-9} до 7 x 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 изотипа IgG1κ. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Несколько полученных антител имеют константы аффинности в диапазоне от 1 x 10^9 до 9 x 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 ФНОα.

Сводная информация. Гибридных мышей (CBA/J x C57BL/6J) F_2 (1–4), имеющих трансгены человеческих вариабельного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизировали рекомбинантным человеческим ФНОα. В результате одного слияния, GenTNV, получали восемь полностью человеческих моноклональных антител IgG1κ, которые связываются с иммобилизованным рекомбинантным человеческим ФНОα. 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 cA2 (Remicade).

Сокращения. BSA — бычий сывороточный альбумин; CO_2 — диоксид углерода; DMSO — диметилсульфоксид; EIA — иммуноферментный анализ; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; H_2O_2 — перекись водорода; HC — тяжелая цепь; 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 — дигидрохлорид о-фенилендиамина; PEG — полиэтиленгликоль; PSA — пенициллин, стрептомицин,

амфотерицин; КТ — комнатная температура; п/к — подкожно; ФНОα — фактор некроза опухоли альфа; об./об. — объем на объем; масс./об. — масса на объем.

Введение. Для создания полностью человеческих моноклональных антител, специфичных к рекомбинантному ФНОα человека, использовали трансгенных мышей, имеющих человеческие гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Есть надежда, что эти уникальные антитела можно использовать, поскольку cA2 (Remicade) используют для терапевтического ингибирования воспалительных процессов, связанных с опосредованным ФНОα заболеванием, и при этом присутствует полезный эффект увеличения периода полувыведения из сыворотки и уменьшения побочных эффектов, связанных с иммуногенностью.

В настоящем документе термин «период полужизни» означает, что концентрация лекарства в плазме (например, терапевтического антитела к ФНОα) уменьшается наполовину после одного периода полувыведения. Следовательно, в каждом последующем периоде полужизни выводится меньшее количество лекарственного средства. После одного периода полужизни количество лекарственного средства, оставшееся в организме, составляет 50%, после двух периодов полужизни 25% и т. д. Период полужизни лекарственного средства зависит от его клиренса и объема распределения. Считается, что период полужизни не зависит от количества лекарственного средства в организме.

Материалы и способы

Животные. В GenPharm International были разработаны трансгенные мыши, экспрессирующие человеческие иммуноглобулины, но не мышиные IgM или Igκ. 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 Vκ зародышевой линии. Кроме нескольких генов VH трансген тяжелой цепи (HC) кодирует как человеческие константные области μ, так и человеческие константные области γ1 (2) и/или γ3. В процессе иммунизации и слияния для создания моноклональных антител, описанных в настоящем документе, использовали мышь, полученную из генотипической линии HCo12/KCo5.

Очистка человеческого ФНОα. ФНОα человека очищали из супернатанта тканевой культуры клеток C237A с помощью аффинной хроматографии на колонке, заполненной слитным белком рецептор ФНОα-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 ФНОα 0,1 М цитратом натрия, pH 3,5, и нейтрализовали 2М трис-HCl, pH 8,5. Очищенный ФНОα 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 ФНОα (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 EIA на ФНОα. Слияние, названное GenTNV, проводили после того, как дали мышам отдохнуть в течение семи недель после инъекции в день 28. Мышам с титром IgG человека против ФНОα, равным 1:160, делали конечную бустерную в/в инъекцию 50 мкг ФНОα, 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 B (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.

ФНОα 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 мМ пирувата натрия, 2 мМ 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 ФНОα в сыворотке крови мышей. Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНОα, использовали твердофазный EIA. Если коротко, планшеты оставляли покрываться в растворе ФНОα 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% (масс./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 ФНОα, по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 часа. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка меченными 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% H_2O_2 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 мышиные 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 мышиной иммунной сыворотки на специфические титры. Планшеты для EIA покрывали козьими антителами к человеческому IgG (H+L) в концентрации 10 г/мл в натрий-карбонатном буфере в течение ночи при 4 ☜C и блокировали, как описано выше. Чистые супернатанты культур из 24 лунок инкубировали на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывали и зондировали меченными HRP козьими антителами к человеческому IgG_1, IgG_2, IgG_3 или IgG_4 (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 ФНОα человека. Одно слияние, называемое GenTNV, выполнял для мыши GenPharm, иммунизированной рекомбинантным белком ФНОα человека. После данного слияния отобрали 196 жизнеспособных гибридов. Было выявлено восемь гибридомных клеточных линий, секретирующих полностью человеческие антитела IgG, реагирующие с ФНОα человека. Каждая из этих восьми клеточных линий секретировала иммуноглобулины человеческого изотипа IgG1κ, 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 ФНОα человека, полученным в компании Centocor. Получали восемь полностью человеческих, реагирующих на ФНОα моноклональных антител IgG изотипа IgG1κ. 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.

Ссылочный материал

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 ФНОα

Сводная информация. Было обнаружено, что панель из восьми человеческих моноклональных антител (мАт) с обозначением TNV связывается с иммобилизованным ФНОα человека с очевидно высокой авидностью. Было показано, что семь из восьми мАт эффективно блокируют связывание человеческого ФНОα 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 ФНОα in vitro для дальнейшего исследования отбирали мАт TNV148 и TNV14.

Поскольку при поиске по базе данных остаток пролина в положении 75 (каркасная область 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 е 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 г/мл мАт rTNV148B в отработанных культурах, а трансфицированные Sp2/0-клоны 1.73-12-122 (C467A) стабильно продуцировали приблизительно 25 г/мл мАт rTNV148B в отработанных культурах. Аналогичные анализы показали, что трансфицированный Sp2/0-клон C476A продуцировал 18 г/мл rTNV14 в отработанных культурах.

Введение. Ранее было показано, что панель из восьми мАт, полученных от иммунизированных человеческим ФНОα мышей GenPharm/Medarex (генотип HCo12/KCo5), связывается с ФНОα человека и имеет полностью человеческий изотип IgG1 каппа. Для определения в примерах мАт настоящего изобретения возможности наличия ФНОα-нейтрализующей активности использовали простой анализ связывания и оценивали их способность блокировать связывание ФНОα 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 мышиных миелом 653 и Sp2/0 и отсеивали трансфицированные клеточные линии, пока не выявляли субклоны, которые продуцировали в 40 раз больше мАт, чем исходная гибридомная клеточная линия.

Материалы и способы

Реагенты и клетки. Реагент TRIZOL был приобретен у компании Gibco BRL. Протеиназа K 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 «M» 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'.

Название	I.D.	Последовательность
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)
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
BsiWI		M D W T W S I (SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-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)
BstBI		T V T V S (SEQ ID NO:23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:24)
SalI		M D M R V (SEQ ID NO:25)
LK7s	362	5'-TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26)
LVgs	363	5'-TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27)
Afl2		T K V D I K (SEQ ID NO:28)
HuL-J3	380	3'-CTGGTTTCACCTATAGTTTG/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 мышиной миеломы 653. Флакон размораживали на этот же день и размножали в Т-флаконах в среде IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамина (среда). Эти клетки поддерживали в непрерывной культуре до трансфицирования через 2–3 недели при помощи ДНК антитела к ФНОα, 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 мышиной 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 гибридомных клеток, содержащие мАт TNV, использовали для анализа способности мАт блокировать связывание ^{125}I-меченого ФНОα с рекомбинантным слитным белком рецептора к ФНО p55-sf2 (Scallon et al. (1995) *Cytokine* 7:759–770). На планшеты Optiplates добавляли 50 мкл p55-SF2 в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, чтобы покрыть лунки в течение одного часа инкубации при 37 °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 cA2 (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 ФНОα (58 :Кю/г, D. Shealy) добавляли к 100 :л супернатанта клеток с конечной концентрацией ФНОα 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 :л смеси ^{125}I-ФНОα/супернатант клеток. Через 2 ч при КТ планшеты Optiplates трижды промывали PBS-Tween. Добавляли 100 :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 X 10^6 до 1,7 X 10^7 ресуспендировали в 1 мл TRIZOL. Пробирки энергично встряхивали после добавления 200 мкл хлороформа. Клетки инкубировали при 4 °C 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 клетки центрифугировали при 4 °C 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. РНК хранили в морозильной камере при температуре -80 °С до использования.

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 и 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 мМ dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы (20 единиц) и 0,4 мкл ингибитора рибонуклеазы RNasin (1 единица). 13,5 μл этой смеси добавляли к 11,5 μл охлажденной смеси РНК/олигонуклеотид и реакционную смесь инкубировали в течение 40 минут при 42 °С. Впоследствии реакционную смесь для синтеза кДНК хранили в морозильной камере при -20 °С до использования.

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 мМ dNTP, 5 мкл 10X буфера HIFI и 2 мМ сульфата магния. Программа термоциклера была следующей: 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 минут). Впоследствии выполняли конечную инкубацию при 68 °С в течение 10 минут.

Для подготовки ПЦР-продуктов для прямого секвенирования ДНК их очищали с использованием набора QIAquickTM 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 TerminatorTM 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), а затем выдерживание 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 Pro^{75} 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, а затем проводили 14 циклов с последовательными инкубациями при 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 с последующим инкубированием при 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 образцы 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 вариабельной области на любую соответствующим образом сконструированную ПЦР-амплифицированную вариабельную область.

Для модификации гена тяжелой цепи 12B75 в плазмиде p1560 фрагмент BamHI/HindIII размером 6,85 т.п.н., содержащий промотор и вариабельную 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 плазмида была названа p1747. Для введения сайта BstBI на 3'-конец вариабельной 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 вариабельной области 12B75 и сайт HindIII, в результате чего был внедрен уникальный сайт BstB1. Полученный промежуточный вектор, обозначенный p1750, может принимать фрагменты вариабельной 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 вариабельную область, переносили из p1558 в сайты XhoI/AflII плазмиды L28. Эта новая плазмида, p1745, обеспечила матрицу меньшего размера для стадии мутагенеза. Олигонуклеотиды (C340salI и C340sal2) использовали для введения уникального сайта рестрикции SalI на 5'-конце вариабельной области посредством мутагенеза QuikChange™. Полученный промежуточный вектор (p1746) имел уникальные сайты рестрикции SalI и AflII, в которые могут быть клонированы фрагменты вариабельной области. Любой фрагмент вариабельной 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 BsiW1, 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 плазмида содержала уникальные сайты для BsiWI и AflII, в которые может быть перенесен фрагмент BsiWI/AflII, содержащий промотор и вариабельные 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 конструкты были правильными и что в ходе ПЦР-амплификации не было внесено ошибок. Назначенные идентификационные номера для данных L28-плазмидных конструктов (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. Вариабельные области впоследствии переносили в два разных человеческих вектора экспрессии IgG1. Для переноса вариабельных 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). Вариабельные 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 линеаризации, либо использовали для очистки вставок генов мАт перед трансфицированием клеток. (Н/В) = не выполняли

	Gm(f+)		**G1m(z)**	
Мат	**ИД плазмиды вектора 128**	**ИД промежуточной плазмиды**	**ИД экспрессионной плазмиды**	**ИД экспрессионной плазмиды**
		Тяжелые цепи		
TNV14	p1751	p1777	p1781	p1786

TNV15	p1752	(H/B)	(H/B)	(H/B)
TNV148	p1753	p1778	p1782	p1787
TNV148B	p1760	p1779	p1783	p1788
TNV196	p1754	(H/B)	(H/B)	(H/B)
		ИД плазмиды вектора pBC	**ИД промежуточной плазмиды**	**ИД экспрессионной плазмиды**
		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 конструкты 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 конструкт p1762 с получением конечных экспрессионных плазмид p1775 и p1776 соответственно (таблица 2).

Трансфекции клеток, скрининг и субклонирование. Всего проводили 15 трансфекций клеток мышиной миеломы различными экспрессионными плазмидами TNV (см. таблицу 3). 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 линеаризованной 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 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 линеаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом. Например, рестрикционные ферменты SalI и NotI использовали для линеаризации 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 г линеаризованной плазмиды pSV2gpt (p13) в качестве источника селективного маркера. После электропорации клетки высевали на 96-луночные планшеты для тканевых культур в IMDM, 15% FBS, 2 мМ глутамина и инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO_2. Через двое суток добавляли равный объем IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамина, реагент для селекции 2X МНХ (1 X МНХ = 0,5 г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 г/мл гипоксантина, 50 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, пересевали 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 мМ глутамина, 1X MHX и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 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 засеивали по 1 X 10^5 клеток/мл в 30 мл IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамина и 1X MHX (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 X 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 MHX. Клеточные линии C466A и C466B размораживали в среде без MHX (IMDM, 5% FBS, 2 мМ глутамина) и культивировали в течение двух дополнительных дней. Впоследствии обе клеточные культуры делили на три культуры, которые не содержали MHX, содержали 0,2X MHX или 1X MHX (1X MHX = 0,5 г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 г/мл гипоксантина, 50 г/мл ксантина). Через день в свежие флаконы T75 высевали культуры с начальной плотностью 1 X 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 мМ глутамина с реагентом для селекции МНХ 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 °C. 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 ФНОα с рецептором. Концентрации мАт TNV в соответствующих супернатантах клеток сначала определяли стандартным анализом методом твердофазного ИФА на человеческий IgG. Впоследствии рекомбинантный слитный белок рецептор ФНО p55/IgG, p55-sf2, наносили на планшеты для EIA, и давали возможность ^{125}I-меченому ФНОα 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 ФНОα с рецептором с p55. Фактически, мАт TNV оказались более эффективными с точки зрения ингибирования связывания ФНОα, чем мАт положительного контроля, cA2, которые были добавлены в супернатант гибридомы отрицательного контроля. Эти результаты были интерпретированы как показывающие, что мАт TNV блокируют биологическую активность ФНОα 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 характеризации семи мАт TNV (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV148 и TNV196), которые продемонстрировали активность в плане блокирования ФНОα в анализе связывания с рецептором, из семи гибридомных 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. Анализы 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 Vг/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 областей (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 наблюдалось, что эффективность мАт TNV148 и TNV196 была в четыре раза выше, чем следующего по эффективности мАт (TNV14), в плане нейтрализации биологической активности ФНОα. 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 ФНОα, 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 плазмида 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 C-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 вариабельной 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 линеаризовали путем расщепления рестриктазами, либо генные вставки антител в каждой плазмиде очищали от каркасов плазмиды. Клетки мышиной 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 линеаризованых 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 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 rTNV148B-продуцирующих клеток C466 (A, B, C, D) и C467A получены из трансфекционных номеров 2 и 1 соответственно. rTNV14-продуцирующая клеточная линия C476A получена из номера 3 трансфекции.

Таблица 4. Сводные данные по трансфекциям клеток

№ трансфекции	**Плазмиды**	**НС**		**ДНК**	
мАт	**HC/LC/gpt**	**вектор**	**формат**	**Sp2/0**	**653**
rTNV148B	1783/1776	старый	линейный	1	2
rTNV14	1781/1775	старый	линейный	3	-
rTNV148B	1788/1776/13	новый	вставка	4,6	5,7
rTNV14	1786/1775/13	новый	вставка	8,10	9,11
rTNV148	1787/1776/13	новый	вставка	12	17
rH1/L2	1786/1776/13	новый	вставка	13	14
rTNV148B	1801/1776	старый	линейный	16	

Анализы методом твердофазного ИФА супернатантов отработанных культур в 24-луночных планшетах показали, что все эти субклоны второго цикла производили от

98 до 124 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 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 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.

	Исходные		**Отработанные 24-луночные**	
мАт	**Название клона**	**С-код**	**Клетка-хозяин**	**Продукция**
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	C476A	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 T75. Результаты показали, что

каждая из четырех клеточных линий C466 достигала пиковой плотности клеток в диапазоне от 1,0 X 10^6 до 1,25 X 10^6 клеток/мл и максимального уровня накопления мАт в диапазоне от 110 до 140 г/мл (фиг. 7). Напротив, наиболее эффективно продуцирующий субклон Sp2/0, C467A, достигал пиковой плотности клеток 2,0 X 10^6 клеток/мл и максимальных уровней накопления мАт 25 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 зависимую 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, причем C466D демонстрировал самые высокие абсолютные уровни продукции (фиг. 9).

Заключение

Из исходной панели из восьми человеческих мАт против человеческого ФНОα 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 г/мл rTNV148B и 19 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 изменения массы тела 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. 11A–C 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 изменения массы тела относительно уровня до введения препарата значимых отличий не 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. 13A–C представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг cA2, 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 cA2, 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 cA2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) cA2 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 cA2.

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 (cA2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг cA2.

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 cA2, 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, причем 5 мг/кг cA2 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 cA2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как cA2, 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. GO-VIVA. Многоцентровое открытое исследование внутривенного введения голимумаба, человеческого антитела к ФНОα, у субъектов детского возраста с активным несмотря на метотрексатную терапию полиартикулярным ювенильным идиопатическим артритом

РЕЗЮМЕ

Голимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело (мАт), которое связывается с человеческим фактором некроза опухоли альфа (ФНОα) с высокой аффинностью и специфичностью и нейтрализует биологическую активность ФНОα. ФНОα является ключевым медиатором воспаления, причем повышенные уровни ФНОα вовлечены в патофизиологию таких заболеваний, как ревматоидный артрит (RA) и ювенильный идиопатический артрит (JIA). Препарат SIMPONI® (голимумаб) для внутривенного (в/в) введения разрабатывается спонсором

для получения альтернативного способа введения (по сравнению с другими доступными средствами против ФНОα) и удобной схемы введения (т. е. каждые 8 недель [1 р/8 нед]) для пациентов с полиартикулярным JIA (pJIA).

ЦЕЛИ И ГИПОТЕЗА

Первичная цель

Основной целью данного исследования является оценка фармакокинетики (ФК) после внутривенного введения голимумаба субъектам (в возрасте от 2 до менее 18 лет), у которых pJIA проявляется как ≥ 5 суставов с активным артритом, несмотря на метотрексатную (MTX) терапию в течение ≥ 2 месяцев.

Вторичные цели

Вторичные цели данного исследования состоят в оценке в/в введения голимумаба у субъектов с pJIA в отношении фармакокинетики (ФК), эффективности (облегчения признаков и симптомов, физической функции и качества жизни), безопасности (нежелательных явлений [НЯ], серьезных НЯ [СНЯ] и оценке лабораторных показателей) и иммуногенности (антитела к голимумабу).

Гипотеза

В данном исследовании не запланирована формальная проверка гипотезы.

ОБЗОР СХЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Это открытое многоцентровое исследование фазы 3 для оценки ФК, безопасности и эффективности в/в голимумаба у субъектов с активным pJIA, несмотря на текущее лечение MTX. В исследуемую группу будут входить субъекты с pJIA, получающие MTX, в возрасте от 2 лет до менее 18 лет, с по меньшей мере 3-месячным анамнезом pJIA и активным артритом в ≥ 5 суставах. Приблизительно 120 субъектов будут включены в исследование на неделе 0, чтобы гарантировать, что приблизительно 100 субъектов останутся в исследовании на неделе 52. Ожидается, что схема включения в исследование обеспечит получение популяции субъектов, в которой возраст приблизительно 10% составляет от 2 до 6 лет, приблизительно 20% — от 6 до 12 лет, а приблизительно 70% — от 12 до 18 лет.

Все субъекты будут получать 80 мг/м^2 голимумаба в виде в/в инфузии (в течение 30 ± 10 минут) на неделях 0, 4 и 1 р/8 нед (±3 дня) до недели 28, и 1 р/8 нед (±1 неделя) после этого (максимальная однократная доза 240 мг [максимальная площадь поверхности тела (BSA) 3,0 м^2 x 80 мг/м^2]). Коммерческий MTX следует вводить в стабильной дозе 10–30 мг/м^2/неделя субъектам с BSA < 1,67 м^2 или в стабильной минимальной дозе 15 мг/неделя субъектам с BSA ≥ 1,67 м^2 до недели 28 (за исключением случаев, когда более низкие дозы MTX вводят по задокументированным

причинам, связанным с безопасностью или, если страна или исследовательский центр имеют документально зарегистрированное запрещение введения дозы 15 мг/неделя или выше у субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2). Субъекты, завершившие исследование на неделе 52, будут иметь возможность участвовать в долгосрочной расширенной фазе (LTE) исследования. В рамках LTE все субъекты продолжат получать в/в голимумаб 80 мг/м^2 1 р/8 нед (±1 неделя; максимальная однократная доза 240 мг) до недели 244. Ожидается, что все субъекты, которые совершили посещение на неделе 244, посетят исследовательский центр для последующего наблюдения за безопасностью на неделе 252. Голимумаб после недели 252 (для субъектов, которые завершили полное исследование в течение 252 недель до начала коммерческого применения лекарственного средства по показаниям pJIA) будет предоставляться до тех пор, пока не будет получено одобрение и разрешение на продажу лекарственного средства по показаниям pJIA в стране субъекта или до тех пор, пока он обеспечивает благоприятный эффект для ребенка (в случаях, когда коммерческий лекарственный препарат недоступен субъекту).

Поскольку это открытое исследование, в котором все субъекты получают одинаковую в/в дозу голимумаба, рассчитанную по BSA, внешний комитет по мониторингу данных не будет устанавливаться.

Завершение исследования определяется как последняя оценка для последующего наблюдения для последнего субъекта в LTE.

ПОПУЛЯЦИЯ СУБЪЕКТОВ

Субъекты исследования должны иметь возраст от 2 до менее 18 лет, с массой тела > 15 кг на момент включения в список.

Заболевание должно возникнуть до 16-го дня рождения субъекта, должно иметь продолжительность по меньшей мере 3 месяца, и оно должно быть активным pJIA одного из следующих подтипов: pJIA, положительный или отрицательный по ревматоидному фактору; системный JIA без системных симптомов в течение ≥ 3 месяцев, но с полиартритом в течение ≥ 3 месяцев; расширенный олигоартикулярный JIA; связанный с энтезитом артрит или полиартикулярный ювенильный псориатический артрит (PsA).

Субъекты должны иметь ≥ 5 суставов с активным артритом по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) при скрининге и регистрации для участия в исследовании. Субъекты должны иметь активный pJIA, несмотря на текущее

пероральное, внутримышечное или подкожное применение MTX (в течение ≥ 2 месяцев перед скринингом) в еженедельной дозе ≥ 10 мг/м^2.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Голимумаб

В исследовании будет использована 1 группа активного лечения, и все субъекты будут получать в/в инфузии 80 мг/м^2 голимумаба на неделе 0, неделе 4 и 1 р/8 нд (±3 дня) до недели 28 и 1 р/8 нед (±1 неделя) после этого, до недели 244. BSA будут рассчитывать при каждом визите, и доза голимумаба будет корректироваться по мере необходимости для обеспечения дозы 80 мг/м^2. BSA будут рассчитывать с помощью уравнения Мостеллера: BSA (м^2) = ([рост (см) x масса тела (кг)]/3600)^{½}. Максимальная однократная доза голимумаба будет составлять 240 мг.

Метотрексат

Субъекты будут получать коммерческий MTX по меньшей мере до недели 28 в одной и той же дозе, рассчитанной по BSA (от 10 до 30 мг/м^2 в неделю для субъектов с BSA < 1,67 м^2 или по меньшей мере 15 мг/неделю для субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2) на момент включения в исследование. Следует уделять особое внимание тому, чтобы обеспечивать одинаковую дозу и путь введения MTX субъектам вплоть до посещения на неделе 28, если только не возникнет непереносимость или НЯ из-за MTX.

Субъекты также будут получать коммерческую фолиевую кислоту в дозе ≥ 5 мг еженедельно или фолиновую кислоту (половину от дозы MTX), вводимую на следующий день после еженедельной дозы MTX**.** У детей в возрасте < 12 лет введение фолиевой кислоты или фолиновой кислоты будет осуществляться по усмотрению врача.

ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ И КОНЕЧНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Оценка эффективности включает следующее:

- Оценку состояние суставов (количество активных суставов и количество суставов с ограниченным диапазоном движений);
- Общую оценку активности заболевания врачом;
- Опросник по оценке состояния здоровья детей (CHAQ; включает оценку общего состояния здоровья родителем/субъектом и оценку боли родителем/субъектом)
- СРБ

Основной конечный показатель эффективности или главные вторичные конечные показатели не запланированы. К другим конечным показателям эффективности относятся:

- доли субъектов, которые представляют собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70 и 90;
- изменение данных по CHAQ относительно исходного уровня с течением времени;
- изменение концентраций СРБ с течением времени;

- доля субъектов, у которых с течением времени наблюдается неактивное заболевание;
- доля субъектов в клинической ремиссии при применении лекарственных препаратов для лечения pJIA в зависимости от времени;
- улучшение относительно исходного уровня в основной группе pJIA при каждом визите;
- доли субъектов, представляющих собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, JIA ACR 50, JIA ACR 70 и JIA ACR 90 по подтипам заболевания и/или по возрасту, в зависимости от времени вплоть до недели 52;
- изменение относительно исходного уровня оценок активности ювенильного артрита (JADAS) 10, 27 и 71 с течением времени;
- доля субъектов, достигших минимальной активности заболевания JADAS 10, 27 и 71, в зависимости от времени.

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ И КОНЕЧНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Сывороточную концентрацию голимумаба будут оценивать на неделях 0, 4, 8, 12, 20, 28, 52, 100, 148, 196 и 244 и суммировать по времени. Будет выполнен популяционный анализ ФК с данными до недели 28, чтобы охарактеризовать ФК голимумаба, а также идентифицировать важные коварианты ФК в группе детей с pJIA.

Концентрации голимумаба будут суммированы, и уровень воздействия ФК будут оценивать до недели 52 и до LTE.

Основным конечным показателем этого исследования является уровень воздействия ФК на неделе 28 (минимальные концентрации на неделе 28) и байесовская равновесная площадь под кривой [AUC_{ss}] в течение одного интервала введения, составляющего 8 недель (исходя из моделирования и симуляции популяционной ФК).

Основные вторичные конечные показатели ФК включают:

- уровень воздействия ФК на неделе 52 (минимальные концентрации на неделе 52) и байесовская AUC_{ss} на неделе 52 (исходя из моделирования и симуляции популяционной ФК).

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Оценки безопасности включают оценки следующих параметров: НЯ; реакции на инфузию; аллергические реакции; клинические лабораторные анализы (гематологические, биохимические исследования и исследования беременности); оценки основных показателей жизнедеятельности; физический осмотр; рост и масса тела; увеит; и раннее обнаружение туберкулеза.

Оценка ИММУНОГЕННОСТИ

Антитела к голимумабу будут оцениваться в образцах сыворотки крови, собранных у всех субъектов на неделях 0, 4, 8, 12, 28, 52, 100, 148, 196 и 244.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Информация о субъекте

Демографические данные и исходные характеристики заболевания, а также данные о ранее принимавшихся лекарственных препаратах будут объединены в сводку

для всех субъектов, включенных в исследование, независимо от того, получали ли они введение исследуемого препарата. Будут объединены фармакокинетические данные для всех субъектов, получавших по меньшей мере 1 введение исследуемого препарата. Анализы эффективности будут объединены для всех субъектов, включенных в исследование. Оценки безопасности будут объединены для всех получавших лечение субъектов.

Размер выборки

Размер выборки не основан на статистических аспектах. Цель состоит в получении размера выборки, достаточного для построения популяционной ФК-модели и, если это возможно, модели зависимости ответа от уровня воздействия. Кроме того, также принимали во внимание размер выборки, обеспечивающий целесообразные оценки безопасности. С учетом этих соображений был выбран размер выборки приблизительно 120 субъектов, предполагая, что при выбывании 20 субъектов из исследования или непредоставления образцов для ФК к 52 неделе размер выборки составит приблизительно 100 субъектов. Считается, что этот размер выборки достаточен для построения популяционной ФК-модели, учитывая нечастый отбор проб для ФК на разных временных точках, а также предоставление данных по безопасности приблизительно от 100 субъектов в течение 1 года.

Анализ эффективности

Анализ основных конечных показателей эффективности и основных вторичных показателей эффективности не запланированы.

Ниже будут приведены сводные данные для всех субъектов, включенных в исследование:

- доля субъектов, которые представляют собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70 и 90;
- изменение данных по CHAQ относительно исходного уровня с течением времени;
- изменение концентраций СРБ с течением времени;
- доля субъектов, у которых с течением времени наблюдается неактивное заболевание;
- доля субъектов в клинической ремиссии при применении лекарственных препаратов для лечения pJIA (критерии ACR) в зависимости от времени;
- улучшение относительно исходного уровня в основной группе pJIA с течением времени;
- доли субъектов, представляющих собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70, и 90 по подтипам заболевания и/или по возрасту, в зависимости от времени вплоть до недели 52;
- изменение относительно исходного уровня по JADAS 10, 27 и 71 с течением времени;
- доля субъектов, достигших минимальной активности заболевания JADAS 10, 27 и 71, в зависимости от времени.

Фармакокинетические анализы

Основная цель данного исследования заключается в описании ФК-уровня воздействия голимумаба (минимальные концентрации на неделе 28 и байесовская AUC_{ss} в течение периода введения 8 недель по результатам популяционного ФК-моделирования и симуляции) в популяции пациентов с ЈІА.

Сывороточные концентрации голимумаба будут объединены во времени. Кроме того, будет выполнен популяционный анализ ФК по данным до недели 28, чтобы охарактеризовать ФК голимумаба, а также идентифицировать и количественно оценить важные ковариантны ФК в группе детей с ЈІА. Клиренс и объем распределения будут оценены с использованием метода моделирования нелинейных смешанных эффектов (NONMEM).

Анализы безопасности

Безопасность будет оценена путем оценки сводных данных по НЯ, клинических лабораторных анализов и данных по основным показателям жизнедеятельности до недели 252.

Анализы иммуногенности

Данные о появлении антител и титрах антител к голимумабу в ходе исследования будут объединены по времени для всех субъектов, которые получали голимумаб и у которых брали соответствующие образцы для обнаружения антител к голимумабу (т. е. для субъектов, у которых получен по меньшей мере 1 образец после первого введения голимумаба).

Фармакокинетические/фармакодинамические анализы

Будут исследованы взаимосвязи между сывороточной концентрацией голимумаба и эффективностью. Для описания соотношения уровень воздействия-ответ будет изучена и разработана приемлемая ФК-/фармакодинамическая (ФД) модель.

ГРАФИК ВРЕМЕНИ И СОБЫТИЙ

Таблица 6.	**Скрининг до недели 52**												
	Период скринига (-6 недель)	Неделя 0[a]	Неделя 4[a]	Неделя 8[a]	Неделя 12[a]	Неделя 16[a]	Неделя 20[a]	Неделя 24[a]	Неделя 28[a]	Неделя 36[a]	Неделя 44[a]	Неделя 52[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Процедуры и оценки													
Административные													
Информированное согласие/соглашение	X												
Анамнез/демографические данные	X												
Сбор данных об одновременно принимаемых лекарственных препаратах	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Критерии включения/исключения	X	X											
Исследуемый препарат													
В/в введение исследуемого препарата		X	X		X		X		X	X	X	X	
Безопасность													
Обзор систем	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Физический осмотр[c]	X			X			X			X			
Измерение массы тела	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Измерение роста	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Основные показатели жизнедеятельности	X	X[d]	X[d]	X	X[d]	X	X[d]	X	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X
Стандартные лабораторные анализы	X	X	X		X		X		X	X	X	X	X
Скрининг на вирус гепатита B	X												
Скрининг на вирус гепатита C	X												
Анализ QuantiFERON®-TB Gold[e]	X											X[f]	
Оценка на ТВ (опросник)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Рентгенография грудной клетки[g]	X												
Оценка на увеит[h]	X						X				X		X
Ревматоидный фактор	X												
ANA/антитела к дцДНК	X							X				X	X
Тест на беременность (сыворотка)[i]	X												
Тест на беременность (моча)[i]		X	X		X		X		X	X	X	X	
Оценка реакций на инфузию[j]		X	X		X		X		X	X	X	X	
Нежелательные явления	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 6.	**Скрининг до недели 52**												
	Период скринига (-6 недель)	Неделя 0[a]	Неделя 4[a]	Неделя 8[a]	Неделя 12[a]	Неделя 16[a]	Неделя 20[a]	Неделя 24[a]	Неделя 28[a]	Неделя 36[a]	Неделя 44[a]	Неделя 52[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Эффективность													
Оценка суставов	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Оценка JIA[k, l]		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
СРБ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Фармакокинетика													
Концентрация голимумаба[m, n]		2X	2X	X	2X		X		X			X	X
Популяционная ФК[o]		← X[o] →											
Иммуногенность													
Антитела к голимумабу[n]		X	X	X	X				X			X	X

a. Все запланированные визиты должны происходить в пределах ±3 дня от предполагаемого визита до недели 28 и ±1 неделя после недели 28 до недели 52.
b. Все субъекты, прекратившие введение исследуемого препарата до недели 52, но не отозвавшие согласие, должны вернуться в исследовательский центр для заключительного визита для анализа безопасности приблизительно через 8 недель после последней инфузии (раздел 10.2).
c. Включает обследование кожи при каждом физическом осмотре и определение стадии по Таннеру приблизительно каждые 6 месяцев.
d. Основные показатели жизнедеятельности следует получить до инфузии; через 15 и 30 минут (15-минутные интервалы в процессе инфузии); и через 60 и 90 минут (в течение 1-часового периода наблюдения после инфузии).
e. Кроме того, следует выполнять туберкулиновую кожную пробу в тех странах, где тест QuantiFERON®-TB Gold не одобрен/не зарегистрирован, или туберкулиновая кожная проба принята как обязательная местными органами здравоохранения.
f. Исследование не требуется для субъектов с латентным ТВ в анамнезе и субъектов, проходящих в данный момент лечение по поводу латентного ТВ или имеющих задокументированные данные о завершении соответствующего лечения.
g. Рентгенография грудной клетки в соответствии с региональными и национальными нормами в отношении начала применения иммуносупрессорных агентов у детей с JIA, подверженных риску ТВ.
h. Исследователь должен выполнять оценки (на основании физического осмотра и опроса) по меньшей мере каждые 6 месяцев для всех субъектов. Кроме того, все субъекты должны во время исследования проходить обследование офтальмологом/оптометристом с использованием щелевой лампы с интервалами (на основании подтипа JIA, результатов теста ANA, возраста начала JIA и продолжительности JIA), в соответствии с указаниями.
i. Все женщины с репродуктивным потенциалом (т. е. в постменархиальный период) должны иметь отрицательный результат анализа на беременность при скрининге и при всех визитах перед введением исследуемого лекарственного средства.
j. За субъектами наблюдают в течение по меньшей мере 60 минут после введения исследуемого препарата на предмет симптомов реакции на инфузию.
k. Оценки JIA включают следующее: общая оценка активности заболевания врачом, опросник по оценке состояния здоровья детей (CHAQ) и продолжительность утренней ригидности. **Оценку по CHAQ следует выполнять до проведения любых тестов, процедур или других консультаций для этого визита во избежание влияния на восприятие участников**.

Таблица 6.	**Скрининг до недели 52**												
	Период скринига (-6 недель)	Неделя 0[a]	Неделя 4[a]	Неделя 8[a]	Неделя 12[a]	Неделя 16[a]	Неделя 20[a]	Неделя 24[a]	Неделя 28[a]	Неделя 36[a]	Неделя 44[a]	Неделя 52[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]

l. Оценку по CHAQ должен провести родитель или лицо, осуществляющее уход; предпочтительно, чтобы при каждом визите оценку проводил один и тот же родитель или лицо, осуществляющее уход. Субъекты, возраст которых составляет от 15 до < 18 лет на момент вступления в исследование, могут выполнять оценку совместно с родителем/лицом, осуществляющим уход.

m. На посещениях на неделях 0, 4 и 12 отбирают 2 образца для определения сывороточных концентраций голимумаба (обозначено 2X на приведенном выше плане): Образец 1 отбирают непосредственно перед инфузией, а другой отбирают приблизительно через 1 час (например, ±10 минут) после завершения инфузии. При каждом из оставшихся визитов будут отбирать только 1 образец для определения сывороточной концентрации голимумаба, и его необходимо отбирать перед инфузией исследуемого препарата во время этого визита. Образцы, получаемые после инфузии, следует отбирать из руки, отличной от той, в которую введена линия для в/в инфузии, или линию в/в инфузии необходимо промывать от всех возможных остатков лекарственного препарата, и 1 мл крови следует отбирать и отбрасывать перед получением образца при использовании той же линии доступа, которую использовали для введения лекарственного средства.

n. Те же образцы сыворотки можно использовать для измерения концентрации голимумаба и обнаружения антител к голимумабу. В случае визитов с введением исследуемого препарата все образцы крови для оценки концентрации голимумаба и антител к голимумабу НЕОБХОДИМО собирать ПЕРЕД введением исследуемого препарата.

o. Один дополнительный образец для определения сывороточной концентрации голимумаба для определения популяционной ФК будет собран у всех субъектов в любой момент времени между неделями 0 и 8, отличный от визитов на неделе 0, 4 и 8; данный образец необходимо собрать по меньшей мере за 24 часа до или после введения исследуемого препарата, и его не следует отбирать при регулярном плановом визите (например, на неделе 8).

Сокращения: ANA — антинуклеарные антитела; CHAQ — опросник по оценке состояния здоровья детей; СРБ — С-реактивный белок; дцДНК — двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота; в/в — внутривенно; ФК — фармакокинетика; ТВ — туберкулез.

Таблица 7.	**С недели 60 до недели 156 (долгосрочная расширенная фаза)**													
	Неделя 60[a]	Неделя 68 [a]	Неделя 76 [a]	Неделя 84[a]	Неделя 92[a]	Неделя 100[a]	Неделя 108 [a]	Неделя 116[a]	Неделя 124[a]	Неделя 132[a]	Неделя 140[a]	Неделя 148[a]	Неделя 156[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Процедуры и оценки														
Административные														
Сбор данных об одновременно принимаемых лекарственных препаратах	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Исследуемый препарат														
В/в введение исследуемого препарата	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Безопасность														
Обзор систем	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 7.	**С недели 60 до недели 156 (долгосрочная расширенная фаза)**													
	Неделя 60[a]	Неделя 68 [a]	Неделя 76 [a]	Неделя 84[a]	Неделя 92[a]	Неделя 100[a]	Неделя 108 [a]	Неделя 116[a]	Неделя 124[a]	Неделя 132[a]	Неделя 140[a]	Неделя 148[a]	Неделя 156[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Физический осмотр[c]	X			X			X			X			X	
Измерение массы тела	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Измерение роста	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Основные показатели жизнедеятельности	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X
Стандартные лабораторные анализы			X			X			X			X		X
ANA/антитела к дцДНК			X			X			X			X		X
Анализ QuantiFERON®-TB Gold[e]						X[f]						X[f]		
Оценка на ТВ (опросник)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Рентгенография грудной клетки[g]	X													
Оценка на увеит[h]		X			X			X			X			X
Тест на беременность (моча)[i]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Оценка реакций на инфузию[j]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Нежелательные явления	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Эффективность														
Оценка суставов		X		X		X		X		X		X		X
Оценка JIA[k, l]		X		X		X		X		X		X		X
СРБ		X		X		X		X		X		X		X
Фармакокинетика														
Концентрация голимумаба[m]						X						X		X
Иммуногенность														
Антитела к голимумабу[m]						X						X		X

a. Все запланированные визиты должны быть совершены в течение ±1 недели от намеченной даты визита.
b. Все субъекты, прекратившие введение исследуемого препарата до недели 156, но не отозвавшие согласие, должны вернуться в исследовательский центр для заключительного визита для анализа безопасности приблизительно через 8 недель после последней инфузии (раздел 10.2).
c. Включает обследование кожи при каждом физическом осмотре и определение стадии по Таннеру приблизительно каждые 6 месяцев.
d. Основные показатели жизнедеятельности следует получить до инфузии; через 15 и 30 минут (15-минутные интервалы в процессе инфузии); и через 60 и 90 минут (в течение 1-часового периода наблюдения после инфузии).
e. Кроме того, следует выполнять туберкулиновую кожную пробу в тех странах, где тест QuantiFERON®-TB Gold не одобрен/не зарегистрирован, или кожная туберкулиновая проба принята как обязательная местными органами здравоохранения.
f. Исследование не требуется для субъектов с латентным ТВ в анамнезе и субъектов, проходящих в данный момент лечение по поводу латентного ТВ или имеющих задокументированные данные о завершении соответствующего лечения.

Таблица 7.	**С недели 60 до недели 156 (долгосрочная расширенная фаза)**													
	Неделя 60[a]	Неделя 68 [a]	Неделя 76 [a]	Неделя 84[a]	Неделя 92[a]	Неделя 100[a]	Неделя 108 [a]	Неделя 116[a]	Неделя 124[a]	Неделя 132[a]	Неделя 140[a]	Неделя 148[a]	Неделя 156[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
g. Рентгенография грудной клетки в соответствии с региональными и национальными нормами в отношении начала применения иммуносупрессорных агентов у детей с JIA, подверженных риску ТВ.														
h. Исследователь должен выполнять оценки (на основании физического осмотра и опроса) по меньшей мере каждые 6 месяцев для всех субъектов. Кроме того, все субъекты должны во время исследования проходить обследование офтальмологом/оптометристом с использованием щелевой лампы с интервалами (на основании подтипа JIA, результатов теста ANA, возраста начала JIA и продолжительности JIA), в соответствии с указаниями.														
i. Все субъекты женского пола с репродуктивным потенциалом (т. е. в постменархиальный период) должны иметь отрицательный результат анализа на беременность и при всех визитах перед введением исследуемого лекарственного средства.														
j. За субъектами наблюдают в течение по меньшей мере 60 минут после введения исследуемого препарата на предмет симптомов реакции на инфузию.														
k. Оценки JIA включают следующее: общая оценка активности заболевания врачом, опросник по оценке состояния здоровья детей (CHAQ) и продолжительность утренней ригидности. **Оценку по CHAQ следует выполнять до проведения любых тестов, процедур или других консультаций для этого визита во избежание влияния на восприятие участников.**														
l. Оценку по CHAQ должен провести родитель или лицо, осуществляющее уход; предпочтительно, чтобы при каждом визите оценку проводил один и тот же родитель или лицо, осуществляющее уход. Субъекты, возраст которых составляет от 15 до < 18 лет на момент вступления в исследование, могут выполнять оценку совместно с родителем/лицом, осуществляющим уход.														
m. Те же образцы сыворотки можно использовать для измерения концентрации голимумаба и обнаружения антител к голимумабу. В случае визитов с введением исследуемого препарата все образцы крови для оценки концентрации голимумаба и антител к голимумабу **НЕОБХОДИМО** собирать **ПЕРЕД** введением исследуемого препарата.														
Сокращения: ANA — антинуклеарные антитела; CHAQ — опросник по оценке состояния здоровья детей; СРБ — С-реактивный белок; дцДНК — двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота; в/в — внутривенно; ТВ — туберкулез.														

Таблица 8:	**С недели 164 до недели 252 (продолжение долгосрочной расширенной фазы)**												
	Неделя 164[a]	Неделя 172 [a]	Неделя 180[a]	Неделя 188[a]	Неделя 196[a]	Неделя 204[a]	Неделя 212[a]	Неделя 220[a]	Неделя 228[a]	Неделя 236[a]	Неделя 244[a]	Неделя 252[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Процедуры и оценки													
Административные													
Сбор данных об одновременно принимаемых лекарственных препаратах	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Исследуемый препарат													
В/в введение исследуемого препарата	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Безопасность													
Обзор систем	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Физический осмотр[c]			X			X			X			X	
Измерение массы тела	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Измерение роста	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Основные показатели жизнедеятельности	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X[d]	X	X

Таблица 8:	**С недели 164 до недели 252 (продолжение долгосрочной расширенной фазы)**												
	Неделя 164[a]	Неделя 172 [a]	Неделя 180[a]	Неделя 188[a]	Неделя 196[a]	Неделя 204[a]	Неделя 212[a]	Неделя 220[a]	Неделя 228[a]	Неделя 236[a]	Неделя 244[a]	Неделя 252[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]
Стандартные лабораторные анализы		X			X			X			X		X
ANA/антитела к дцДНК		X			X			X			X		
Анализ QuantiFERON®-TB Gold[e]					X[f]						X[f]		
Оценка на ТВ (опросник)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Рентгенография грудной клетки[g]	X												
Оценка на увеит[h]	X			X			X			X		X	X
Тест на беременность (моча)[i]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Оценка реакций на инфузию[j]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Нежелательные явления	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Эффективность													
Оценка суставов	X		X		X		X		X		X		X
Оценка JIA[k, l]	X		X		X		X		X		X		X
СРБ	X		X		X		X		X		X		X
Фармакокинетика													
Концентрация голимумаба[m]					X						X		X
Иммуногенность													
Антитела к голимумабу[m]					X						X		X

a. Все запланированные визиты должны быть совершены в течение ±1 недели от намеченной даты визита.
b. Все субъекты, прекратившие введение исследуемого препарата до недели 244, но не отозвавшие согласие, должны вернуться в исследовательский центр для заключительного визита с целью анализа безопасности приблизительно через 8 недель после последней инфузии (раздел 10.2).
c. Включает обследование кожи и определение стадии по Таннеру.
d. Основные показатели жизнедеятельности следует получить до инфузии; через 15 и 30 минут (15-минутные интервалы в процессе инфузии); и через 60 и 90 минут (в течение 1-часового периода наблюдения после инфузии).
e. Кроме того, следует выполнять туберкулиновую кожную пробу в тех странах, где тест QuantiFERON®-TB Gold не одобрен/не зарегистрирован, или кожная туберкулиновая проба принята как обязательная местными органами здравоохранения.
f. Исследование не требуется для субъектов с латентным ТВ в анамнезе и субъектов, проходящих в данный момент лечение по поводу латентного ТВ или имеющих задокументированные данные о завершении соответствующего лечения.

Таблица 8:	**С недели 164 до недели 252 (продолжение долгосрочной расширенной фазы)**												
	Неделя 164[a]	Неделя 172 [a]	Неделя 180[a]	Неделя 188[a]	Неделя 196[a]	Неделя 204[a]	Неделя 212[a]	Неделя 220[a]	Неделя 228[a]	Неделя 236[a]	Неделя 244[a]	Неделя 252[a]	Итоговый визит для последующего наблюдения за безопасностью[b]

g. Рентгенография грудной клетки в соответствии с региональными и национальными нормами в отношении начала применения иммуносупрессорных агентов у детей с JIA, подверженных риску ТВ.

h. Исследователь должен выполнять оценки (на основании физического осмотра и опроса) по меньшей мере каждые 6 месяцев для всех субъектов. Кроме того, все субъекты должны во время исследования проходить обследование офтальмологом/оптометристом с использованием щелевой лампы с интервалами (на основании подтипа JIA, результатов теста ANA, возраста начала JIA и продолжительности JIA), в соответствии с указаниями.

i. Все субъекты женского пола с репродуктивным потенциалом (т. е. в постменархиальный период) должны иметь отрицательный результат анализа на беременность и при всех визитах перед введением исследуемого лекарственного средства.

j. За субъектами наблюдают в течение по меньшей мере 60 минут после введения исследуемого препарата на предмет симптомов реакции на инфузию.

k. Оценки JIA включают следующее: Общая оценка активности заболевания врачом, опросник по оценке состояния здоровья детей (CHAQ) и продолжительность утренней ригидности. **Оценку по CHAQ следует выполнять до проведения любых тестов, процедур или других консультаций для этого визита во избежание влияния на восприятие участников.**

l. Оценку по CHAQ должен провести родитель или лицо, осуществляющее уход; предпочтительно, чтобы при каждом визите оценку проводил один и тот же родитель или лицо, осуществляющее уход. Субъекты, возраст которых составляет от 15 до < 18 лет на момент вступления в исследование, могут выполнять оценку совместно с родителем/лицом, осуществляющим уход.

m. Те же образцы сыворотки можно использовать для измерения концентрации голимумаба и обнаружения антител к голимумабу. В случае визитов с введением исследуемого препарата все образцы крови для оценки концентрации голимумаба и антител к голимумабу **НЕОБХОДИМО** собирать **ПЕРЕД** введением исследуемого препарата.

Сокращения: ANA — антинуклеарные антитела; CHAQ — опросник по оценке состояния здоровья детей; СРБ — С-реактивный белок; дцДНК — двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота; в/в — внутривенно; ТВ — туберкулез.

СОКРАЩЕНИЯ

ACR	Американская коллегии ревматологов
НЯ	нежелательное явление
АЛТ	аланинаминотрансфераза
ANA	антинуклеарные антитела
ARC	Комитет по изучению ожидаемых событий
AS	анкилозирующий спондилит
АСТ	аспартатаминотрансфераза
БЦЖ	бацилла Кальметта-Герена
β-ХГЧ	β-хорионический гонадотропин человека
BSA	площадь поверхности тела
CHAQ	Опросник по оценке состояния здоровья детей
CL/BSA	нормализованный по площади поверхности тела клиренс лекарственного средства
CL/F	кажущийся общий системный клиренс
CRF	индивидуальная регистрационная карта
СРБ	С-реактивный белок
DAS	Индекс активности заболевания
DMARD	изменяющее течение заболевания противоревматическое лекарственное средство
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
DRC	Комиссия по анализу данных
дцДНК	двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
eDC	электронная система регистрации данных
FDA	Управление по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов США
GCP	надлежащая клиническая практика
HAQ	опросник по оценке здоровья
HAQ-DI	Показатель инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья
HBsAg	поверхностный антиген ВГВ
ВГВ	вирус гепатита В
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
HLA-B27	человеческий лейкоцитарный антиген В27
HLA-DR4	человеческий лейкоцитарный антиген DR4
HLA-DR5	человеческий лейкоцитарный антиген DR5
HLA-DR8	человеческий лейкоцитарный антиген DR8
ICH	Международная конференция по гармонизации
IEC	Независимый комитет по этике
IL-1β	интерлейкин-1 бета
IL-6	интерлейкин-6
IRB	Экспертный совет учреждения
JADAS	Оценка активности ювенильного артрита
JIA	ювенильный идиопатический артрит
LFT	функциональный тест печени
LTE	долгосрочная расширенная часть исследования
мАт	моноклональное антитело
MedDRA	Медицинский словарь терминологии регулятивной деятельности
MTX	метотрексат

НПВС	нестероидное противовоспалительное лекарственное средство
ФД	фармакодинамика
PED	педиатрический
pJIA	полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит
ФК	фармакокинетика
PQC	жалоба на качество продукта
PPD	очищенное белковое производное
PRCSG	Совместная исследовательская группа по педиатрической ревматологии
PRINTO	Международная организация по исследованиям в области педиатрической ревматологии
PRO	сообщаемый (-ые) пациентом результат (-ы)
PsA	псориатический артрит
1 р/4 нед	каждые 4 недель
1 р/8 нед	каждые 8 недель
RA	ревматоидный артрит
RBC	эритроцит
RF	ревматоидный фактор
СНЯ	серьезное нежелательное явление
п/к	подкожно
SF-36	краткий опросник для оценки состояния здоровья из 36 пунктов
СИ	Международная система единиц
SOC	системно-органный класс
ТВ	туберкулез
ФНОα	фактор некроза опухоли альфа
URTI	инфекция верхних дыхательных путей
США	США
VAS	визуальная аналоговая шкала
vdH-S	модифицированная ван дер Хейде шкала Шарпа
V/F	кажущийся объем распределения
Vss	объем распределения в равновесном состоянии
WBC	лейкоциты

1. ВВЕДЕНИЕ

SIMPONI® (голимумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело (мАт) с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G1 (аллотип G1m[z]) и изотипом каппа легкой цепи. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149 802 до 151 064 дальтон. 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 образует высокоаффинные, стабильные комплексы как с растворимыми, так и с трансмембранными биоактивными формами фактора некроза опухоли человека альфа (ФНОα) с высокой аффинностью и специфичностью, что предотвращает связывание ФНОα с его рецепторами и нейтрализует биологическую

активность ФНОα. Связывания с другими лигандами суперсемейства ФНОα не наблюдали; в частности, голимумаб не связывает или не нейтрализует человеческий лимфотоксин. ФНОα синтезируется главным образом активированными моноцитами, макрофагами и Т-клетками в виде трансмембранного белка, который самоассоциируется с образованием биоактивного гомотримера, быстро высвобождающегося с поверхности клетки путем протеолиза. Связывание ФНОα с ФНО-рецепторами 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 затем стимулирует воспалительный ответ посредством активации пути каспаза-зависимого апоптоза и транскрипционных факторов ядерного фактора (NF)-κB 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 ФНОα была связана с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит (RA), а также с спондилоартропатиями, такими как псориатический артрит (PsA) и анкилозирующий спондилит (AS). ФНОα является важным медиатором суставного воспаления и структурного повреждения, характерных для этих заболеваний.

Блокирование активности ФНОα, как продемонстрировано в клинических исследованиях средств против ФНОα, может предотвращать вредные последствия, вызванные избыточным количеством ФНОα. Разработан препарат SIMPONI® (голимумаб) для внутривенного (в/в) введения для получения альтернативного способа введения (по сравнению с другими доступными средствами против ФНОα) и удобной схемы введения (т. е. каждые 8 недель [1 р/8 нед]) для пациентов с полиартикулярным JIA (pJIA).

1.1. Предпосылки создания изобретения

1.1.1. Ювенильный идиопатический артрит

Ювенильный идиопатический артрит представляет собой устанавливаемый методом исключения диагноз, который охватывает все формы артрита, начинающиеся до возраста 16 лет, длящиеся более 6 недель и имеющие неизвестную причину.[18] Он является наиболее распространенным хроническим ревматическим заболеванием у детей и классифицируется Международной лигой ревматологических ассоциаций (ILAR) на 7 подтипов (системный артрит, олигоартрит, отрицательный по ревматоидному фактору [RF] полиартрит, положительный по RF полиартрит,

связанный с энтезитом артрит, псориатический артрит, недифференцированный артрит), для которых характерны различные клинические проявления и особенности[16].

Гетерогенность JIA указывает на то, что в этиологии и патогенезе заболевания участвует множество факторов, и предполагается участие как генетических факторов, так и факторов окружающей среды. Сюда относится предположение об инфекции в качестве инициирующего механизма, связи между молекулами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) и не-HLA и развитием заболевания, а также иммунологические аномалии, приводящие к воспалению ткани и разрушению сустава. Роль инфекции в развитии заболевания по-прежнему не доказана.[18] Однако предполагается, что при JIA антигены локусов HLA-DR5 и HLA-DR8 играют роль вспомогательных элементов у девочек младшего возраста с олигоартикулярным артритом, HLA-DR4 участвует в RF-положительном полиартикулярном артрите у детей старшего возраста, а HLA-B27 вовлекается в олигоартикулярное заболевание у мальчиков старшего возраста[15,17].

Хотя этиология и патогенез JIA до сих пор неясны, вероятно, здесь играют роль те же самые типы клеток и базовые механизмы, что и при прогрессировании RA у взрослого человека.[15] Вовлечены такие клеточные элементы, как макрофаги, которые вырабатывают ряд воспалительных цитокинов и медиаторов воспаления. Цитокины макрофагов, такие как ФНОα, по-видимому, играют критически важную роль в индукции и поддержании хронических воспалительных процессов в суставах пациентов с RA, а также в системных проявлениях этого заболевания[6], хотя роль ФНОα в системном JIA менее убедительна.[3]

Некоторые исследования показали, что уровни воспалительных цитокинов (например, интерлейкина-1 бета [IL-1β], интерлейкина-6 [IL-6] и ФНОα), повышенные у взрослых людей с RA, также повышены в синовиальной жидкости и сыворотке пациентов с JIA[9,19,12,3,20]. В этих исследованиях также обнаружили разные профили цитокинов у пациентов с различными подгруппами JIA.

Ювенильный идиопатический артрит является важной причиной кратковременной и долговременной инвалидизации у детей[14], но новые достижения в терапии продемонстрировали клинически важные продвижения вперед. Исследования последних 10 лет показали, что от 40 до 60% пациентов, принимающих лекарственные препараты от JIA, при последующем наблюдении имеют неактивное заболевание или клиническую ремиссию. В последнее десятилетие функциональные результаты улучшаются, и серьезную функциональную инвалидизацию имеют от 2,5% до 10%

пациентов.[18] Однако к особенно серьезным осложнениям JIA относятся линейное подавление роста, остеопороз, локальные нарушения роста, синдром активации макрофагов и иридоциклит.[18]

Цель лечения при JIA заключается в достижении полного контроля заболевания, сохранении физической и психологической целостности ребенка и предотвращении любых долгосрочных последствий, связанных с заболеванием или его терапией. Основными направлениями лечения JIA являются НПВС, внутрисуставные и системные кортикостероиды, метотрексат (MTX) и другие DMARD. Появление биологических лекарственных препаратов обеспечило важный новый вариант терапии для лечения пациентов с JIA, резистентных к традиционным противоревматическим средствам.[18] В настоящее время утвержденные виды биологической терапии pJIA включают этанерцепт, адалимумаб, абатацепт и тоцилизумаб; канакинумаб и тоцилизумаб одобрены при системном JIA.

1.1.2. Клинические исследования голимумаба при ревматоидном артрите и ювенильном идиопатическом артрите

Было показано, что голимумаб, вводимый в виде п/к инъекции, эффективен у взрослых с RA, PsA, анкилозирующим спондилитом (AS) и язвенным колитом. Внутривенное введение голимумаба также доказало свою эффективность у взрослых с RA. Другие вещества против ФНОα оказались эффективными при лечении субъектов с JIA. Спонсор провел исследование основанных на BSA доз голимумаба для п/к введения (CNTO148JIA3001) с целью оценки преимуществ и рисков, связанных с п/к применением голимумаба при лечении множества подтипов JIA, включая ювенильный PsA.

Ниже описаны результаты исследования CNTO148ART3001 для в/в введения голимумаба у взрослых, а также результаты исследования CNTO148JIA3001 для п/к введения голимумаба у субъектов с JIA.

1.1.2.1. Внутривенное введение голимумаба для лечения ревматоидного артрита у взрослых

Основная цель рандомизированного плацебо-контролируемого многоцентрового двойного слепого исследования CNTO148ART3001 состояла в оценке клинической эффективности в/в введения голимумаба 2 мг/кг + MTX в сравнении с монотерапией MTX у взрослых субъектов с активным ревматоидным артритом несмотря на терапию MTX ревматоидным артритом. Было запланировано участие приблизительно 564 субъектов, и рандомизации подвергали 592 субъекта.

Субъектами были мужчины или женщины в возрасте 18 лет или старше с диагнозом RA в течение по меньшей мере 3 месяцев перед скринингом, у которых был активный RA, определяемый как ≥ 6 болезненных и ≥ 6 опухших суставов при скрининге и на исходном уровне, несмотря на сопутствующую терапию MTX. При скрининге субъекты должны были иметь результаты измерения С-реактивного белка (СРБ) ≥ 1,0 мг/дл (верхний предел нормы = 1,0 мг/дл) и быть RF-положительными.

Субъекты, рандомизированные в группу голимумаба, получали 2 мг/кг голимумаба внутривенно в течение 30-минутной ± 10 минут инфузии. Кроме того, в течение всего исследования у субъектов поддерживали стабильную дозу коммерческого MTX (от 15 мг до 25 мг/неделя).

Рандомизацию стратифицировали на основании уровня скрининга СРБ < 1,5 мг/дл или ≥ 1,5 мг/дл. Субъектов рандомизировали в соотношении 2:1 в группу голимумаб + MTX или плацебо + MTX на неделе 0, неделе 4, а затем каждые 8 недель (1 р/8 нед). Продолжительность лечения в течение всего исследования составила 100 недель с периодом последующего наблюдения за безопасностью 12 недель.

Всего 24-недельное исследование завершили 570 (96%) из 592 субъектов. Оставшиеся 22 (4%) субъектов прекратили исследование до недели 24. Большинство случаев прекращения были связаны с НЯ: 9 [2,3%] субъектов в группе, получавшей голимумаб + MTX, и 2 [1,0%] субъекта в группе, получавшей плацебо + MTX).

Существенно более высокая доля субъектов в группе, получавшей голимумаб + MTX (58,5%), достигла основного конечного показателя, то есть ответа ACR 20 на неделе 14, по сравнению с субъектами в группе, получавшей плацебо + MTX (24,9%, P < 0,001). Эффект лечения был согласованным у субъектов с СРБ ≥ 1,5 мг/дл или < 1,5 мг/дл при скрининге. Значимое различие в доле пациентов, ответивших на лечение ACR 20 между группами, получавшими голимумаб + MTX и плацебо + MTX, наблюдалось уже к неделе 2. Кроме того, были достигнуты основные вторичные показатели эффективности. Существенно более высокая доля субъектов в группе, получавшей голимумаб + MTX, на неделе 14 (81,3%) демонстрировала хорошие или умеренные эффекты по шкале индекса активности заболевания (DAS) 28 (по данным СРБ) по сравнению с субъектами в группе, получавшей плацебо + MTX (40,1%, P < 0,001).

На неделе 14 наблюдалось существенно большее улучшение по показателю инвалидизации по опроснику оценки состояния здоровья (HAQ-DI) у субъектов в группе, получавшей голимумаб + MTX (0,500), по сравнению с субъектами в группе,

получавшей плацебо + MTX (0,125, P < 0,001). Кроме того, наблюдалось значимое различие в клинически значимых улучшениях HAQ-DI (≥ 0,25) в группе голимумаба + MTX по сравнению с группой плацебо + MTX как на неделе 14 (68,4% по сравнению с 43,1% соответственно, P < 0,001), так и на неделе 24 (67,6% по сравнению с 45,2% соответственно, P < 0,001). Субъекты, получавшие голимумаб + MTX, демонстрировали существенно большую долю ответов ACR 50 на неделе 24 (34,9%) по сравнению с субъектами, получавшими плацебо + MTX (13,2%, p < 0,001).

Согласующийся положительный эффект лечения наблюдался в подгруппах, выделенных по демографии, исходным клиническим показателям и предыдущему использованию лекарственных препаратов для лечения RA, за исключением подгрупп с небольшим размером популяции (т. е. < 15 субъектов).

Статистически значимое большее улучшение общих показателей психического и физического компонента по краткому опроснику для оценки состояния здоровья из 36 пунктов (SF-36), и по всем 8 шкалам SF-36, наблюдались при лечении голимумабом + MTX по сравнению с лечением плацебо + MTX на неделе 12 (p < 0,001 для всех сравнений). Эти улучшения сохранялись до недели 24.

До недели 16 (плацебо-контролируемый период перед ранним выходом из исследования) в исследовании CNTO148ART3001, 43,7% субъектов в группе плацебо и 47,3% в группе голимумаба имели НЯ; самая высокая частота возникновения НЯ наблюдалась в системно-органном классе (SOC) инфекций и заражений, 20,8% и 24,3% в группах плацебо и голимумаба соответственно, при этом инфекции верхних дыхательных путей (URTI) были наиболее часто регистрируемыми НЯ 5,6% и 5,1% в группах плацебо и голимумаба соответственно. До недели 112 у 79,1% субъектов, получавших голимумаб, испытали НЯ; самая высокая частота НЯ была отмечена в SOC «Инфекции и заражения» (50,5%), а URTI был наиболее часто регистрируемым НЯ (11,5%).

1,0% субъектов в группе плацебо и 3,8% субъектов в группе голимумаба имели СНЯ до недели 16 в исследовании CNTO148ART3001. Частота возникновения СНЯ в каждом SOC составляла < 1,0%, и СНЯ наблюдались у не более 1 субъекта. До недели 112 у 18,2% субъектов, получавших голимумаб, испытали СНЯ; самая высокая частота СНЯ наблюдалась в SOC «Инфекции и заражения» (5,5%) и SOC «скелетно-мышечные расстройства и расстройства соединительной ткани» (3,4%), и наиболее часто регистрируемым СНЯ был RA (2,1%).

До недели 24 в исследовании CNTO148ART3001 умер 1 пациент; этот субъект был рандомизирован для лечения плацебо + MTX, никогда не получал голимумаб и умер от предполагаемого нарушения мозгового кровообращения (инсульт). До недели 112 в исследовании CNTO148ART3001 умерли еще 5 субъектов. Два субъекта, рандомизированные в группу лечения плацебо + MTX, умерли после перехода на голимумаб 2 мг/кг + MTX; причиной летального исхода была внезапная смерть (n = 1) и осложнения тяжелого обезвоживания, колита, вызванного *Clostridium difficile,* и фибрилляция предсердий (n = 1). Три субъекта, рандомизированные в группу лечения 2 мг/кг голимумаба + MTX, умерли в ходе исследования; отмеченной причиной летального исхода был острый абдоминальный синдром (позднее диагностирован как перитонеальный туберкулез [TB], n = 1), предположительный инфаркт миокарда (MI, n = 1) и септический шок в результате пиогенного абсцесса в легких, вызванного *Acinetobacter baumannii* (n = 1).

В исследовании CNTO148ART3001 злокачественные опухоли до 16 недели не были зарегистрированы. Перед получением исследуемого препарата в группе плацебо + MTX отмечен 1 случай не связанной с лечением аденокарциномы легкого. В течение периода с контролем плацебо (неделя 24) 1 злокачественная опухоль (рак молочной железы) была отмечена в группе голимумаба. До недели 112 были зарегистрированы 5 дополнительных злокачественных опухолей, включая базальноклеточную карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз у субъекта с семейным анамнезом хронического лимфоцитарного лейкоза, карцинома шейки матки in situ, болезнь Боуэна и базальноклеточная карцинома. Лимфомы до недели 112 не были зарегистрированы.

До недели 16 в исследовании CNTO148ART3001 у 0,8% субъектов в группе голимумаба отмечалась серьезная инфекция, включая аппендицит, бактеримию и интерстициальное легочное заболевание (его осложнения). Ни у одного из субъектов в группе плацебо серьезной инфекции не было. До недели 112 у 6,2% субъектов, получавших голимумаб, отмечалась серьезная инфекция. Серьезными инфекциями, возникающими у более одного субъекта, были пневмония (n = 5), UTI (n = 4) и рожистое воспаление (n = 2).

0,5% субъектов в группе плацебо и 2,5% субъектов в группе голимумаба имели реакцию на инфузию до недели 16 в исследовании CNTO148ART3001. До недели 112 у 3,9% субъектов, получавших голимумаб, наблюдалась реакция на инфузию, и реакции на инфузию в качестве осложнений наблюдались при 0,4% инфузий. Следует отметить, что все инфузии плацебо состояли из одного только 0,9% физиологического раствора, а

не из истинного соответствующего плацебо. Серьезные реакции на инфузию, требующие прекращения введения исследуемого препарата, не отмечены. Наблюдался случай анафилаксии, который не был связан с исследуемым лекарственным средством.

Медианная пиковая сывороточная концентрация голимумаба (т. е. концентрация голимумаба после инфузии) 41,56 мкг/мл наблюдалась на неделе 4 после в/в введения 2 мг/кг голимумаба на неделе 0, неделе 4 с последующим введением 1 р/8 нед (±1 неделя). Этот пик выше, чем наблюдаемый при п/к введении голимумаба 50 мг каждые 4 недели (1 р/4 нед). Медианная концентрация голимумаба в сыворотке крови у субъектов, получавших в/в голимумаб в дозе 2 мг/кг 1 р/8 нед с МТХ, составляла 0,28 мкг/мл на неделе 12 и 0,22 мкг/мл на неделе 20; эти уровни аналогичны уровням, отмеченным при п/к голимумаба 50 мг. Общий уровень воздействия голимумаба приблизительно в 3 раза превышает аналогичный показатель при п/к введении голимумаба в дозе 50 мг в течение сходного периода воздействия.

Данные по программе в/в введения голимумаба показали меньшее прогрессирование по рентгенографическим данным у субъектов, получавших голимумаб, по сравнению с субъектами, получавшими плацебо. На неделе 24 наблюдалось значимое различие в изменении относительно исходного уровня для общего балла по модифицированной ван дер Хейде шкале Шарпа (vdH-S) (плацебо + МТХ: 1,09 ± 3,194, голимумаб 2 мг/кг + МТХ: 0,03 ± 1,899 [$p < 0,001$]) между группой лечения, получавшей голимумаб + МТХ и плацебо + МТХ. Значимые отличия в пользу в/в введения голимумаба также наблюдались по балльной оценке изменений в плане эрозии и сужения суставной щели. Доля субъектов с прогрессированием по рентгенографическим данным на основе наименьшего обнаруживаемого изменения была существенно ниже у субъектов, получавших голимумаб + МТХ, по сравнению с плацебо + МТХ по общему баллу vdH-S ($p < 0,001$), а также по измерениям эрозии ($p = 0,001$) и сужения суставной щели ($p = 0,01$).

1.1.2.2. Подкожное введение голимумаба при ювенильном идиопатическом артрите

CNTO148JIA3001 представляло собой двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое исследование в параллельных группах с рандомизированной отменой п/к введения голимумаба в рассчитанной на основе BSA дозе 30 мг/м^2 (максимум 50 мг/доза) каждые 4 недели (1 р/4 нед) у субъектов детского возраста с активным pJIA, несмотря на текущее лечение с помощью МТХ. В исследуемую группу входили субъекты с pJIA, получающие МТХ, в возрасте от 2 лет до менее 18 лет, с по меньшей

мере 6 месячным анамнезом pJIA и активным артритом в ≥ 5 суставах. Все субъекты получали п/к голимумаб в течение части исследования, в которой проводилось активное лечение, с недели 0 до недели 16. На 16 неделе 30 пациентов, ответивших на лечение JIA ACR рандомизировали для получения плацебо или голимумаба в течение 32 недель; субъектов, рандомизированных в группу плацебо, у которых наблюдались обострения заболевания в течение этого 32-недельного периода, снова переводили на терапию голимумабом. Контролируемый плацебо период длился до недели 48, а долгосрочная расширенная фаза была запланировано с недели 48 до недели 248.

Всего план предусматривал участие 170 субъектов, и в итоге в исследовании зарегистрировали 173 субъекта. Все 173 субъекта были включены в анализы эффективности и безопасности на неделе 48. Девятнадцать из 173 субъектов прекратили применение исследуемого препарата до недели 16 (из-за: отсутствия эффективности [n = 14]; НЯ [n = 4]; отзыва согласия [n = 1]), и 154 субъекта вошли в фазу рандомизированной отмены (76 — в группу плацебо, а 78 — продолжение голимумаба).

Исходные характеристики заболевания у 173 набранных в исследование субъектов образовали популяцию с умеренным или тяжелым JIA, сравнимым с другими клиническими исследованиями средств против ФНОα при pJIA, за исключением численно более низких средних и медианных концентраций СРБ/ESR в исследовании CNTO148JIA3001.

Доля субъектов, которые представляют собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30 на неделе 16, составила 87,3%. Кроме того, доля пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 50, JIA ACR 70 и JIA ACR 90 на неделе 16 составила 79,2%, 65,9% и 36,4% соответственно.

Исследование не соответствовало основному конечному показателю и главным вторичным конечным показателям, поскольку доля субъектов, представляющих собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30 на неделе 16 и не продемонстрировавших обострения заболевания между неделей 16 и неделей 48 среди субъектов, рандомизированных в группы с продолжением приема голимумаба между неделями 16 и 48, существенно не отличались по сравнению с субъектами, рандомизированными в группы с приемом плацебо, в период с 16 по 48 неделю (59% по сравнению с 52,6%, p = 0,41). Все анализы чувствительности и главные вторичные конечные показатели продемонстрировали отсутствие статистически значимых различий между группами лечения. Спонсор прекратил долгосрочную расширенную

фазу исследования на ранней стадии, поскольку предварительно заданные конечные показатели эффективности не были выполнены.

Апостериорные анализы, в которых оценивали частоту обострений на основании уровней СРБ на неделе 0 в диапазоне 0,1–1,0 мг/дл, показали, что по существу среди субъектов с более высокими исходными уровнями СРБ, у субъектов, продолжавших терапию голимумабом, на неделе 16 было существенно меньше эпизодов обострения по сравнению с субъектами, рандомизированными в группу плацебо.

При анализе доли ответов JIA ACR на основании данных, наблюдаемых до недели 48 (с использованием в качестве исходного уровня недели 0 и со сравнением эффекта лекарственного средства/плацебо при каждом визите до недели 48), на 48 неделе были достигнуты доля ответов JIA ACR 30, составляющая от 89% до 95,9%, и доля ответов JIA ACR 90, составляющая от 53,4% до 56,2%. Улучшения в основных группах исследования до недели 48 были схожими при всех посещениях у субъектов, рандомизированных в группу голимумаба на неделе 16, по сравнению с субъектами, рандомизированными в группу плацебо на неделе 16, и все они представляли клинически значимое улучшение заболевания, например медианная процентная доля улучшения 94,6% и 95,1% по общей оценке активности заболевания врачом и медианная процентная доля улучшения 90,9% и 100% по количеству активных суставов.

Данные по фармакокинетике (ФК) и иммуногенности в исследовании CNTO148JIA3001 собирали до недели 48. У субъектов с pJIA, получавших п/к голимумаб 30 мг/м^2 и рандомизированных в группу активного лечения, медианные минимальные концентрации голимумаба на неделе 12, неделе 24 и неделе 48 составляли 1,16 мкг/мл, 1,12 мкг/мл и 0,95 мкг/мл соответственно, что указывает на сохранение равновесных уровней до недели 48. Кроме того, равновесные минимальные концентрации голимумаба были схожими в разных возрастных группах, квартилях массы тела, квартилях индекса массы тела и категориях массы тела у субъектов с pJIA. В целом, эти концентрации были аналогичны уровню воздействия ФК, наблюдаемому во взрослой популяции с активным RA (несмотря на MTX) в C0524T06, получавших п/к голимумаб, и, таким образом, это подтверждает гипотезу, что рассчитанная на основе BSA схема введения голимумаба 30 мг/м^2 п/к 1 р/4 нед была достаточной для получения концентраций, сравнимых с наблюдаемыми во взрослой популяции с RA, получавшей 50 мг п/к 1 р/4 нед. Кроме того, анализы ФК и анализы эффективности показали, что сходная эффективность (измеренная по ответу JIA ACR 30 и частоте

обострений) наблюдалась у пациентов с pJIA в 4 подгруппах по квартилям равновесной минимальной концентрации голимумаба. Кроме того, не наблюдалось видимых различий в ФК у субъектов с обострениями заболевания и без них.

Что касается иммуногенности, у 40,1% субъектов вырабатывались антитела к голимумабу по данным недавно разработанного иммуноанализа переносимости лекарственных средств. Новый иммунологический анализ переносимости лекарственных средств более чувствителен по сравнению с анализами, ранее использованными в исследованиях голимумаба при RA у взрослых, и это позволяет обнаруживать антитела к голимумабу, несмотря на регистрируемые сывороточные уровни голимумаба. Среди субъектов, рандомизированных в группу продолжения введения голимумаба 30 мг/м^2 п/к + МТХ, у 30,8% вырабатывались антитела к голимумабу; титры антител, как правило, были низкими. При оценке влияния иммуногенности на ФК, эффективность и безопасность было обнаружено, что положительный статус по антителам к голимумабу снижал равновесные минимальные концентрации голимумаба, если уровни титра составляли > 1:100. Однако влияние антител на эффективность было менее чувствительным из-за потребности в более высоких уровнях титров > 1:1000 для корреляции с заметным снижением эффективности. Поскольку лишь у около 5% субъектов с JIA вырабатывались антитела к голимумабу с титрами > 1:1000, было установлено, что иммуногенность не вносила вклада в отсутствие достижения основного конечного показателя в исследовании CNTO148JIA3001. Кроме того, положительный статус по антителам к голимумабу, по-видимому, не ассоциировался с более высокой частотой реакций в месте инъекции.

Доля субъектов, которые сообщили о НЯ до недели 48, составила 87,9%. Наиболее часто регистрируемым системно-органным классом НЯ были инфекции и заражения (67,1%), и они преимущественно представляли собой инфекции верхних дыхательных путей и назофарингит. Не было зарегистрировано заметных различий в НЯ между неделей 16 и неделей 48 у субъектов, рандомизированных в группу плацебо (82,9%), и субъектов, рандомизированных в группу продолжения лечения голимумабом (78,2%); однако следует отметить, что все субъекты в части исследования с рандомизированной отменой подвергались воздействию голимумаба в течение 16 недель перед повторной рандомизацией. Серьезные нежелательные явления были отмечены у 13,3% субъектов. Наиболее часто регистрируемым СНЯ было ухудшение JIA (6,4%). Серьезные инфекции были зарегистрированы у 2,9% субъектов (пневмония, инфекция мочевыводящих путей, опоясывающий герпес, инфекция верхних

дыхательных путей и пиелонефрит), и до недели 48 не было случаев летального исхода, злокачественных опухолей или демиелинизации. Активный ТВ и серьезные оппортунистические инфекции не отмечены. До недели 48 число субъектов с аномальными показателями аланинаминотрансферазы (АЛТ) (и без сопутствующего лечения по поводу латентного ТВ, которое может повлиять на функциональные тесты печени [LFT]), составило 29,5% (51/167), 39 из 51 субъектов имели < 3-кратное превышение верхней границы нормы (ULN).

Отмечено 2 субъекта с повышенным АЛТ до > 8 X ULN, но ни один субъект не соответствовал критериям закона Хая по гепатотоксичности. Субъекты не получали профилактику от ТВ; у одного из субъектов наблюдался исходный уровень АЛТ, который уже был аномальным. Всех субъектов с нарушениями LFT вели консервативно, изменяя дозирование MTX, но один из субъектов прекратил участие из-за повышенных LFT.

Частота инъекций с реакциями в месте инъекции до недели 48 составила 0,8%; наблюдали одно СНЯ в виде реакции, напоминающей сывороточную болезнь у субъекта, рандомизированного в группу плацебо, который возобновил лечение голимумабом.

Хотя исследование CNTO148JIA3001 не соответствовало своим конечным показателям, при анализе доли ответа JIA ACR по данным до недели 48 (с использованием в качестве исходного уровня недели 0 и со сравнением эффекта лекарственного средства/плацебо при каждом визите до недели 48), исследование показало потенциальную эффективность, которая могла быть достигнута при п/к введении голимумаба детям с pJIA. Таким образом, оно подтверждает исследование в/в введения голимумаба у субъектов с pJIA, которые имели недостаточный ответ на MTX.

1.2. Общее обоснование исследования

Было показано, что внутривенное введение голимумаба эффективно при лечении взрослых с RA (раздел 1.1.2.1). Другие биопрепараты, в том числе агенты против ФНОα, продемонстрировали эффективность при лечении субъектов с pJIA. Несмотря на то, что для лечения pJIA доступны биологические инфузионные терапии, в настоящее время не существует одобренных для внутривенного введения агентов против ФНОα для данного состояния. Для популяций пациентов, для которых может быть необходимым или обязательным более внимательное изучение врачом медикаментозной терапии, предлагаемая в настоящем исследовании для детей и изученная на взрослых с RA схема введения каждые 8 недель в виде 30-минутной

инфузии может быть уместной. В частности, в группе пациентов детского возраста уменьшение числа введений лекарственного средства (то есть переход на поддерживающую схему «каждые 8 недель») может обеспечивать большее удобство и меньшую боль (из-за меньшего числа в/в введений) по сравнению с другими биологическими агентами. Кроме того, переход на другой агент против ФНОα у пациента, у которого предыдущий агент против ФНОα был неэффективным, может обеспечивать дополнительное облегчение симптомов заболевания.

Основная цель данного исследования заключается в описании ФК в/в введения голимумаба при pJIA, а также оценке безопасности и эффективности в/в введения голимумаба у этих субъектов. Данное исследование также включает субъектов со множеством подтипов JIA, включая ювенильный PsA, а также субъектов, которым ранее вводили агент против ФНОα (до 30% от исследуемой популяции).

Исследование разработано с возможностью получения ФК-данных по ответу на рассчитанную по BSA дозу (80 мг/м^2, что, как ожидается, будет эквивалентно дозе 2 мг/кг у взрослых пациентов с RA весом 70 кг) в/в введения голимумаба субъектам с pJIA, которые имели неадекватный ответ на лечение MTX, а также предшествующее лечение нестероидными противовоспалительными агентами, кортикостероидами и/или агентами против ФНОα, для демонстрации их сходства с ответом, наблюдаемым при использовании рассчитанных по массе тела (2 мг/кг) доз в/в введения голимумаба взрослым субъектам с RA с недостаточным ответом на лечение MTX. Доза 80 мг/м^2 для субъектов с pJIA основана на дозе 2 мг/кг, изученной в исследовании CNTO148ART3001 у группы взрослых с RA.

2. ЦЕЛИ И ГИПОТЕЗА

2.1. Цели

Первичная цель

Основной целью данного исследования является оценка ФК после внутривенного введения голимумаба субъектам (в возрасте от 2 до менее 18 лет), у которых pJIA проявляется как ≥ 5 суставов с активным артритом, несмотря на MTX-терапию в течение ≥ 2 месяцев.

Вторичные цели

Вторичные цели данного исследования состоят в оценке в/в введения голимумаба у субъектов с pJIA в отношении фармакокинетики (ФК), эффективности (облегчения признаков и симптомов, физической функции и качества жизни), безопасности (НЯ, СНЯ и оценки лабораторных показателей) и иммуногенности (антитела к голимумабу).

2.2. Гипотеза

В данном исследовании не запланирована формальная проверка гипотезы.

3. ДИЗАЙН И ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Обзор схемы исследования

Это открытое многоцентровое исследование фазы 3 для оценки ФК, безопасности и эффективности в/в голимумаба у субъектов с активным pJIA, несмотря на текущее лечение МТХ. В исследуемую группу будут входить субъекты с pJIA, получающие МТХ, в возрасте от 2 лет до менее 18 лет, с по меньшей мере 3-месячным анамнезом pJIA и активным артритом в ≥ 5 суставах. Приблизительно 120 субъектов будут включены в исследование на неделе 0, чтобы гарантировать, что приблизительно 100 субъектов останутся в исследовании на неделе 52. Ожидается, что схема включения в исследование обеспечит получение популяции субъектов, в которой возраст приблизительно 10% составляет от 2 до 6 лет, приблизительно 20% — от 6 до 12 лет, а приблизительно 70% — от 12 до 18 лет.

Все субъекты будут получать 80 мг/м^2 голимумаба (максимальная однократная доза 240 мг) в виде в/в инфузии, которую вводят в течение 30 ± 10 минут на неделях 0, 4 и каждые 8 недель (1 р/8 нед; ±3 дня) до недели 28 и впоследствии 1 р/8 нед (±1 неделя) до недели 244. Площадь поверхности тела будет рассчитана на основании роста и массы тела субъекта, измеряемых при каждом визите, и рассчитанная по BSA доза голимумаба будет корректироваться по мере необходимости для сохранения дозы на уровне 80 мг/м^2. Субъекты также будут получать коммерческий МТХ еженедельно до недели 28 в одной и той же дозе, рассчитанной на основе BSA (от 10 до 30 мг/м^2 МТХ в неделю для субъектов с BSA < 1,67 м^2 или по меньшей мере 15 мг МТХ в неделю для субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2) на момент включения в исследование, как описано в разделе 6.2.

Следует прилагать все усилия для поддержания субъектов на дозе 80 мг/м^2 голимумаба, рассчитанной по BSA, и снижение значения ниже, или повышение выше 80 мг/м^2, или сокращение интервала между введениями дозы (например, с 8 недель до 6 недель) ни при каком визите не допускается.

Это открытое исследование, в котором все субъекты получают одинаковую в/в дозу голимумаба, рассчитанную по BSA. Данные о безопасности будет регулярно оценивать медицинский наблюдатель исследования. Таким образом, не будет установлен внешний комитет по мониторингу данных.

Схема исследования представлена на фиг. 18.

3.1.1. от 0 недели до 28 недели

До недели 28 субъектов будут отслеживать и будут оценивать активность заболевания и безопасность в исследовательском центре каждые 4 недели.

Если < 50% исследуемой популяции достигнет надлежащего ответа на лечение (ответ по схеме Американской коллегии ревматологов для детей 30% [JIA ACR 30]) на неделе 28, исследование будет прекращено.

После того как все субъекты выполнят визит на неделе 28, база данных будет заблокирована для оценки ФК, безопасности и эффективности. В настоящее время для недели 52 планируется дополнительная блокировка базы данных для оценки безопасности, эффективности и ФК. Окончательная блокировка базы данных будет выполнена на неделе 252.

В принимаемые параллельно лекарственные препараты (т. е. MTX, другие DMARD, кортикостероиды и НПВС) не следует вносить никаких изменений в отношении увеличения или уменьшения дозы, кроме параметров, приведенных в разделе 8 (например, не более 10 мг/сут преднизона или не более 0,20 мг/кг/сут, в зависимости от того, какое значение ниже) и/или способа введения между неделями 0 и 28, если только не существует проблемы с безопасностью (например, повышенные функциональные тесты печени), требующей изменений в принимаемых параллельно лекарственных препаратах.

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

Когда субъект выходит из исследования до его завершения, причина исключения должна быть отражена в индивидуальной регистрационной карте (CRF) и в первичном документе. Исследуемое лекарственное средство, предназначенное для выбывшего субъекта, не может быть назначено другому субъекту. Для выбывших субъектов замена не предусмотрена.

3.1.2. От 28 недели до 52 недели

С недели 28 до недели 52 инфузии продолжают выполнять каждые 8 недель (±1 неделя); однако субъектов будут активно отслеживать в исследовательском центре, а активность заболевания и безопасность будут оценивать в исследовательском центре каждые 8 недель, а не каждые 4 недели между неделями 0 и 28. Как отмечалось выше,

после 28 недели субъектам будет разрешено изменение/добавление MTX, других DMARD, кортикостероидов и НПВС, как описано в разделе 8.

3.1.3. От 52 недели до 252 недели (долгосрочная расширенная фаза)

Субъекты, завершившие исследование на неделе 52, будут иметь возможность участвовать в долгосрочной расширенной фазе (LTE) этого исследования. Субъектам, которые отказываются от участия в долгосрочной расширенной фазе, будет предложено выполнить дополнительный визит для последующего наблюдения за безопасностью через 8 недель после последнего введения исследуемого препарата.

В течение долгосрочной расширенной фазы все субъекты продолжат получать голимумаб 1 р/8 нед (±1 неделя) до недели 244. Для детей, прошедших полный период исследования в течение 252 недель, и для которых доказана польза, но препарат отсутствует в продаже по показаниям рЈІА (или пациент не имеет страховки для оплаты лекарственного препарата), спонсор будет продолжать предоставлять голимумаб для в/в введений. В период между неделей 52 и неделей 252 активность заболевания будут отслеживать, оценивать и документировать в CRF каждые 16 недель; инфузии и измерения параметров безопасности будут проводить каждые 8 недель в исследовательском центре.

Как отмечалось выше, после недели 28 субъектам будет разрешено изменение/добавление MTX, других DMARD, кортикостероидов и НПВС, включая увеличение или уменьшение дозировки, рассчитанное на основе BSA (если это уместно) для этих классов агентов, как описано в разделе 8.

Ожидается, что все субъекты, которые совершили посещение на неделе 244, примут участие в посещении для последующего наблюдения за безопасностью на неделе 252. Ожидается, что субъекты, прекратившие применение исследуемого препарата в любое время до недели 244, также вернутся для визита последующего наблюдения за безопасностью приблизительно через 8 недель после последнего введения исследуемого препарата.

Итоговая блокировка базы данных будет выполнена на неделе 252.

3.1.4. Определение завершения исследования

Завершение исследования определяется как последняя оценка для последующего наблюдения для последнего субъекта в долгосрочной расширенной фазе.

3.2. Обоснование дизайна исследования

3.2.1. Маскировка, контроль, фаза/периоды исследования, группы лечения

Это неконтролируемое открытое исследование для оценки ФК в/в введения голимумаба у субъектов с pJIA, причем все субъекты получают одинаковую рассчитанную по BSA дозу голимумаба в/в до недели 52. Субъекты, завершившие исследование на неделе 52, будут иметь возможность участвовать в долгосрочной расширенной фазе (LTE) этого исследования до недели 252.

3.2.2. Выбор дозы

В отличие от доз лекарственного препарата для взрослых, дозы лекарственного препарата для детей (парентеральные) обычно рассчитывают по отдельности или на основе массы (мг/кг), или по BSA (мг/м^2), для контроля вариабельности ФК, наблюдаемой у детей разного возраста, поскольку в созревающих системах органов происходят изменения. [10,22]Успешный результат экстраполяции доз у взрослых субъектов на детей посредством нормализации дозы, рассчитанной по BSA, для других одобренных средств против ФНОα (например, адалимумаба и этанерцепта) подтверждает предположение, что клинические ответы на средства против ФНОα при ревматоидном заболевании будут сходными у взрослых и детей. То есть после учета различий в ФК, присущих взрослым и детям, можно ожидать сходных ответов на лекарственные средства при сходном уровне воздействия лекарственного средства как у взрослых, так и у детей.

Результаты исследования фазы 3 на взрослых с RA для в/в введения (CNTO148ART3001) до 24 недель показали, что введение голимумаба 2 мг/кг, на неделе 0, неделе 4 и 1 р/8 нед (±1 неделя) после этого является оптимальной схемой дозирования для лечения RA у большинства взрослых. Для ребенка голимумаб 80 мг/м^2 (2 мг/кг/1,73 м^2) будет приблизительно эквивалентен 2 мг/кг для взрослого субъекта весом 70 кг (с BSA 1,73 м^2). Таким образом, в текущем исследовании (CNTO148JIA3003) для оценки безопасности и эффективности голимумаба в группе с pJIA была выбрана доза 80 мг/м^2.

3.2.3. Обоснование

Схема открытого исследования в/в введения голимумаба в популяции pJIA основана на данных исследований других средств против ФНОα у взрослых с RA и pJIA, данных по ФК и эффективности из исследования спонсора о в/в введении голимумаба взрослым с RA (CNTO148ART3001), опыте спонсора с п/к введением голимумаба при pJIA (CNTO148JIA3001) и обратной связи от международной организации по исследованиям в области педиатрической ревматологии (PRINTO) и Совместной исследовательской группы по педиатрической ревматологии (PRCSG).

Спонсор будет использовать данные ФК, полученные в предлагаемом открытом исследовании CNTO148JIA3003, чтобы экстраполировать данные о ФК у взрослых пациентов с RA в рамках исследования CNTO148ART3001, которое являлось опорным исследованием, послужившим основой для одобрения в/в введения голимумаба (SIMPONI ARIA/SIMPONI для внутривенного введения) у взрослых пациентов с RA. Кроме того, будут собраны данные об эффективности (ФД) для изучения ответа на поддерживающего воздействие.

4. ПОПУЛЯЦИЯ СУБЪЕКТОВ

Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будут проводить в течение 6 недель до введения исследуемого лекарственного средства.

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.

Обсуждение статистических методов выбора субъекта приведено в разделе 11.2 «Определение размера выборки».

Отклонения от критериев включения и исключения не допускаются, поскольку они могут потенциально нарушать научную целостность исследования, приемлемость для регуляторных органов или безопасность субъекта. Следовательно, необходимо соблюдать критерии, указанные в протоколе.

В данное исследование будут включены приблизительно 120 субъектов. Зарегистрированные в исследовании субъекты, прекратившие исследуемое лечение или отказавшиеся от участия в исследовании, не будут заменены новыми субъектами.

Повторную проверку аномального отсеянного значения, приводящего к исключению, допустимо проводить только один раз в ходе непланового визита в течение периода скрининга для повторной оценки пригодности для участия в исследовании. Эту возможность следует рассматривать только в том случае, если не ожидается влияния на безопасность субъекта.

4.1. Критерии включения

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

1. Возраст субъектов должен составлять от 2 лет до менее 18 лет, а масса тела — > 15 кг во время скрининга и на неделе 0.
2. Диагностику необходимо проводить в соответствии с диагностическими

критериями JIA ILAR, и заболевание должно начаться до 16-летия субъекта.

3. Активный JIA одного из следующих подтипов:
   a. положительный или отрицательный по ревматоидному фактору pJIA в течение ≥ 3 месяцев перед скринингом, или
   b. системный JIA без системных симптомов в течение ≥ 3 месяцев, но с полиартритом в течение ≥ 3 месяцев перед скринингом, или
   c. расширенный олигоартикулярный JIA ≥ 3 месяцев перед скринингом, или
   d. полиартикулярный ювенильный псориатический артрит ≥ 3 месяцев перед скринингом, или
   e. связанный с энтезитом артрит ≥ 3 месяцев перед скринингом.
4. Неудовлетворительный или неадекватный ответ на по меньшей мере 2-месячный курс MTX до скрининга.
5. Субъекты должны иметь ≥ 5 суставов с активным артритом при скрининге и на неделе 0 в соответствии с критериями ACR (т. е. сустав с припухлостью или в отсутствие припухлости, ограниченный диапазон движений, связанный с болью при движении или чувствительностью).
6. У субъектов при скрининге уровень СРБ должен быть ≥ 0,1 мг/дл, за исключением приблизительно 30% исследуемой популяции.
7. Субъекты должны иметь активный pJIA, несмотря на текущее пероральное, внутримышечное или подкожное применение MTX в течение ≥ 2 месяцев перед скринингом. Для субъектов с BSA < 1,67 $м^2$ доза MTX должна составлять от 10 до 30 мг/$м^2$ в неделю, и быть стабильной в течение ≥ 4 недель перед скринингом. Для субъектов с BSA ≥ 1,67 $м^2$ доза MTX должна быть как минимум 15 мг/неделя и должна быть стабильной в течение ≥ 4 недель до скрининга. В ситуациях, когда документально подтверждена непереносимость доз >10 мг/$м^2$ еженедельно (для субъектов с BSA < 1,67 $м^2$)или ≥ 15 мг/неделя (для субъектов с BSA ≥ 1,67 $м^2$); или если задокументированные нормы страны или центра запрещают использовать дозу ≥ 15 мг MTX в неделю у субъектов с BSA ≥ 1,67 $м^2$, субъекты могут быть введены в исследование, имея более низкую дозу MTX.
8. При использовании кортикостероидов их следует принимать в стабильной дозе ≤ 10 мг/сут преднизонового эквивалента или 0,20 мг/кг/сут (в

зависимости от того, что ниже) в течение ≥ 2 недель перед первым введением исследуемого препарата. Если кортикостероиды в текущий момент не используют, субъект не должен получать кортикостероиды в течение по меньшей мере 2 недель перед введением первой дозы. Субъекты с системным началом JIA, но без системных симптомов, должны получать стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 3 дней перед скринингом.

9. При использовании НПВС стабильную дозу нужно применять в течение ≥ 2 недель до скрининга. Если НПВС в настоящее время не используют, их не нужно принимать в течение по меньшей мере 2 недель перед скринингом.

10. Субъекты считаются пригодными для участия в соответствии со следующими критериями скрининга по ТВ:

a. перед скринингом в анамнезе отсутствуют латентный или активный ТВ. Исключение сделано для субъектов, которые в настоящее время получают лечение по поводу латентного ТВ без признаков активного ТВ, или у которых в анамнезе имеется латентный ТВ и задокументированное завершение надлежащего лечения по поводу латентного ТВ в течение 3 лет перед первым введением исследуемого препарата. Исследователь несет ответственность за проверку адекватности предыдущего лечения туберкулеза и предоставление надлежащей документации.

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

c. В последнее время не было близкого контакта с человеком с активным ТВ или, при наличии такого контакта, участник будет направлен к врачу, специализирующемуся на ТВ, для дополнительного обследования и, если это необходимо, проведено надлежащее лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого препарата.

d. В течение 6 недель перед первым введением исследуемого препарата получен отрицательный результат теста QuantiFERON® (TB Gold) или получен впервые выявленный положительный результат QuantiFERON® (TB Gold), в котором был исключен активный ТВ и для которого было начато надлежащее лечение латентного ТВ (раздел 9.1.2) перед первым введением исследуемого препарата. В течение 6

недель перед первым введением исследуемого препарата необходимо, чтобы был получен отрицательный результат туберкулиновой кожной пробы, или получен впервые выявленный положительный результат туберкулиновой пробы, при котором был исключен активный ТВ и для которого было начато надлежащее лечение латентного ТВ перед первым введением исследуемого препарата, если тест QuantiFERON® (TB Gold) не одобрен/не зарегистрирован в конкретной стране, или если туберкулиновая кожная проба сделана местными органами здравоохранения обязательной.

e. Неопределенные результаты следует расценивать, как описано в разделе 9.1.2. 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. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь.

f. Тест QuantiFERON® (TB Gold) и туберкулиновая кожная проба не требуются при скрининге субъектов с латентным ТВ в анамнезе и продолжающимся лечением латентного ТВ, или при наличии в документации информации о завершении адекватного лечения, как описано выше; субъекты с документально подтвержденным проведением адекватного лечения, как описано выше, **не** нуждаются в проведении дополнительного лечения латентного ТВ.

g. Если национальные или местные нормативы не рекомендуют проводить рентгенографию грудной клетки в качестве обязательного скрининга перед началом лечения средствами против ФНОα, рентгенограмму грудной клетки (в задне-передней проекции) необходимо выполнить в течение 3 месяцев перед первым введением исследуемого препарата, и по результатам ее прочтения

квалифицированным рентгенологом, на ней не должно быть признаков активного ТВ или застарелого неактивного ТВ. Рентгеновские снимки грудной клетки (в задне-передней проекции и в боковой проекции) необходимо выполнить в рамках процесса скрининга во всех случаях, когда туберкулиновая кожная проба, и/или тест QuantiFERON® (TB Gold) оказались положительными на ТВ.

11. Субъекты должны быть стабильными с медицинской точки зрения на основании физического осмотра, анамнеза и определения основных показателей жизнедеятельности, проведенных при скрининге. При наличии аномалий они должны соответствовать базовым заболеваниям в исследуемой популяции.

12. Девушки должны либо:

- не обладать детородным потенциалом: пременархия; быть необратимо стерилизованными (например, перевязка маточных труб, гистерэктомия, двусторонняя сальпингэктомия); или быть иным образом неспособными к беременности.

  ИЛИ

- при детородном потенциале и сексуальной активности, должны использовать высокоэффективный способ контрацепции, соответствующий местным правовым нормам в отношении применения способов контроля деторождения для субъектов, участвующих в клинических исследованиях, например использовать утвержденные для применения пероральные, инъекционные или имплантируемые гормональные средства контрацепции; размещение внутриматочных спиралей (IUD) или внутриматочных систем (IUS); барьерные способы: презерватив со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или окклюзионный колпачок (диафрагма или цервикальный/вагинальный колпачок) со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием; стерилизацию мужчины-партнера (вазэктомированный партнер должен быть единственным партнером для данного субъекта); истинное воздержание (если это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни субъекта, и по усмотрению исследователя или местных

норм). Девушки с детородным потенциалом должны дать согласие не выступать донорами яйцеклеток (женских половых клеток, ооцитов) для искусственного оплодотворения во время исследования и в течение 6 месяцев после получения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Примечание: если детородный потенциал изменяется после начала исследования (например, девушка, которая не была гетеросексуально активной, становится активной, у девушки с пременархией появляются менструации), девушка должна начать применять высокоэффективный способ контрацепции, как описано выше.

13. Девушки с детородным потенциалом должны иметь отрицательный тест на β-хорионический сывороточный гонадотропин человека (β-ХГЧ) при скрининге и отрицательный тест мочи на беременность при каждом визите в рамках исследования в центр, где должна происходить инфузия голимумаба.

14. Юноши должны практиковать воздержание, или, при половой жизни с девушкой с детородным потенциалом и при отсутствии вазэктомии, должны дать согласие на использование барьерного способа контрацепции, например презерватива со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или использование партнершей окклюзионного колпачка (диафрагмы или цервикального/вагинального колпачка) со спермицидной пенкой/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием, и всем юношам также запрещается выступать в качестве донора спермы в процессе исследования и в течение 6 месяцев после последней дозы исследуемого препарата.

15. Скрининговые лабораторные тесты субъектов должны соответствовать следующим критериям:

a. Гемоглобин: $\geq$ 8,0 г/дл (СИ: $\geq$ 80 г/л; девочки и мальчики, возраст от 2 до 11 лет)

$\geq$ 8,5 г/дл (СИ: $\geq$ 85 г/л; девушки, возраст от 12 до 18 лет)

$\geq$ 9,0 г/дл (СИ: $\geq$ 90 г/л; юноши, возраст от 12 до 18 лет)

b. Лейкоциты $\geq 3,0 \times 10^3$ клеток/мкл (СИ: $\geq 3,0 \times 10^9$ клеток/л)

c. Нейтрофилы $\geq 1,5 \times 10^3$ клеток/мкл (СИ: $\geq 1,5 \times 10^9$ клеток/л)

d. Тромбоциты $\geq 140 \times 10^3$ клеток/мкл (СИ: $\geq 140 \times 10^9$ клеток/л)

e. Сывороточные уровни трансаминазы с превышением верхней границы

нормы центральной лаборатории не более чем в 1,2 раза:

- Аспартатаминотрансфераза (АСТ)
    - ≤ 67 МЕ/Л (девочки, возраст от 2 до < 4 лет);
    - ≤ 58 МЕ/Л (девочки, возраст от 4 до < 7 лет);
    - ≤ 48 МЕ/Л (девочки, возраст от 7 до < 18 лет);
    - ≤ 83 МЕ/Л (мальчики, возраст от 2 до < 4 лет);
    - ≤ 71 МЕ/Л (мальчики, возраст от 4 до < 7 лет);
    - ≤ 48 МЕ/Л (юноши, возраст от 7 до < 18 лет).
- Аланинаминотрансфераза (АЛТ)
    - ≤ 41 МЕ/Л (девочки, возраст от 2 до < 18 лет);
    - ≤ 41 МЕ/Л (мальчики, возраст от 2 до < 10 лет);
    - ≤ 52 МЕ/Л (юноши, возраст от 10 до <18 лет).

f. Уровень креатинина в сыворотке крови не превышает:

- 0,5 мг/дл (СИ: 44 мкмоль/л; возраст от 2 до 5 лет)
- 0,7 мг/дл (СИ: 62 мкмоль/л; возраст от 6 до 10 лет)
- 1,0 мг/дл (СИ: 88 мкмоль/л; возраст от 11 до 12 лет)
- 1,2 мг/дл (СИ: 106 мкмоль/л; возраст ≥ 13)

16. Субъекты должны пройти все иммунизации в соответствии с действующими местными рекомендациями по иммунизации субъектов с иммуносупрессией до недели 0.

17. Родитель или опекун должен сопровождать субъекта при каждом визите в рамках исследования до тех пор, пока субъект не достигнет возраста 18 лет.

18. Субъект и его/ее родитель (если применимо) должны иметь возможность соблюдать график визитов в рамках исследования, понимать и соблюдать другие требования протокола.

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

20. Каждый субъект (или его законный представитель) должен подписать форму ICF, в которой указано, что он или она понимает цель и процедуры, которые требуются для исследования, и хочет принять участие в исследовании. Подтверждение также требуется от детей, способных понять характер исследования (как правило, возраст 7 лет и старше, и в соответствии с местными нормами), как описано в разделе 16.2.3, информированное согласие.

4.2. Критерии исключения

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

Одновременный или предшествующий прием следующих видов медикаментозной терапии:

1. Субъект начал принимать DMARD и/или иммуносупрессорную терапию в пределах 4 недель перед первым введением исследуемого препарата.
2. Субъект получал внутрисуставное, внутримышечное или внутривенное введение кортикостероидов (включая внутримышечное введение кортикотропина) в пределах 4 недель перед первым введением исследуемого препарата.
3. Субъект получал лечение любым терапевтическим агентом, нацеленным на уменьшение уровня IL-12 или IL-23, включая, без ограничений, устекинумаб и ABT-874 в пределах 3 месяцев перед первым введением исследуемого препарата.
4. Субъект получал лечение натализумабом, эфализумабом или терапевтическими агентами, которые уменьшают количество B- или T-клеток (например, ритуксимабом, алемтузумабом или висилизумабом) в пределах 12 месяцев перед первым введением исследуемого препарата, или имеет признаки устойчивого уменьшения числа целевых лимфоцитов после получения любого из этих агентов.
5. Субъект получал лечение алефацептом в пределах 3 месяцев перед первым введением исследуемого препарата.
6. Субъект получал лечение абатацептом в пределах 8 недель перед первым введением исследуемого препарата.
7. Субъект получал лечение лефлуномидом в пределах 4 недель перед первым введением исследуемого препарата (независимо от проведения процедуры элиминации лекарственного средства) или субъект получал лефлуномид в период от 4 до 12 недель перед первым введением исследуемого препарата и не проходил процедуры элиминации лекарственного средства.
8. Субъект получал лечение цитотоксическими агентами,

включая циклофосфамид, азотистый иприт, хлорамбуцил или другие алкилирующие агенты.

9. Субъект получил или предположительно получил вакцинацию любой живой вирусной или живой бактериальной вакциной в пределах 3 месяцев перед первым введением исследуемого препарата и до 3 месяцев после введения последнего исследуемого препарата.

10. Субъект проходил вакцинацию БЦЖ в пределах 12 месяцев до скрининга или планировал получать вакцинацию БЦЖ в течение 12 месяцев после последнего введения исследуемого лекарственного средства.

11. Субъект получал препарат IL-1RA (анакинра) в течение 1 недели перед первым введением исследуемого препарата.

12. Ранее субъект получал лечение более чем 2 терапевтическими агентами, нацеленными на снижение уровня ФНОα, включая, без ограничений, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб и цертолизумаб пегол.

13. Если субъект ранее проходил лечение средством против ФНОα, причиной прекращения введения средства против ФНОα не должно быть тяжелое или серьезное нежелательное явление, соответствующее классу средств против ФНОα.

14. Субъект получал адалимумаб или цертолизумаб пегол в пределах 6 недель или получал этанерцепт в пределах 4 недель перед введением первой дозы исследуемого препарата.

15. Субъект получал инфликсимаб или тоцилизумаб в пределах 8 недель перед первым введением исследуемого препарата.

16. Субъект когда-либо получал голимумаб в/в или п/к.

17. Субъект получал ингибитор JAK-киназы (JAK), включая, без ограничений, тофацитиниб, в пределах 2 недель перед введением первой дозы исследуемого препарата.

18. Субъект получал канакинумаб в пределах 4 месяцев перед введением первой дозы исследуемого препарата.

19. Субъект имеет в настоящее время побочные эффекты, связанные с МТХ, или состояние, которые препятствуют лечению при

помощи МТХ, включая, без ограничений, цирроз печени, фиброз печени, устойчивое повышение АЛТ и АСТ (более 3 из 5 анализов повышены в течение периода 6 месяцев), вызванный МТХ пневмонит, тяжелые язвы слизистой оболочки, хроническая тошнота, рвота/диарея, признаки клинически значимого подавления функции костного мозга, сильные головные боли, сильные костные боли или травматические переломы.

20. Субъект получал экспериментальное лекарственное средство (включая экспериментальные вакцины) или применял инвазивное экспериментальное медицинское устройство в пределах 3 месяцев или 5 периодов полувыведения, в зависимости от того, что больше, до запланированного первого введения исследуемого лекарственного средства, или в настоящее время участвует в научном исследовании.

Инфекции или предрасположенность к инфекциям

21. Перед скринингом у субъекта в анамнезе имеется активная гранулематозная инфекция, включая гистоплазмоз или кокцидиоидомикоз. Информацию, касающуюся пригодности к участию в исследовании при латентном ТВ в анамнезе см. в разделе критериев включения (раздел 4.1).

22. Положительные тесты субъекта на вирус гепатита В.

23. Субъект является серологически положительным по антителам к вирусу гепатита С (ВГС).

24. У субъекта имеется в анамнезе инфекция вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

25. У субъекта имелась нетуберкулезная микобактериальная инфекция или оппортунистическая инфекция (например, цитомегаловирус, пневмоцистит или аспергиллез) в пределах 6 месяцев перед скринингом.

26. В анамнезе субъекта имеется инфицированный протез сустава, или он получал антибиотики по поводу предполагаемой инфекции протеза сустава, если только протез не был удален или заменен.

27. У субъекта имеется или имелась серьезная инфекция (включая, без ограничений, гепатит, пневмонию или пиелонефрит), или он был

госпитализирован или получал в/в антибиотики для лечения инфекции в пределах 2 месяцев до введения первого исследуемого препарата.

28. У субъекта имеется в анамнезе хроническое или рецидивирующее инфекционное заболевание, включая, без ограничений, хроническую почечную инфекцию, хроническую инфекцию грудной клетки (например, бронхоэктаз), синусит, рецидивирующую инфекцию мочевыводящих путей (например, рецидивирующий пиелонефрит), открытую, дренированную или инфицированную кожную рану или язву.

29. На рентгенограмме грудной клетки субъекта, сделанной в пределах 3 месяцев перед первым введением исследуемого препарата, имеется аномалия, свидетельствующая о злокачественных опухолях или активной в настоящее время инфекции, включая ТВ (если применимо).

Злокачественные опухоли или повышенный потенциал появления злокачественных опухолей:

30. Субъект имеет известную злокачественную опухоль или злокачественную опухоль в анамнезе.

31. У субъекта в анамнезе имеется лимфопролиферативное заболевание, включая лимфому или признаки, указывающие на возможное лимфопролиферативное заболевание, такие как лимфаденопатия необычного размера или местоположения, или клинически значимая спленомегалия, не согласующаяся с pJIA или системно начинающимся JIA без системных симптомов.

Сопутствующие медицинские состояния или анамнез:

32. Субъект имеет в анамнезе тяжелую прогрессирующую или неконтролируемую печеночную или почечную недостаточность; или значимые сердечные, сосудистые, легочные, желудочно-кишечные, эндокринные, неврологические, гематологические, психиатрические или метаболические расстройства.

33. Субъект имеет известные аллергии, гиперчувствительность или непереносимость голимумаба или его эксципиентов, или субъект

имеет известные аллергии, гиперчувствительность или непереносимость иммуноглобулинов.

34. У субъекта имеется или возникла проблема зависимости от веществ (наркотиков или алкоголя).

35. Субъект имеет в анамнезе синдром активации макрофагов.

36 У субъекта имеется еще одно воспалительное заболевание, которое может нарушить оценку пользы от терапии голимумабом, включая, без ограничений, системную красную волчанку или болезнь Лайма.

37. Субъект инвалидизирован, в основном или полностью прикован к постели или к инвалидной коляске, или имеет неспособность или сниженную относительно возрастной нормы способность к уходу за собой.

38. У субъекта имеется в анамнезе демиелинизирующее заболевание, такое как рассеянный склероз.

39. У субъекта имеется в анамнезе или у него только что диагностировали застойную сердечную недостаточность.

Прочее

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

41. Субъект является девушкой, беременной или кормящей грудью, либо планирующей беременность во время участия в данном исследовании или в пределах 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

42. Субъект является юношей, который планирует зачатие ребенка во время участия в этом исследовании или в течение 6 месяцев после последнего введения исследуемого лекарственного средства.

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

44. 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.

45. Субъект имел активный увеит в пределах 3 месяцев перед скринингом.

46. Субъект с BSA > 3,0 $м^2$.

ПРИМЕЧАНИЕ: исследователи должны обеспечить соблюдение всех критериев включения при скрининге. 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. В разделе 17.4, «Исходная документация», описана документация, необходимая для обеспечения соответствия критериям включения.

4.3. 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:

- Субъекты не должны проходить вакцинацию живой вирусной или живой бактериальной вакциной в пределах 3 месяцев перед скринингом, во время исследования или в течение 3 месяцев после последнего введения исследуемого препарата.
- Субъекты не должны получать вакцину БЦЖ в пределах 12 месяцев до скрининга, во время исследования или в течение 12 месяцев после последнего введения исследуемого препарата.
- Девушки, ведущие половую жизнь и обладающие детородным потенциалом, должны использовать высокоэффективный способ контрацепции в течение исследования и 6 месяцев после получения последнего введения исследуемого препарата, включая фазу LTE исследования. Девушкам запрещено выступать донорами яйцеклеток (женских половых клеток, ооцитов) для искусственного оплодотворения во время исследования и в течение 6

месяцев после получения последней дозы исследуемого препарата, включая фазу LTE исследования.

Юноши, ведущие половую жизнь с девушкой, обладающей детородным потенциалом, и не вазэктомированные, должны использовать двойной барьерный способ контрацепции в течение исследования и 6 месяцев после последнего введения исследуемого препарата, включая фазу LTE исследования. Юношам запрещено выступать в роли донора спермы, и они должны согласиться не планировать зачатие ребенка в ходе исследования и в течение 6 месяцев после последнего введения исследуемого препарата, включая фазу LTE исследования.

В ходе исследования не допускается внутримышечное введение кортикостероидов для лечения pJIA. Кортикостероиды, вводимые путем бронхиальной или назальной ингаляции для лечения состояний, отличных от pJIA, можно вводить по мере необходимости на протяжении всего исследования. Дополнительная информация представлена в разделе 8.

Субъекты не должны получать экспериментальные лекарственные средства, другие иммунодепрессанты (такие как, но не исключительно, циклофосфамид) или другие биологические препараты по поводу pJIA в ходе исследования.

5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И МАСКИРОВКА ЛЕЧЕНИЯ

Данное исследование является открытым. Все субъекты будут получать голимумаб 80 мг/м^2 на неделе 0, неделе 4 и 1 р/8 нед (±3 дня) до недели 28 и 1 р/8 нед (±1 неделя) до недели 244.

Поскольку это открытое исследование, процедуры маскировки не применимы.

6. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

6.1. Голимумаб

В исследовании будет использована 1 группа активного лечения, и все субъекты будут получать в/в инфузии 80 мг/м^2 голимумаба (максимальная однократная доза 240 мг) на неделе 0, неделе 4 и 1 р/8 нд (±3 дня) до недели 28 и 1 р/8 нед (±1 неделя) после этого, до недели 244. Инфузионный раствор голимумаба будет готовить фармацевт в стерильных условиях путем добавления жидкого голимумаба 50 мг/4 мл во флаконах в инфузионный пакет со 100 мл 0,9% физиологического раствора. Субъекты будут получать в/в инфузии 80 мг/м^2 голимумаба в течение 30 ± 10 минут. Инфузию можно замедлять для получения признаков реакции на инфузию в соответствии с требованиями исследователя, и все изменения в скорости инфузии следует

регистрировать в CRF. Площадь поверхности тела будет рассчитываться при каждом визите, и доза голимумаба будет корректироваться по мере необходимости для обеспечения дозы 80 мг/м^2. Площадь поверхности тела будет рассчитываться с помощью уравнения Мостеллера: BSA (м^2) = ([рост (см) x масса тела (кг)]/3600)$^{1/2}$. Дополнительную информацию см. в руководстве по исследуемому продукту для исследовательского центра.

6.2. Метотрексат

Субъекты будут получать коммерческий MTX до недели 28 в одной и той же дозе, рассчитанной по BSA (от 10 до 30 мг/м^2 в неделю для субъектов с BSA < 1,67 м^2 или по меньшей мере 15 мг/неделю для субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2) на момент включения в исследование. Абсолютная доза должна оставаться стабильной от исходного уровня и до недели 28.

Следует уделять особое внимание тому, чтобы обеспечивать одинаковую дозу и путь введения MTX субъектам вплоть до посещения на неделе 28, если только не возникнет непереносимость или НЯ из-за MTX (раздел 8). Инструкции по корректировке дозы MTX в случае токсичности MTX приведены в файле для исследовательского центра.

Субъекты также будут получать коммерческую фолиевую кислоту в суммарной дозе ≥ 5 мг еженедельно или фолиновую кислоту (половину от дозы MTX), вводимую на следующий день после еженедельной дозы MTX. У детей в возрасте < 12 лет введение фолиевой кислоты или фолиновой кислоты будет осуществляться по усмотрению врача.

После недели 28 допустимы изменения в введении MTX (например, увеличение или уменьшение дозы, изменение способа введения или прекращение введения).

7. СОБЛЮДЕНИЕ РЕЖИМА ЛЕЧЕНИЯ

Персонал исследовательского центра обеспечит соблюдение назначенного лечения. Персонал центра будет вводить исследуемую инфузию при каждом визите и регистрировать введенное при инфузии количество.

Все индивидуальные регистрационные карты (CRF) будут отслеживаться в исследовательском центре наблюдателем, назначенным спонсором. Во время этих визитов для отслеживания будет проведена оценка соответствия всех процедур протоколу. В CRF будут регистрировать терапии, проводимые за рамками предусмотренных схемой окон, а также пропущенные визиты. Для обеспечения точности таблицы субъектов будут изучать и сравнивать с данными в CRF.

8. ПРЕДШЕСТВУЮЩАЯ И СОПУТСТВУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

При скрининге необходимо описать лекарственные препараты от JIA, вводившиеся до исследования, перед введением первой дозы исследуемого препарата. В течение всего исследования необходимо регистрировать все одновременно применяемые виды терапии, начиная с введения первой дозы исследуемого лекарственного средства.

Записывали данные обо всех видах терапии (рецептурные и безрецептурные лекарственные препараты, включая вакцины, витамины, травяные добавки; в CRF должны быть зарегистрированы нефармакологические виды терапии, такие как электрическая стимуляция и акупунктура), отличные от исследуемого препарата. Зафиксированная информация будет включать описание типа лекарственного средства, периода лечения, схемы дозирования, способа введения и показание. Не следует проводить модификацию эффективной предшествующей терапии с конкретной целью включения субъекта в исследование.

При использовании кортикостероидов или НПВС субъекты должны получать стабильные дозы этих лекарственных препаратов перед регистрацией в исследовании согласно критериям включения 8 и 9 (раздел 4.1). Субъекты ранее могли получать лечение не более 2 терапевтическими агентами, нацеленными на снижение ФНОα, перед регистрацией в исследовании, в соответствии с критерием исключения 12 (раздел 4.2). У субъектов не должно быть начато или выполнено лечение запрещенными терапевтическими агентами, описанными в критериях исключения с 1 до 20 (раздел 4.2).

Перед скринингом субъекты должны получать МТХ в течение ≥ 2 месяцев. Для субъектов с BSA < 1,67 м^2 доза МТХ должна составлять от 10 до 30 мг/м^2 в неделю, и быть стабильной в течение ≥ 4 недель перед скринингом. Для субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2 доза МТХ должна составлять как минимум 15 мг/неделя, и доза должна быть стабильной в течение ≥ 4 недель перед скринингом. Исключения из этого правила см. в разделе о критерии включения 7. Субъекты (за исключением субъектов с sJIA), получавшие кортикостероиды на момент регистрации в исследовании, должны получать стабильную дозу в течение ≥ 2 недель до скрининга, и эта доза должна представлять собой ≤ 10 мг/сут преднизонового эквивалента или 0,20 мг/кг/сут (в зависимости от того, что ниже). Субъекты с системной начинающимся JIA, но без системных симптомов в течение ≥ 3 месяцев, должны получать стабильную дозу кортикостероидов в течение 3 дней перед скринингом и не проявлять системных

симптомов. При получении терапии НПВС доза должна быть стабильной в течение ≥ 2 недель перед скринингом.

В принимаемые параллельно лекарственные препараты (т. е. MTX, другие DMARD, кортикостероиды и НПВС) не следует вносить никаких изменений в отношении увеличения или уменьшения дозы (например, не более 10 мг/сут преднизона или не более 0,20 мг/кг/сут, в зависимости от того, какое значение ниже) и/или способа введения между неделями 0 и 28, если только не существует проблемы с безопасностью (например, повышенные функциональные тесты печени), требующей изменений в принимаемых параллельно лекарственных препаратах. После недели 28 субъектам будет разрешено изменение/добавление MTX, других DMARD, кортикостероидов и НПВС, включая увеличение или уменьшение дозы, изменения способа введения или прекращение введения этих классов агентов.

В ходе исследования не допускается внутримышечное введение кортикостероидов для лечения pJIA. Кортикостероиды, вводимые путем бронхиальной или назальной ингаляции для лечения состояний, отличных от pJIA, можно вводить по мере необходимости на протяжении всего исследования.

Следует предпринимать все усилия, чтобы избежать в/в применения кортикостероидов. Для субъектов, которым требуются короткие курсы (2 недели или менее) перорального или в/в введения кортикостероидов по таким причинам, как профилактическая терапия перед хирургическим вмешательством (стрессовые дозы кортикостероидов), или терапия ограниченных инфекций, обострений астмы, или любого состояния, отличного от pJIA, кортикостероидная терапия должна быть ограничена ситуациями, в которых, по мнению лечащего врача, отсутствуют достаточные альтернативы, и это должно быть задокументировано в CRF.

Субъекты могут получать внутрисуставные инъекции кортикостероида, если это необходимо с клинической точки зрения, во время исследования до недели 52. Однако количество внутрисуставных инъекций должно быть ограничено 2 на протяжении любого 24-недельного периода. Таким образом, если субъект получил 2 внутрисуставных инъекции и прошло более 24 недель, он может получить до 2 дополнительных внутрисуставных инъекций в течение еще одного 24-недельного периода.

После недели 52 число внутрисуставных инъекций более не ограничено 2 инъекциями за 24 недели. Спонсора необходимо уведомить заранее (или как можно

быстрее постфактум) о любых случаях применения запрещенных вариантов терапии (раздел 4.3).

9. ОЦЕНКА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Процедуры исследования

9.1.1. Обзор

На графике времени и событий обобщены частота и время проведения измерений эффективности, ФК, иммуногенности и безопасности, применимые к данному исследованию (таблицы 6, 7 и 8). Все запланированные визиты в рамках исследования должны происходить в пределах ±3 дня от предполагаемого визита до недели 28, и в пределах ±1 неделя после недели 28 до недели 244. При невозможности обследования в рекомендованное приемлемое окно, прежде чем планировать визит, необходимо связаться со спонсором.

Заполнение Опросника по оценке состояния здоровья детей (CHAQ) следует выполнять до проведения любых тестов, процедур или других консультаций для этого визита, во избежание влияния на восприятие участников. Дополнительную информацию см. в руководстве пользователя PRO.

При каждом внеплановом визите исследователь выполняет следующие обследования:

- Обзор систем;
- Основные показатели жизнедеятельности;
- Опросник по ТВ;
- Нежелательные явления;
- Изучение одновременно принимаемых лекарственных препаратов;
- Лабораторные анализы, связанные с безопасностью.

Можно проводить дополнительные анализы сыворотки или мочи на беременность, которые являются необходимыми по мнению исследователя или требуются в соответствии с местным законодательством, для определения отсутствия беременности в любое время во время участия субъекта в исследовании.

Общий объем крови, забираемой у каждого субъекта в целях исследования, составляет приблизительно 149,4 мл (таблица 1). Возможен забор повторных или внеплановых образцов по соображениям безопасности или из-за технических проблем с образцами.

Таблица 1. Примерный объем крови, собираемый у каждого субъекта на неделе 252

Тип пробы	Приблизительный объем на пробу (мл)	Количество проб на субъекта	Приблизительный общий объем крови (мл)[a,b]
Безопасность (включая скрининг и оценку после лечения)			
- Гематология	1,2	17	20,4
- Биохимия сыворотки	1,1	17	18,7
Серология (гепатит B и гепатит C)	2,0	1	2,0
- Исследование сыворотки на беременность (β-ХГЧ)	1,1	1	1,1
- Тест QuantiFERON® (TB Gold)	3,0	6	18,0
- Ревматоидный фактор	1,1	1	1,1
- Антитело к дцДНК	1,1	11	12,1
- Антитела к ANA	1,1	11	12,1
Эффективность (СРБ)	1,1	24	26,4
ФК и иммуногенность (антитела к голимумабу)	2,5	15	37,5
Приблизительное общее количество			149,4

a. Рассчитывается как число образцов, умноженное на объем крови на образец.
b. Повторные или внеплановые образцы могут быть взяты из соображений безопасности или из-за технических проблем с образцами.
Примечание: Для взятия крови можно применять постоянную внутривенную канюлю.

Сокращения: ANA — антинуклеарные антитела; β-ХГЧ — β-хорионический гонадотропин человека; СРБ — С-реактивный белок; дцДНК — двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота; ФК — фармакокинетика; ТВ — туберкулез.

9.1.2. Фаза скрининга

После получения информированного согласия/разрешения в письменной форме и в течение периода 6 недель до недели 0 будут выполнены все скрининговые оценки, определяющие пригодность субъекта к участию. Субъекты, удовлетворяющие всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, будут включены в исследование. Следует предпринять все усилия, чтобы соблюсти график времени и событий для каждого субъекта (таблица).

Девушки с детородным потенциалом должны иметь отрицательный тест сыворотки на беременность (β-ХГЧ) при скрининге, а также отрицательный тест мочи на беременность перед каждым введением исследуемого препарата. Сексуально активные субъекты должны дать согласие на применение высокоэффективного способа контрацепции и продолжение использования контрацепции в течение всего исследования и в течение 6 месяцев после получения последней дозы исследуемого

препарата. Способ (-ы) контрацепции, используемый (-ые) каждым субъектом, должен быть задокументирован.

Субъекты должны проходить проверку на ТВ при скрининге, а их оценка анамнеза должна включать конкретные вопросы относительно ТВ в анамнезе или известных контактов с лицами с активным ТВ. У субъекта следует запросить данные о прошлых тестах на ТВ, включая результаты рентгенографии грудной клетки и кожной туберкулиновой пробы или других исследований на ТВ (раздел 4.1).

Субъекты с отрицательным результатом теста QuantiFERON® (TB Gold) (и отрицательным результатом туберкулиновой кожной пробы в странах, в которых тест QuantiFERON® (TB Gold) не одобрен/не зарегистрирован, или туберкулиновая кожная проба сделана обязательной местными органами здравоохранения) пригодны для продолжения процедур скрининга. Субъекты с впервые идентифицированным положительным результатом теста QuantiFERON®-TB Gold (и/или туберкулиновой кожной пробы) должны пройти обследование для исключения активного ТВ и начала надлежащего лечения латентного ТВ. Надлежащее лечение латентного ТВ определяется в соответствии с национальными рекомендациями для пациентов с ослабленным иммунитетом. Если не существует национальных рекомендаций по поводу пациентов с ослабленным иммунитетом, необходимо соблюдать рекомендации США или исключать субъекта из исследования.

Субъект, у которого первый результат теста QuantiFERON® (TB Gold) является неопределенным, должен пройти повторный тест. Если второй результат QuantiFERON® (TB Gold) также является неопределенным, субъект может быть введен 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. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь.

Повторную проверку аномального отсеянного значения, приводящего к исключению, допустимо проводить только один раз в ходе непланового визита в течение периода скрининга для повторной оценки пригодности для участия в исследовании. Эту возможность следует рассматривать только в том случае, если не ожидается влияния на безопасность субъекта.

9.1.3. Фаза лечения: От 0 недели до 28 недели

Начиная с недели 0, пригодные для участия в исследовании субъекты будут получать 80 мг/м^2 голимумаба, вводимого в виде в/в инфузий в течение 30 ± 10 минут на неделях 0, 4 и 1 р/8 нед (±3 дня) до недели 28 (раздел 6.1). Субъекты также будут получать коммерческий MTX еженедельно по меньшей мере до недели 28 в одной и той же дозе, рассчитанной на основе BSA во время регистрации в исследовании, и коммерческую фолиевую кислоту ≥ 5 мг еженедельно или фолиновую кислоту (в дозе, половинной от MTX), вводимую на следующий день после введения дозы MTX (раздел 6.2). У детей в возрасте < 12 лет введение фолиевой кислоты или фолиновой кислоты будет осуществляться по усмотрению врача.

Субъектам будут проводить оценки безопасности, эффективности, ФК и иммуногенности, выполняемые в соответствии с графиком времени и событий (таблица). Один дополнительный образец для определения сывороточной концентрации голимумаба для определения популяционной ФК будет собран у всех субъектов в любой момент времени между неделями 0 и 8, отличный от визитов на неделе 0, 4 и 8; данный образец необходимо собрать по меньшей мере за 24 часа до или после введения исследуемого препарата, и его не следует отбирать при регулярном плановом визите (например, на неделе 8).

9.1.4. Фаза лечения: после недели 28 и до недели 52

После недели 28 субъекты будут продолжать получать 80 мг/м^2 голимумаба, вводимого в виде в/в инфузий в течение 30 ± 10 минут по схеме 1 р/8 нед (± 1 неделя) до недели 52 (раздел 6.1). Субъекты будут также получать коммерческий MTX еженедельно в одной дозе, рассчитанной на основе BSA во время регистрации в исследовании, и коммерческую фолиевую кислоту ≥ 5 мг еженедельно или, если предусмотрено, фолиновую кислоту в дозе, половинной от MTX; (раздел 6.2), на следующий день после введения дозы MTX; однако после 28 недели допустимо увеличение, уменьшение или прекращение введения MTX, других DMARD, кортикостероидов и/или НПВС. Все изменения и причины изменений для этих лекарственных препаратов необходимо документировать в eCRF.

Субъектам будут проводить оценки безопасности, эффективности, ФК и иммуногенности, выполняемые в соответствии с графиком времени и событий (таблица).

Конец лечения / досрочное окончание

Если субъект прекращает прием исследуемого препарата до недели 52, субъект должен вернуться приблизительно через 8 недель после последнего введения

исследуемого препарата для заключительного визита последующего наблюдения и, следовательно, определения безопасности (раздел 10.2). Если субъект отказывается от участия в исследовании до недели 52, необходимо предпринять все усилия, чтобы получить оценки на момент окончания лечения перед отзывом согласия субъектом.

9.1.5. Долгосрочная расширенная фаза исследования: после недели 52 и до недели 252

Субъекты, перешедшие в долгосрочную расширенную фазу исследования после визита на неделе 52, будут продолжать получать 80 мг/м^2 голимумаба, вводимого в виде в/в инфузий, в течение 30 ± 10 минут 1 р/8 нед (±1 неделя) до недели 244.

Субъектам будут проводить оценки безопасности, эффективности, ФК и иммуногенности, выполняемые в соответствии с графиком времени и событий (таблица 7 и таблица). Субъекты, прекратившие прием исследуемого препарата перед неделей 244 без отзыва согласия, должны вернуться на заключительный визит последующего наблюдения и, следовательно, определения безопасности приблизительно через 8 недель после последней инфузии исследуемого препарата (раздел 10.2).

Субъекты должны продолжать проходить обследование на признаки и симптомы ТВ (раздел 9.4).

9.2. Эффективность

9.2.1. Оценки

На графике времени и событий обобщены частота и время проведения измерений эффективности, применимые к данному исследованию (таблица 7 и таблица).

9.2.1.1. Оценка суставов

Для каждого из 75 суставов будет дана оценка чувствительности, а для 68 суставов будет оценена припухлость, боль и ограничение движения в соответствии со стандартной оценкой суставов PRINTO/PRCSG. Для выполнения всех оценок суставов в каждом центре исследования будет назначен согласованный эксперт по оценке суставов, имеющий по меньшей мере 1 год опыта выполнения оценки суставов.

До начала регистрации субъектов одному согласованному эксперту по оценке суставов из каждого исследовательского центра будет предоставлено обучение; обучение является обязательным, если только эксперт по оценке суставов данного исследовательского центра не проходил сертифицированного обучения, предоставленного PRINTO или PRCSG. Если спонсор проводил обучение согласованного эксперта в предыдущем клиническом исследовании, эксперт может получить освобождение от данного обучения. Документирование проводимого

спонсором или PRINTO/PRCSG обучения будет вестись в файле исследовательского центра. По возможности согласованный эксперт по оценке суставов для исследования не должен меняться в ходе исследования. Однако эксперт из каждого исследовательского центра, который посещает обучение согласованных экспертов, проводимое спонсором, может обучить 1 дополнительного эксперта в своем центре для выполнения своих обязанностей в случае своего отсутствия.

Ожидается, что все дополнительные согласованные эксперты по оценке суставов, которые проходят обучение, также будут иметь 1 или более лет опыта в качестве экспертов по оценке суставов или будут одобрены спонсором. Если назначенный согласованных эксперт по оценке суставов из исследовательского центра обучает любых дополнительных экспертов в центре, следует отправить письмо, документирующее это обучение, в файл исследовательского центра. Кроме того, если в ходе исследования оценку суставов в центре выполняют несколько согласованных эксперта по оценке суставов, имена всех согласованных экспертов, выполняющих оценку суставов в центре при каждом визите, должны быть указаны в файле центра исследования и задокументированы в исходном документе.

Предпочтительно, чтобы согласованный эксперт по оценке суставов, выполняющий оценку суставов для определения исходного уровня у субъекта, также оценивал суставы у этого субъекта при всех последующих визитах до конечной оценки эффективности на неделе 244.

Не подлежащие оценке суставы

Хотя в клинической практике может быть целесообразно идентифицировать как «не подлежащий оценке» любой сустав, который в прошлом или во время участия в исследовании подвергся хирургическому изменению (т. е. установлен протез) или подвергся медикаментозному лечению (т. е. проведена внутрисуставная инъекция), обозначение «не подлежащий оценке» для целей настоящего исследования немного отличается. Суставы должны быть обозначены согласованным экспертом по оценке суставов как «не подлежащие оценке» в ePRO, если оценить сустав невозможно физически (т. е. сустав недоступен из-за шины, сустав отсутствует из-за ампутации, сустав деформирован так, что его невозможно оценить).

9.2.1.2. Ответ по определению Американской коллегии ревматологов у пациентов детского возраста

Критерии[5] ответа JIA ACR 30 определяются как улучшение на 30% (т. е. снижение балла) относительно исходного уровня по меньшей мере по 3 из 6

следующих компонентов, при ухудшении на 30% или более, но не более чем 1 из следующих компонентов:

- Общую оценку активности заболевания врачом;
- Оценка общего состояния здоровья родителем/субъектом;
- Количество активных суставов (определяется как припухлость или, в отсутствие припухлости, ограниченный диапазон движений, связанный с болью при движении или чувствительностью);
- Количество суставов с ограниченным диапазоном движений;
- Физическая функция по опроснику CHAQ;
- СРБ

Ответ JIA ACR 50, ответ JIA ACR 70 и ответ JIA ACR 90 определяются как улучшение на 50%, улучшение на 70% и улучшение на 90% относительно исходного уровня соответственно, по меньшей мере по 3 из указанных выше 6 компонентам, с ухудшением при этом на 30% или более по не более чем 1 из указанных выше компонентов.

Неактивное заболевание

Неактивное заболевание определяется наличием всех указанных ниже характеристик:

- Отсутствуют суставы с активным артритом;
- Отсутствие лихорадки, серозита, спленомегалии, гепатомегалии или генерализованной лимфаденопатии, связываемых с JIA;
- Отсутствие активного увеита;
- Нормальный уровень СРБ ($\leq$ 0,287 мг/дл у субъектов без базового воспалительного заболевания);
- Общая оценка активности заболевания врачом, указывающая на отсутствие активного заболевания (<5 мм);
- Продолжительность утренней скованности < 15 минут.

Клиническая ремиссия при приеме лекарственного препарата от JIA

Клиническая ремиссия при приеме лекарственного препарата от JIA определяется как неактивное заболевание при каждом визите в течение $\geq$ 6 месяцев в период приема лекарственных препаратов.

9.2.1.3. Общая оценка активности заболевания врачом

Общая оценка активности заболевания врачом составляет 100 мм VAS. Врачи должны выполнить оценку по VAS, которая позволяет им оценить текущую активность артрита у пациента. Опорные точки шкалы — «отсутствие артритной активности» — «крайне активный артрит». Более низкие оценки указывают на меньшую активность болезни. Процесс включения этой меры в основной набор переменных для оценки пациентов детского возраста был зафиксирован в литературе.[5]

9.2.1.4. Опросник по оценке состояния здоровья детей

Функциональный статус субъектов будут оценивать по опроснику CHAQ[21]. Родители/субъекты заполняют этот опросник для оценки имеющихся у субъекта сложностей с выполнением задач по 8 функциональным областям (одевание и уход за

собой, подъем, прием пищи, ходьба, гигиенические процедуры, способность дотянуться до предметов, способность к захвату и повседневная деятельность). Ответы для каждой функциональной области оценивают как 0 (без каких-либо затруднений), 1 (с некоторыми трудностями), 2 (с существенными трудностями), 3 (невозможность выполнения) или 4 (неприменимо). Более низкие баллы указывают на улучшение функций и эффективности выполнения задач в конкретных функциональных областях.

Кроме того, опросник CHAQ включает 2 вопроса шкалы VAS — один для оценки уровня боли у субъекта, а другой — для оценки общего самочувствия субъекта. Характеристики по опроснику CHAQ прошли анализ и оценку достоверности[21]. Было показано, что CHAQ реагирует на изменение заболевания.[21] Было показано, что снижение на 0,188 является значимым клиническим улучшением.[1]

Оценка боли родителем/субъектом

Боль будут оценивать как среднюю боль, испытываемую субъектом в течение последней недели с использованием шкалы VAS, в диапазоне от «без боли» (0 мм) до «очень сильной боли» (100 мм). Эта оценка должна быть выполнена родителем (лицом, осуществляющим уход)/субъектами перед изучением чувствительности и припухлости сустава.

Оценка общего состояния здоровья родителем/субъектом

Оценка общего состояния здоровья родителем/субъектом проводится по шкале VAS в диапазоне 0–100 мм. Родители/субъекты заполняют шкалу VAS в ответ на предложение подумать обо всех областях воздействия артрита на ребенка/себя, а затем отметить, как себя чувствует субъект. Опорные точки на шкале определяют диапазон от «очень хорошо» (0 мм) до «очень плохо» (100 мм). Более низкие оценки обозначают лучшее самочувствие. Процесс включения этой меры в основной набор переменных для оценки пациентов детского возраста был зафиксирован в литературе.[5]

Субъекты, возраст которых составляет от 15 до < 18 лет на момент вступления в исследование, могут заполнить опросник CHAQ совместно с родителем/лицом, осуществляющим уход. Предпочтительно, чтобы одно и то же лицо (например, родитель, лицо, осуществляющее уход, или субъект), которое выполняло оценку в начале исследования, также выполняло ее на протяжении всего исследования.

9.2.1.5. С-реактивный белок

Было показано, что С-реактивный белок полезен в качестве маркера воспаления у пациентов с pJIA, и он входит в базовую оценку JIA ACR 30. С-реактивный белок будут анализировать в центральной лаборатории с использованием прошедшего валидацию высокочувствительного анализа на СРБ.

9.2.1.6. Оценка активности ювенильного артрита (JADAS)

Недавно был разработан комбинированный показатель активности pJIA — оценка активности ювенильного артрита (JADAS); при валидационном анализе было обнаружено, что он обладает хорошими метрологическими свойствами, включая способность прогнозировать исход заболевания. Оценку JADAS (модифицированную для использования СРБ) вычисляют путем оценки следующих переменных: (1) общая оценка активности заболевания врачом, измеренная по 100 мм горизонтальной шкале VAS (0 — нет активности; 100 — максимальная активность для обеих VAS); (2) оценки самочувствия и боли родителями/детьми по нумерованной круговой 21-балльной и 100-миллиметровой горизонтальной линейной визуальным аналоговым шкалам[4], (3) количество активных суставов, оцениваемое среди 71, 27 или 10 суставов (JADAS 71, JADAS 27 и JADAS 10 соответственно); и (4) СРБ с усечением до 0-шкалы в соответствии со следующей формулой: (СРБ [мг/л]-10/10), аналогично усечению ESR, используемому в JADAS-ESR. Перед расчетом значения СРБ < 10 мг/л преобразуют в 10, а значения СРБ > 110 мг/л преобразуют в 110.[13]

JADAS рассчитывают как сумму баллов его 4 компонентов, что дает общую оценку от 0 до 101, от 0 до 57 и от 0 до 40 для JADAS 71, JADAS 27 и JADAS 10 соответственно.

Состояние JADAS 10, 27 и 71 с минимальной активностью заболевания[2,11] определяли как наличие всех указанных ниже критериев: Общая оценка активности заболевания врачом ≤ 3,5, общая оценка самочувствия родителями ≤ 2,5 и число суставов с припухлостью ≤ 1 у пациентов с полиартритом.

Критерии неактивного заболевания по JADAS определяются как общий балл по шкале JADAS ≤ 1.

9.2.2. Конечные показатели

Основной конечный показатель

Основным конечным показателем этого исследования является уровень воздействия ФК на неделе 28 (минимальные концентрации на неделе 28) и байесовская AUC_{ss} в течение одного интервала введения, составляющего 8 недель (исходя из моделирования и симуляции популяционной ФК).

Главные вторичные конечные показатели

К главным вторичным конечным показателям относятся:

Уровень воздействия ФК на неделе 52 (минимальные концентрации на неделе 52) и байесовская AUC_{ss} на неделе 52 (исходя из моделирования и симуляции популяционной ФК)

Другие конечные показатели

К другим конечным показателям относятся:

- доли субъектов, которые представляют собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70 и 90;
- изменение данных по CHAQ относительно исходного уровня с течением времени;
- изменение концентраций СРБ с течением времени;
- доля субъектов, у которых с течением времени наблюдается неактивное заболевание;
- доля субъектов в клинической ремиссии при применении лекарственных препаратов для лечения pJIA в зависимости от времени;
- улучшение относительно исходного уровня в основной группе pJIA при каждом визите;
- доли субъектов, представляющих собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70, и 90 по подтипам заболевания и/или по возрасту, в зависимости от времени вплоть до недели 52;
- изменение относительно исходного уровня по JADAS 10, 27 и 71 с течением времени;
- доля субъектов, достигших минимальной активности заболевания JADAS 10, 27 и 71, в зависимости от времени.

9.3. Фармакокинетика и иммуногенность

9.3.1. Оценки

Образцы сыворотки будут использованы для оценки ФК, а также иммуногенности голимумаба (антител к голимумабу). Будут собраны образцы венозной крови, и каждый образец сыворотки будет разделен на 3 аликвоты (по 1 для фармакокинетики, антитела к исследуемому лекарственному средству и резерв). Конфиденциальность субъекта будет сохранена. Образец следует брать не из той руки, в которую установлена линия для в/в инфузии, или, при использовании той линии в/в инфузии, которую используют также для доставки лекарственного препарата, линию следует промывать от лекарственного препарата, которое может остаться перед забором образца для ФК. При использовании линии в/в инфузии для забора образцов для ФК, необходимо отобрать и отбросить первые 1 мл крови перед получением образца. Следует соблюдать режим поддержания внутривенной линии в соответствии со стандартом медицинской помощи. При визитах, в которых будут оценивать сывороточную концентрацию антител к голимумабу, можно использовать 1 взятие крови достаточного объема.

9.3.2. Аналитические процедуры

Фармакокинетика

Образцы сыворотки будут проанализированы для определения концентраций голимумаба с помощью прошедшего валидацию, специфического и чувствительного способа спонсором или под его наблюдением.

Иммуногенность

Обнаружение и определение характеристик антител к голимумабу в сыворотке с применением прошедшего валидацию способа анализа будет проводить спонсор или под его наблюдением. Во всех образцах, собранных для обнаружения антител к голимумабу, также будут проводить измерение сывороточной концентрации голимумаба, чтобы обеспечить интерпретацию данных по антителам.

9.3.3. Фармакокинетические параметры

Сывороточные концентрации голимумаба будут оценивать на неделях 0, 4, 8, 12, 20, 28, 52, 100, 148, 196 и 244 и суммировать по времени.

Образцы, взятые до инфузии (непосредственно перед инфузией) и после инфузии (через 1 час после инфузии) будут собирать на неделях 0, 4 и 12, а дополнительный случайный образец для популяционной ФК будут собирать в любое время между неделями 0 и 8, кроме визитов на неделе 0, неделе 4 и неделе 8, и по меньшей мере за 24 часа перед введением исследуемого препарата или после него. При каждом из оставшихся визитов будут отбирать только 1 образец для определения сывороточной концентрации голимумаба, и его необходимо отбирать перед инфузией исследуемого препарата во время этого визита. Образцы, получаемые после инфузии, следует отбирать из руки, отличной от той, в которую введена линия для в/в инфузии, или линию в/в инфузии необходимо промывать от всех возможных остатков лекарственного препарата, и 1 мл крови следует отбирать и отбрасывать перед получением образца при использовании той же линии доступа, которую использовали для введения лекарственного средства.

Будет выполнен популяционный анализ ФК с данными до недели 28, чтобы охарактеризовать ФК голимумаба, а также идентифицировать важные ковариантов ФК в группе детей с pJIA. Кроме того, популяционную ФК-модель будут использовать для оценки сходства ФК у пациентов детского возраста и взрослых. Клиренс и объем распределения будут оценены с помощью метода NONMEM. Кроме того, будет выполнен анализ зависимости воздействие-ответ, чтобы исследовать и охарактеризовать взаимосвязь между уровнем воздействия и эффективностью.

9.3.4. Оценки иммуногенности (антитела к голимумабу)

Антитела к голимумабу будут оценивать в образцах сыворотки крови, собранных у всех субъектов в соответствии с графиком времени и событий (т. е. на неделях 0, 4, 8, 12, 28, 52, 100, 148, 196 и 244). Кроме того, образцы сыворотки также следует отбирать во время заключительного визита у субъектов, которые прекратили

лечение или выбыли из исследования. Эти пробы будут исследованы спонсором или лицом, назначенным спонсором.

Будет проведен скрининг образцов сыворотки на наличие антител, связывающихся с голимумабом, и будет зафиксирован титр в подтвержденных положительных образцах. Могут быть выполнены и другие анализы для проверки стабильности антител к голимумабу и/или дополнительного определения иммуногенности голимумаба.

Будет определена частота появления антител к голимумабу во время исследования.

9.4. Оценки безопасности

Любые клинически важные изменения, происходящие за время исследования, должны быть зарегистрированы в разделе нежелательных явлений в eCRF.

Исследователь будет отслеживать любое клинически значимое отклонение от нормы, которое сохраняется к концу исследования / его досрочному прекращению, до его устранения или до достижения клинически стабильного состояния.

Данное исследование будет включать следующие оценки безопасности и переносимости в соответствии с моментами времени, указанными в графиках времени и событий:

Нежелательные явления

Во время исследования о нежелательных явлениях будет сообщать субъект (или, при необходимости, лицо, осуществляющее уход, замещающее лицо или законный представитель субъекта). Нежелательные явления будут изучены исследователем, как указано в разделе 12, «Отчет о нежелательных явлениях».

Клинические лабораторные исследования

Будут взяты образцы крови для определения биохимических и гематологических показателей сыворотки. Исследователь должен изучить лабораторный отчет, задокументировать это изучение и записать любые клинически значимые изменения, возникшие в ходе исследования, в разделе «Нежелательные явления» в CRF. Лабораторные отчеты должны быть поданы вместе с первичными документами.

В центральной лаборатории будут выполнены следующие анализы:

- Гематологический анализ

-гемоглобин;	- лейкоциты (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы [%, абсолютное количество]);
-гематокрит;	-число тромбоцитов;
-RBC;	-средний объем эритроцита;
-среднее содержание	-средняя концентрация гемоглобина в

гемоглобина в эритроците; эритроците;
-морфология эритроцитов; -морфология лейкоцитов (при наличии).

- Биохимический анализ сыворотки

-натрий;	-общий билирубин;
-калий;	-билирубин (прямой и непрямой);
-азот мочевины;	-кальций;
-креатинин;	-фосфор;
-глюкоза;	-альбумин;
-АСТ;	-общий белок;
-АЛТ;	
-щелочная фосфатаза;	-мочевая кислота;
- бикарбонат	-хлорид.

- Тест сыворотки на беременность для девушек с детородным потенциалом будет проводиться при скрининге.
- Тестирование мочи на беременность для девушек с детородным потенциалом будет проводиться в соответствии с графиком времени и событий.
- Могут проводиться дополнительные анализы сыворотки или мочи на беременность, которые являются необходимыми по мнению исследователя или требуются в соответствии с местным законодательством, для определения отсутствия беременности на всем протяжении исследования.
- Серологический анализ на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), антитело к поверхностному антигену к гепатиту В (анти-HBs) и антитело к коровому антигену вируса гепатита В (общий анти-HBc) при скрининге.
- Серологический анализ на антитела к ВГС при скрининге.

Основные показатели жизнедеятельности

Измерения частоты пульса / частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, температуры и кровяного давления будут проводиться в соответствии с графиками времени и событий (таблица, таблица 7 и таблица).

Основные показатели жизнедеятельности следует получить до инфузии; через 15 и 30 минут (15-минутные интервалы в процессе инфузии); и через 60 и 90 минут (в течение 1-часового периода наблюдения после инфузии).

Физический осмотр

Физический осмотр, включая проверку кожи при каждом физическом обследовании и определение стадии Таннера по меньшей мере каждые 6 месяцев на предмет половой зрелости, будет проводиться в соответствии с графиком времени и событий. Обзор систем будут выполнять при всех визитах для оценки новой симптоматики, и, при необходимости, может быть выполнен полный физический осмотр по усмотрению исследователя. Исследователь будет отслеживать любое клинически значимое отклонение от нормы, которое сохраняется к концу

исследования, до его устранения или до достижения клинически стабильных конечных показателей.

Рост и масса тела

Рост будет измеряться при скрининге, и при всех сроках, указанных в графике времени и событий. Массу тела будут измерять в моменты времени, указанные в графике времени и событий, с использованием калиброванной шкалы для каждого измерения массы тела. Субъектам дается инструкция снять обувь, а также уличную одежду и аксессуары.

Оценки увеита

У всех субъектов будут оценивать впервые появляющийся увеит при скрининге и по меньшей мере каждые 6 месяцев после этого, и это будет осуществлять исследователь на основании физического осмотра и опроса. Сюда входит оценка признаков и симптомов увеита, включая, без ограничений, покраснение глаз, чувствительность к свету, изменения зрения и «мушки» перед глазами. С учетом меняющихся клинических стандартов, обследования можно проводить чаще.

Кроме того, все субъекты должны во время исследования проходить обследование офтальмологом/оптометристом с использованием щелевой лампы с интервалами (на основании подтипа JIA, результатов теста ANA, возраста начала JIA и продолжительности JIA), в соответствии с указаниями.

Если у субъекта развивается увеит в ходе исследования, продолжение участия субъекта в исследовании остается на усмотрение исследователя и спонсора.

Оценки реакции на инфузии

Перед началом инфузии должен присутствовать соответствующий персонал, лекарственные препараты (например, эпинефрин, ингаляционные β-агонисты, антигистаминные препараты и кортикостероиды) и другие необходимые средства, для купирования анафилаксии. Перед началом инфузии субъекту можно профилактически вводить лекарственные средства (например, дифенгидрамин) на основании решения исследователя, но это не является обязательным. Однако профилактическое применение кортикостероидов не допускается. Предварительное введение следует указать в eCRF.

Исследователь или квалифицированное уполномоченное лицо проведет оценку субъекта в отношении реакций на инфузии в соответствии с графиком времени и событий.

Реакция на инфузию представляет собой любой нежелательный или непреднамеренный признак, возникающий во время инфузии или в течение 1 часа

после завершения инфузии. Всех субъектов необходимо внимательно наблюдать на предмет симптомов реакции на инфузию. За субъектами наблюдают в течение по меньшей мере 60 минут после в/в введения исследуемого препарата на предмет симптомов реакции на инфузию. При обнаружении реакции на инфузию субъект должен получать лечение по усмотрению исследователя.

Исследователь регистрирует реакцию на инфузию на странице НЯ. Если реакция на инфузию не наблюдалась, исследователь отмечает это в медицинской документации субъекта (исходные данные).

Аллергические реакции

На протяжении всего исследования всех субъектов необходимо внимательно наблюдать на предмет симптомов аллергической реакции (например, уртикария, зуд, сыпь) в течение по меньшей мере 60 минут после завершения инфузии. При обнаружении легкой или умеренной аллергической реакции можно вводить ацетаминофен или НПВС и дифенгидрамин в одобренных для пациентов детского возраста дозах.

Субъектам с тяжелыми реакциями после инфузии, которые приводят к бронхоспазму с бронхолегочной обструкцией и/или затруднением дыхания, требующими вентиляционной поддержки, или к симптоматической гипотензии со снижением систолического кровяного давления на более чем 40 мм рт. ст., не позволяется более получать дополнительные инфузии исследуемого препарата. При возникновении таких реакций необходимо проводить надлежащее медицинское лечение.

Раннее обнаружение активной формы туберкулеза

Чтобы упростить раннее обнаружение ТВ, реактивации или новой инфекции ТВ во время участия в исследовании, у субъектов необходимо оценить признаки и симптомы активного ТВ на плановых визитах (см. график времени и событий) или путем телефонных контактов приблизительно каждые от 8–12 недель. В ходе оценки предлагается использовать следующую группу вопросов.

- «У вашего ребенка возникали новые приступы кашля длительностью > 14 дней или изменение хронического кашля?»
- «У вашего ребенка наблюдался любой из следующих симптомов»:
  - Устойчивая лихорадка?
  - Непреднамеренное снижение веса?
  - Ночная потливость?”
- «Имел ли ваш ребенок близкий контакт с человеком с активным ТВ?» (Если непонятно, следует ли считать контакт «близким», следует проконсультироваться с врачом, специализирующимся на ТВ).

Если при оценке возникает подозрение, что у субъекта может произойти реактивация ТВ или новая инфекция ТВ, необходимо прервать введение исследуемого препарата и провести немедленное и тщательное обследование, включая, по возможности, консультацию с врачом, специализирующимся на ТВ.

Исследователи должны знать, что реактивация ТВ у субъектов с ослабленным иммунитетом может проявляться в виде диссеминированного заболевания или внелегочных признаков. Субъекты с признаками активного ТВ должны незамедлительно прекращать применение исследуемого препарата и должны быть направлены на соответствующее лечение.

Ежегодное проведение теста QuantiFERON®-TB Gold (и кожной туберкулиновой пробы) не требуется для субъектов с латентным ТВ в анамнезе, или с проводимым в данный момент лечением латентного ТВ, или с задокументированным проведенным адекватным лечением ТВ.

Во время проведения исследования субъекты, которые находились в тесном контакте с субъектом с активным ТВ, должны пройти повторную рентгенографию грудной клетки, повторный тест QuantiFERON® (TB Gold), повторную туберкулиновую кожную пробу в странах, в которых тест QuantiFERON® (TB Gold) не одобрен/не зарегистрирован, и, по возможности, должны быть направлены к врачу для определения риска развития активного ТВ у субъекта и проверки того, обеспечивается ли лечение латентного ТВ. Тест QuantiFERON® (TB Gold) (и туберкулиновую кожную пробу) не нужно повторять для субъектов с латентным ТВ в анамнезе и проходящих в данный момент лечение латентного ТВ или с задокументированным проведенным адекватным лечением ТВ. Если результат теста QuantiFERON® (TB Gold) не определен, тест следует повторить, как описано в разделе 9.1.2. Субъектов следует побуждать возвращаться на все плановые визиты в рамках исследования в соответствии с протоколом.

9.5. Сбор и обработка проб

Фактические даты и время сбора проб необходимо записывать в CRF или бланке заявки на проведение лабораторного анализа.

Время и частота сборов всех проб указаны в графике времени и событий.

Инструкции по сбору, обработке, хранению и транспортировке проб находятся в руководстве по лабораторным исследованиям, которое будет предоставлено. Сбор, обработка, хранение и транспортировка проб должны осуществляться в установленных

условиях и, там, где это применимо, с контролируемой температурой, как указано в руководстве по лабораторным исследованиям.

10. ЗАВЕРШЕНИЕ УЧАСТИЯ/ВЫБЫВАНИЕ СУБЪЕКТА

10.1. Завершение

Субъект будет считаться завершившим основное исследование, если его или ее оценивали на 52 неделе. Субъект будет считаться завершившим долгосрочную расширенную фазу, если его или ее оценивали на 252 неделе.

10.2. Прекращение применения исследуемого лечения

Если необходимо прервать исследуемое лечение субъекта до завершения схемы лечения, это не приведет к автоматическому исключению субъекта из исследования.

Исследуемое лечение субъекта следует окончательно прекратить при любом из следующих условий:

- исследователь посчитал, что по соображениям безопасности (например, из-за нежелательного явления) прекращение лечения соответствует интересам субъекта;
- субъект забеременел;
- после введения исследуемого препарата возникла реакция, приводящая к бронхоспазму (как впервые диагностированному в связи с исследуемым препаратом, так и к серьезному обострению ранее существовавшей астмы) с бронхолегочной обструкцией или без нее, и/или с одышкой, требующей искусственной вентиляции легких, и/или с симптоматической гипотензией, возникающей после введения исследуемого препарата;
- реакция, которая приводит к миалгии и/или артралгии, с лихорадкой и/или сыпью (указывающими на сывороточную болезнь и не отражающими признаки и симптомы других признанных клинических синдромов), возникающими в период 1–14 дней после инфузии исследуемого препарата. Эти симптомы могут сопровождаться другими явлениями, включая зуд, отек на лице, руках или губах, дисфагию, уртикарию, боль в горле и/или головную боль.
- оппортунистическую инфекцию;
- злокачественную опухоль;
- у субъекта развивается застойная сердечная недостаточность в любое время в ходе исследования.
- демиелинизирующее заболевание;
- субъект отзывает согласие на введение исследуемого препарата;
- начало приема запрещенных протоколом лекарственных препаратов;
- субъект признается непригодным для участия в соответствии со следующими критериями скрининга на ТВ:
  - ставится диагноз активного ТВ;
  - субъект имеет симптомы, указывающие на активный ТВ, по данным проводимой в период последующего наблюдения оценки по опросникам и/или физическому осмотру, или субъект недавно имел близкий контакт с человеком с активным ТВ, и он не имеет возможности или желания проходить дополнительное обследование.
  - Субъект, проходящий обследование, получил рентгенограмму грудной клетки с признаками текущего активного ТВ и/или положительный результат теста QuantiFERON® (TB Gold) (или положительный результат туберкулиновой кожной пробы в странах, в которых тест QuantiFERON® (TB Gold) не

одобрен/не зарегистрирован, или туберкулиновая кожная проба сделана обязательной местными органами здравоохранения), за исключением случаев, когда можно исключить активный ТВ и инициировать надлежащее лечение латентного ТВ перед следующим введением исследуемого препарата и продолжать это лечение до завершения. Неопределенные результаты теста QuantiFERON® (TB Gold) следует расценивать, как описано в разделе 9.1.2. Субъекты с устойчиво неопределенными результатами теста QuantiFERON® (TB Gold) могут продолжать 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. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь.

– субъект, получающий лечение от латентного ТВ, прекращает это лечение преждевременно или не придерживается схемы лечения.

За всеми субъектами, прекратившими инфузии исследуемого препарата во время исследования, будет вестись наблюдение приблизительно в течение 8 недель после последней инфузии.

Примечание: визит приблизительно через 8 недель после последней инфузии исследуемого препарата, называется «заключительным визитом последующего наблюдения за безопасностью», и его может осуществлять при плановом или при внеплановом визите.

Субъектам, прекратившим инфузию исследуемого препарата, но не прекратившим участие в исследовании, будут проведены следующие оценки при заключительном визите последующего наблюдения за безопасностью:

- оценки безопасности (основные показатели жизнедеятельности, обзор систем, анализ НЯ, оценка на ТВ, оценка на увеит и взятие образца крови для стандартных лабораторных анализов и определение наличия антител к ANA двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоте (дцДНК) и антител к голимумабу);
- обзор сопутствующих лекарственных препаратов;
- оценки эффективности (оценки суставов, оценка JIA и взятие образца крови для определения СРБ);
- взятие образцов крови для измерения концентрации голимумаба у всех субъектов при заключительном визите последующего наблюдения за безопасностью.

Если субъект прекращает исследуемое лечение до завершения исследования, оценки должны быть получены приблизительно через 8 недель после последней инфузии исследуемого препарата.

10.3. Прекращение участия в исследовании

Субъект будет исключен из исследования по любой из следующих причин:

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

Если субъект прекращает исследуемое лечение до завершения исследования, оценки завершения исследования должны быть получены приблизительно через 8 недель после последней инфузии исследуемого препарата при заключительном визите последующего наблюдения за безопасностью.

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.

Когда субъект выходит из исследования до его завершения, причина исключения должна быть отражена в индивидуальной регистрационной карте (CRF) 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 отказывается от участия в исследовании до конца исследования, перед отзывом согласия необходимо провести оценки завершения исследования.

11. СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Статистический анализ будет проведен спонсором или под руководством спонсора. Ниже приведено общее описание статистических способов, которые следует применять для анализа данных по эффективности и безопасности. Конкретные детали приведены в плане статистического анализа.

В целом для сведения данных будут использовать методы описательной статистики, такие как среднее, медианное значение, стандартное отклонение, межквартильный размах, минимальное и максимальное значения для непрерывных переменных, а также количества и процентные доли для категорийных переменных.

11.1. Информация о субъекте

Все субъекты, включенные в исследование, будут иметь исходную описательную статистику.

Будут проведено обобщение исходных данных субъектов, демографических данных и данных об исходных характеристиках заболевания. Исходное измерение определяется как ближайшее измерение, сделанное до момента введения исследуемого препарата на неделе 0.

Демографические данные и исходные характеристики заболевания субъектов, а также данные о ранее принимавшихся лекарственных препаратах будут объединены в

сводку для всех субъектов, которые были включены в исследование, независимо от того, получали ли они введение исследуемого препарата. Будут объединены фармакокинетические данные для всех субъектов, получавших по меньшей мере 1 введение исследуемого препарата. Если не указано иное, анализы эффективности будут объединены для всех субъектов, включенных в исследование. Оценки безопасности будут объединены для всех получавших лечение субъектов.

11.2. Определение размера выборки

Размер выборки не основан на статистических аспектах. Для определения размера выборки для данного исследования была рассмотрена вариабельность ФК в популяциях детского возраста. Цель состоит в том, чтобы получить размер выборки, достаточный для построения популяционной ФК-модели и, если это возможно, модели зависимости ответа от уровня воздействия. Кроме того, также принимали во внимание размер выборки, обеспечивающий целесообразные оценки безопасности. С учетом этих соображений был выбран размер выборки приблизительно 120 субъектов, предполагая, что, если 20 субъектов выпадут, или если они не предоставят образцы для ФК, то размера выборки приблизительно 100 субъектов окажется достаточно для построения популяционной ФК-модели, учитывая нечастый отбор проб для ФК на разных временных точках, а также предоставление данных по безопасности приблизительно от 100 субъектов в течение 1 года.

11.3. Анализ эффективности

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ КОНЕЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Анализ основных конечных показателей эффективности не запланирован.

Анализы главных вторичных конечных показателей

Анализы главных вторичных конечных показателей эффективности не запланированы.

Другие конечные показатели эффективности

Ниже будут приведены сводные данные для всех субъектов, включенных в исследование:

- доля субъектов, которые представляют собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70 и 90;
- доля субъектов, у которых с течением времени наблюдается неактивное заболевание;
- доля субъектов в клинической ремиссии при применении лекарственных препаратов для лечения pJIA (критерии ACR) в зависимости от времени;
- улучшение относительно исходного уровня в основной группе pJIA с течением времени;
- доли субъектов, представляющих собой пациентов, ответивших на лечение JIA ACR 30, 50, 70, и 90 по подтипам заболевания и/или по возрасту, в зависимости от времени вплоть до недели 52;

- изменение данных по CHAQ относительно исходного уровня с течением времени;
- изменение концентраций СРБ с течением времени;
- изменение относительно исходного уровня по JADAS 10, 27 и 71 с течением времени;
- доля субъектов, достигших минимальной активности заболевания JADAS 10, 27 и 71, в зависимости от времени.

11.4. Фармакокинетические анализы

Основная цель данного исследования заключается в описании ФК-уровня воздействия голимумаба (минимальные концентрации на неделе 28 и байесовскую AUC_{ss} в течение периода введения 8 недель по результатам популяционного ФК-моделирования и симуляции) в популяции пациентов с pJIA.

Сывороточные концентрации голимумаба будут объединены во времени. Кроме того, будет выполнен популяционный анализ ФК по данным до недели 28, чтобы охарактеризовать ФК голимумаба, а также идентифицировать и количественно оценить важные ковариантны ФК в группе детей с pJIA. Клиренс и объем распределения будут оценены с помощью метода NONMEM. Подробная информация будет представлена в плане популяционного ФК-анализа, а результаты анализа будут представлены в отдельном отчете.

Показатели ФК-уровня воздействия будут графически оценены на популяциях детского возраста после в/в введения голимумаба (включая, без ограничений, C_{max}, C_{min} и AUC в равновесном состоянии) и сравнены с уровнем воздействия ФК у взрослых пациентов в исследовании CNTO148ART3001. Сходство между субъектами детского возраста и взрослыми субъектами будут оценивать по построению коробчатых диаграмм популяционного ФК-моделирования посредством визуального осмотра в дополнение к описательной статистике наблюдаемых концентраций.

Сводные данные по концентрации голимумаба будут суммированы, и уровень воздействия ФК будут оценивать до недели 52 и до LTE.

11.5. Анализы иммуногенности

Данные о появлении антител и титрах антител к голимумабу в ходе исследования будут объединены по времени для всех субъектов, которые получали введение голимумаба и у которых брали соответствующие образцы для обнаружения антител к голимумабу (т. е. для субъектов, у которых получен по меньшей мере 1 образец после первого введения голимумаба).

11.6. Фармакокинетические/фармакодинамические анализы

Будут исследованы взаимосвязи между сывороточной концентрацией голимумаба и эффективностью. Для описания соотношения уровень воздействия-ответ будет изучена и разработана приемлемая ФК/ФД модель.

11.7. Анализы безопасности

Нежелательные явления

Дословные термины, применяемые в CRF исследователями для определения нежелательных явлений, будут закодированы с помощью Медицинского словаря терминологии регулятивной деятельности (MedDRA). В анализ были включены все сообщенные нежелательные явления, начавшиеся во время фазы лечения (т. е. связанные с лечением нежелательные явления, которые ухудшились относительно исходного уровня). Для каждого нежелательного явления будут суммировать процент субъектов, у которых наблюдался по меньшей мере 1 эпизод данного явления, по группам лечения.

Сводные данные, перечни, наборы данных или описания состояния субъектов могут быть при необходимости предоставлены в отношении субъектов, которые умерли, прекратили лечение из-за нежелательного явления или у которых развилось тяжелое или серьезное нежелательное явление.

Для оценки безопасности субъектов в данном исследовании будут использовать следующие анализы:

- Возникновение и тип НЯ;
- возникновение и тип СНЯ;
- возникновение и тип обоснованно связанных НЯ;
- появление реакций на инфузии;
- появление антител к ANA и антител к дцДНК;
- появление антител к голимумабу;
- появление значительных отклонений лабораторных параметров (гематология и биохимия).

Клинические лабораторные исследования

Лабораторные данные будут обобщенно представлены по типу лабораторных анализов. В обобщенных лабораторных данных будут применять референтные диапазоны и заметно аномальные результаты (указанные в плане статистического анализа). Изменения результатов относительно исходного уровня будут представлены в перекрестных таблицах до и после лечения (с классами ниже, в пределах и выше нормальных диапазонов). Будут составлены сводные таблицы о частоте аномалий. Кроме того, будет приведен перечень субъектов с любыми заметно отклоняющимися от нормы лабораторными результатами.

Основные показатели жизнедеятельности

В каждый запланированный момент времени согласно графику сроков и мероприятий будут обобщены описательные статистические данные по пульсу/частоте сердечных сокращений, частоте дыхания, температуре и кровяному давлению (систолическому и диастолическому) и изменениям относительно исходного уровня.

11.8. Промежуточный анализ

Промежуточный анализ выполнять не планируется.

11.9. Комитет по мониторингу данных

Это открытое исследование, в котором все субъекты получают одинаковую в/в дозу голимумаба. Таким образом, внешний комитет по мониторингу данных не будет использован. Медицинский работник будет регулярно оценивать данные о безопасности в рамках исследования и внутренней комиссией по анализу данных, как определено в главе о DRC. Кроме того, анализ данных может проводить руководящий комитет.

12. ОТЧЕТНОСТЬ О НЕЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ ЯВЛЕНИЯХ

Представление своевременной, точной и полной отчетности и анализ информации о безопасности, полученной в ходе клинических исследований, имеют решающее значение для защиты субъектов, исследователей и спонсора и являются обязательным требованием регулирующих органов по всему миру. Спонсор установил стандартные операционные процедуры в соответствии с нормативными требованиями во всем мире, чтобы обеспечить надлежащее представление отчетности с информацией о безопасности; все клинические исследования, проводимые спонсором или его аффилированными лицами, будут проводиться в соответствии с этими процедурами.

12.1. Определения

12.1.1. Определения и классификации нежелательных явлений

Нежелательное явление

Нежелательным явлением является любое неблагоприятное медицинское явление у субъекта клинического исследования, которому вводят лекарственный (экспериментальный или неэкспериментальный) препарат. Нежелательное явление необязательно имеет причинно-следственную связь с лечением. Таким образом, нежелательное явление может представлять собой любой нежелательный и непреднамеренный признак (включая аномальный результат), симптом или заболевание, связанные по времени с применением лекарственного (исследуемого или неисследуемого) продукта, независимо от того, связаны они с данным лекарственным (исследуемым или не исследуемым) продуктом или нет. (Определение согласно Международной конференции по гармонизации [ICH])

Это определение включает любое событие, которое является новым с точки зрения наступления или усугубляется с точки зрения тяжести или частоты относительно состояния на исходном уровне или представляет собой аномальные результаты диагностических процедур, включая аномалии в лабораторных тестах.

Примечание: спонсор собирает данные о нежелательных явлениях, начиная с подписания ICF (см. раздел 12.3.1, «Все нежелательные явления», где указана информация о сроках регистрации последних нежелательных явлений).

Серьезное нежелательное явление

Серьезным нежелательным явлением, согласно Руководствам ICH и Европейского союза по фармакологическому надзору за лекарственными препаратами для применения у людей, является любое неблагоприятное медицинское явление, которое при любой дозе:

- Приводит к летальному исходу.
- Является опасным для жизни (субъект подвергался риску наступления летального исхода во время явления. Термин не относится к явлению, которое гипотетически могло бы приводить к летальному исходу, если бы оно было более тяжелым).
- Требует стационарной госпитализации или продления текущей госпитализации.
- Приводит к стойкой или значительной утрате трудоспособности или инвалидности
Является врожденной аномалией/врожденным пороком.
- Подозревается в переносе любых возбудителей инфекции посредством лекарственного продукта.
- Является важным с медицинской точки зрения*.

*При принятии решения о том, является ли экспресс-отчетность целесообразной также и в других ситуациях, например в случае важных медицинских явлений, которые могут непосредственно не представлять угрозу для жизни или не приводить к летальному исходу или госпитализации, но могут подвергать субъекта опасности или могут требовать вмешательства для предотвращения одного из других результатов, перечисленных в определении выше, следует прибегать к медицинской и научной оценке. Как правило, их следует рассматривать как серьезные.

В случае развития серьезного и неожиданного нежелательного явления, предполагающего наличие причинно-следственной связи между исследуемым препаратом и явлением (например, летальный исход в результате анафилактического шока), явление следует регистрировать как серьезную и непредвиденную предполагаемую нежелательную реакцию, даже если оно является компонентом конечного показателя исследования (например, смертность по любой причине).

Незарегистрированное (непредвиденное) нежелательное явление / справочная информация о безопасности

Нежелательное явление считается незарегистрированным, если характер или степень тяжести не соответствует применимой справочной информации о безопасности препарата.

В случае МТХ, имеющего разрешение на продажу, ожидаемость неблагоприятной ситуации будет определена в зависимости от того, указана ли она на

этикетке упаковки, поставленной производителем лекарственного средства в конкретной стране.

Нежелательное явление, связанное с применением лекарственного средства

Нежелательное явление считается связанным с применением лекарственного средства, если такая связь является возможной, вероятной или очень вероятной согласно определениям, перечисленным в разделе 12.1.2.

12.1.2. Определения для установления связи

Не связано

Нежелательное явление, которое не связано с применением лекарственного средства.

Сомнительно

Нежелательное явление, для которого более вероятно альтернативное объяснение, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующие заболевания или временная взаимосвязь позволяют предположить, что причинно-следственная связь маловероятна.

Возможно

Нежелательное явление, которое может быть связано с применением препарата. Альтернативное объяснение, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующее (-ие) заболевание (-я), является недостаточным. Временная взаимосвязь является рациональной; следовательно, причинную связь исключить невозможно.

Вероятно

Нежелательное явление, которое может быть связано с применением препарата. Временная взаимосвязь указывает на наличие причинной связи (например, подтверждена пробной отменой). Альтернативное объяснение является менее вероятным, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующее (-ие) заболевание (-я).

Очень вероятно

Нежелательное явление, которое указано как возможная нежелательная реакция и которое невозможно рационально объяснить альтернативными причинами, например сопутствующим (-ими) лекарственным (-ыми) средством (-ами), сопутствующим (-ими) заболеванием (-ями). Временная взаимосвязь четко указывает на наличие причинной связи (например, подтверждена пробными отменой и возобновлением лечения).

12.1.3. Критерии тяжести

Оценку степени тяжести будут выполнять с применением следующих общих ключевых слов для категорий:

Легкая. Наличие симптомов, которые легко переносятся, вызывая минимальный дискомфорт и не мешая повседневной деятельности.

Умеренная. Наличие достаточного дискомфорта, препятствующего выполнению повседневной деятельности.

Тяжелая. Максимальный дистресс, приводящий к значимому нарушению функционирования или к недееспособности. Мешает нормальной повседневной деятельности.

Исследователь должен определять тяжесть явлений, не ощущаемых субъектом непосредственно (например, аномальные результаты лабораторных исследований), на основании клинической оценки.

12.2. Ситуации, требующие специальной отчетности

Интересующие события безопасности в связи с исследуемым препаратом спонсора, которые могут требовать экспресс-отчетности и/или оценки безопасности, включают, без ограничений:

- передозировку исследуемого препарата спонсора;
- подозрение в злоупотреблении/неправильном применении исследуемого препарата спонсора;
- неумышленное или случайное воздействие исследуемого препарата спонсора;
- любую неудачу ожидаемого фармакологического действия (т. е. отсутствие эффекта) исследуемого препарата спонсора;
- непредвиденную терапевтическую или клиническую пользу от применения исследуемого препарата спонсора;
- ошибку в применении лекарственного препарата, связанную с продуктом спонсора (с воздействием на субъекта/пациента исследуемого препарата спонсора или без такового, например перепутанные имена).

Ситуации, требующие специальной отчетности, следует регистрировать в CRF. Любую ситуацию, требующую специальной отчетности, которая соответствует критериям серьезного нежелательного явления, следует регистрировать на странице серьезных нежелательных явлений CRF.

12.3. Процедуры

12.3.1. Все нежелательные явления

Все нежелательные явления и ситуации, требующие специальной отчетности, серьезные или несерьезные, будут регистрировать с момента получения подписанной и датированной ICF и до завершения последней связанной с исследованием процедуры у субъекта (которая может включать контакты для последующего наблюдения с целью оценки безопасности). Серьезные нежелательные явления, включая спонтанно сообщенные исследователю в течение 30 дней после завершения исследования, регистрировали, используя форму для серьезных нежелательных явлений. Спонсор

проведет оценку всей информации о безопасности, которая будет спонтанно передана исследователем, в сроки, указанные в протоколе.

Все явления, которые соответствуют определению серьезного нежелательного явления, будут регистрироваться как серьезные нежелательные явления, независимо от того, являются ли они определенными в протоколе оценками.

Все нежелательные явления, независимо от серьезности, тяжести или предполагаемой взаимосвязи с исследуемым препаратом, необходимо регистрировать с применением медицинской терминологии в первичном документе и CRF. По возможности диагнозы следует ставить, когда признаки и симптомы имеют общую этиологию (например, кашель, насморк, чихание, боль в горле и заложенность носа следует регистрировать как «инфекцию верхних дыхательных путей»). Исследователи должны указывать в CRF свое заключение о взаимосвязи нежелательного явления с исследуемой терапией. Все меры, необходимые для лечения нежелательных явлений, необходимо фиксировать в первичном документе, и информация о них будет передаваться в соответствии с инструкциями спонсора.

Спонсор принимает на себя ответственность за надлежащее информирование регуляторных органов о нежелательных явлениях. Спонсор будет также сообщать исследователю (и руководителю исследовательского учреждения, если это необходимо) о всех серьезных нежелательных явлениях, которые не входят в перечень (неожиданные) и которые связаны с применением исследуемого лекарственного средства. Исследователь (или спонсор, если необходимо) должен сообщить об этих явлениях в соответствующий независимый комитет по этике / экспертный совет учреждения (IEC/IRB), который одобрил протокол, если только иное не требуется и не зафиксировано в документах IEC/IRB.

Для всех исследований с амбулаторной фазой, включая открытые исследования, субъект должен получить «карточку-памятку (исследования)» и быть проинструктирован носить эту карточку с собой в течение всего исследования, при этом в карточке указаны:

- номер исследования
- указание на местном (-ых) языке (-ах), что субъект участвует в клиническом исследовании;
- имя исследователя и 24-часовой контактный номер телефона;
- имя местного спонсора и круглосуточный контактный номер телефона (только для медперсонала);
- номер исследовательского центра
- номер субъекта;

- любая другая информация, необходимая для неотложного раскрытия данных.

12.3.2. Серьезные нежелательные явления

О всех серьезных нежелательных явлениях, происходящих во время исследования, необходимо сообщать соответствующему контактному лицу спонсора в течение 24 часов с момента получения информации о явлении.

Информация о серьезных нежелательных явлениях будет передана спонсору с использованием формы серьезного нежелательного явления, которая должна быть заполнена, подписана врачом из исследовательского центра, и передана спонсору в течение 24 часов. Исходные и последующие отчеты о серьезном нежелательном явлении должны быть в форме факсимильного сообщения (факса).

Все серьезные нежелательные явления, которые не исчезли к концу исследования или которые не исчезли после прекращения участия субъекта в исследовании, необходимо отслеживать до тех пор, пока не произойдет одно из следующего:

- явление исчезло;
- явление стабилизировалось;
- явление вернулось к исходному уровню, если известен исходный уровень/статус;
- явление может быть связано с агентами, отличными от исследуемого препарата, или с факторами, не относящимися к проведению исследования;
- становится маловероятно, что можно получить какую-либо дополнительную информацию (отказ субъекта или медработника предоставить дополнительную информацию, невозможность последующего наблюдения после проведения комплексной проверки усилий, связанных с последующим наблюдением).

Подозреваемая передача возбудителя инфекции через лекарственный препарат будет зарегистрирована как серьезное нежелательное явление. Любое явление, требующее госпитализации (или продления госпитализации), которое происходит в ходе участия субъекта в исследовании, должно быть зарегистрировано как серьезное нежелательное явление, за исключением госпитализации по следующим причинам:

- Госпитализация, не связанная с лечением острого заболевания или нежелательного явления (например, социальные причины, такие как ожидание размещения в учреждении долговременного ухода).
- Хирургическая операция или процедура, запланированная до включения в исследование (должна быть задокументирована в CRF). Примечание: госпитализация, запланированная до подписания ICF, при условии, что первопричинное патологическое состояние, в связи с которым планировалась госпитализация, не ухудшилось, не будет считаться серьезным нежелательным явлением. Любое нежелательное явление, которое приводит к продлению первоначально запланированной госпитализации, нужно регистрировать как новое серьезное нежелательное явление.

Случай смерти субъекта в ходе исследования в пределах 2 месяцев от последнего введения исследуемого лекарственного средства, вне зависимости от того,

является ли она ожидаемой или связанной с исследуемым препаратом, считают серьезным нежелательным явлением.

12.3.3. Беременность

Персонал исследовательского центра должен сообщать спонсору о всех исходных сообщениях о беременности в течение 24 часов с момента получения информации об этом событии, используя соответствующую форму уведомления о беременности. Аномальные варианты разрешения беременности (например, спонтанный аборт, мертворождение и врожденная аномалия) считают серьезными нежелательными явлениями, и о них необходимо сообщать, используя форму для серьезных нежелательных явлений. Любой субъект, который забеременел во время исследования, должен прекратить дальнейшее лечение исследуемым препаратом.

Поскольку эффект исследуемого препарата на сперму неизвестен, о беременности партнерш субъектов-мужчин, включенных в исследование, персонал исследовательского центра в течение 24 часов с момента получения информации об этом событии будет сообщать, используя соответствующую форму уведомления о беременности.

Будет необходимо предоставлять информацию по периоду последующего наблюдения, касающуюся разрешения беременности и любых постнатальных последствий для новорожденного.

12.4. Случаи особого интереса

Исследователь должен сообщать о любом впервые выявленном злокачественном образовании или случае активного ТВ, возникшем после первого введения исследуемого препарата (-ов) субъектам, участвующим в данном клиническом исследовании, в соответствии с процедурами, описанными в разделе 12.3. Исследователям также сообщается о том, что в большинстве стран активный ТВ считается заболеванием, о котором следует подавать отчет. Эти явления следует считать серьезными, только если они соответствуют определению серьезного нежелательного явления.

13. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИССЛЕДУЕМОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ

13.1. Физическое описание исследуемого лекарственного средства

Исследуемый препарат голимумаб будет поставляться в виде стерильной жидкости для в/в инфузии в объеме 4 мл (50 мг, 12,5 мг/мл) в одноразовых флаконах. В каждом флаконе будет содержаться голимумаб в водной среде, содержащей гистидин, сорбит и полисорбат 80 при pH 5,5. Консерванты отсутствуют. Ответственность за его изготовление и предоставление будет нести спонсор.

МТХ (для перорального или инъекционного введения) не будет поставляться спонсором, а должен приобретаться в коммерческих аптеках.

13.2. Подготовка, обращение и хранение

Жидкий исследуемый препарат в стеклянных флаконах будет поставляться в готовом к использованию виде. На месте исследования флаконы с раствором голимумаба необходимо хранить в надежном холодильнике при контролируемых температурах в диапазоне от 2 °C до 8 °C (от 35,6 °F до 46,4 °F).

Фармакокинетика, эффективность и безопасность внутривенного введения голимумаба у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом: Результаты открытого исследования фазы 3

ПАЦИЕНТЫ И СПОСОБЫ

Цели

Оценка фармакокинетики (ФК), эффективности и безопасности внутривенного (в/в) введения голимумаба у пациентов детского возраста с активным несмотря на текущую терапию метотрексатом (МТХ) полиартикулярным ювенильным идиопатическим артритом (pJIA) на протяжении 28 недель лечения и 52 недель лечения.

Популяция пациентов и дизайн исследования

Это было открытое международное исследование фазы 3, проведенное в 33 центрах в 9 странах. Критериям участия соответствовали пациенты в возрасте от 2 до <18 лет с массой тела> 15 кг на момент скрининга и регистрации для участия в исследовании, с pJIA в анамнезе, диагностированным по крайней мере 3 месяца назад, и активным артритом (≥5 активных суставов), несмотря на лечение метотрексатом (МТХ; ≥10 мг/м^2) в течение ≥2 месяцев до скрининга и с началом заболевания до достижения ими 16-летнего возраста. pJIA может включать одну из следующих категорий, классифицированных согласно критериям классификации JIA Международной лиги ассоциаций по ревматологии (ILAR): расширенный олигоартикулярный JIA; pJIA, положительный по ревматоидному фактору [RF], и pJIA, отрицательный по RF; системный JIA без системных симптомов в течение ≥ 3 месяцев; связанный с энтезитом артрит или полиартикулярный ювенильный псориатический артрит.

Все пациенты, соответствующие требованиям, получали 80 мг/м^2 голимумаба (максимальная однократная доза 240 мг) в виде в/в инфузии, которую вводят в течение

30 ± 10 минут, на неделях 0, 4 и каждые 8 недель (1 р/8 нед; ±3 дня) до недели 28 и 1 р/8 нед (±1 неделя) до недели 52 (фиг. 18). Площадь поверхности тела (BSA) рассчитывалась на каждом визите, и в/в доза корректировалась по мере необходимости для обеспечения дозы 80 мг/м^2. Коммерческий MTX вводили еженедельно до недели 28 в одной и той же дозе, рассчитанной на основе BSA (от 10 до 30 мг/м^2 MTX в неделю для субъектов с BSA < 1,67 м^2 или по меньшей мере 15 мг MTX в неделю для субъектов с BSA ≥ 1,67 м^2). После недели 28 субъектам было разрешено изменение или добавление MTX, других DMARD, глюкокортикостероидов и НПВС. Субъекты, завершившие исследование на неделе 52, имели возможность участвовать в долгосрочной расширенной фазе этого исследования, которая сейчас продолжается.

Пациенты должны были быть стабильными с медицинской точки зрения; у них не должно было быть активного увеита в течение 3 месяцев до скрининга и не должно было быть серьезного сопутствующего заболевания. Пациенты прошли скрининг на туберкулез, и те, у кого были признаки активной формы туберкулеза, были исключены. Пациенты с латентным туберкулезом могли участвовать, если на исходном уровне и во время исследования они получали лечение от латентного туберкулеза. Пациенты с детородным потенциалом должны были иметь отрицательный результат анализа на беременность во время скрининга и на каждом визите в рамках исследования, а сексуально активные пациенты должны были согласиться на использование высокоэффективного метода контрацепции.

Если пациент применял глюкокортикоиды (≤10 мг/сут или 0,20 мг/кг/сут [в зависимости от того, что меньше] преднизонового эквивалента) или НПВС, доза должна была оставаться стабильной в течение ≥2 недель до первого в/в введения голимумаба или скрининга, соответственно. До 30% пациентов могли ранее применять ≤2 анти-ФНО-препаратов. Пациентам, получавшим b-DMARD или низкомолекулярный препарат перед первым в/в введением голимумаба, необходимо было соблюдать определенные периоды вымывания. Период вымывания по отношению к первому введению исследуемого препарата составлял 1 неделю для интерлейкина (IL)-1ra; 2 недели для ингибиторов Янус-киназы; 4 недели для внутрисуставных, внутримышечных или в/в глюкокортикоидов, лефлуномида, этанерцепта или начала лечения DMARD; 6 недель для адалимумаба или цертолизумаба пегола; 8 недель для абатацепта, инфликсимаба или тоцилизумаба; 3 месяца для ингибиторов IL-12/23, алефацепта, живых вирусных или бактериальных вакцин, исследуемых препаратов или медицинских изделий; 4 месяца для какинарумаба; и 12 месяцев для вакцинации

бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ) или препаратов, истощающих В или Т-клетки. Цитотоксические препараты были запрещены.

Независимый комитет по этике или экспертный совет учреждения утвердили протокол исследования для каждого центра; исследование было проведено в соответствии с этическими принципами, берущими свое начало в Хельсинкской декларации и согласующимися с Надлежащей клинической практикой и применимыми нормативными требованиями. Это исследование было зарегистрировано на сайте ClinicalTrials.gov (NCT02277444). Пациенты в возрасте 7 лет и старше предоставили согласие, а родители, законный опекун или законный представитель дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Предусмотренные исследованием оценки

Сывороточные концентрации голимумаба оценивали на неделях 0, 4, 8, 12, 20, 28 и 52. Образцы, взятые до и после инфузии собирали на неделях 0, 4 и 12, а дополнительный случайный образец для популяционной ФК собирали в любое время между неделями 0 и 8, кроме визитов на неделе 0, неделе 4 и неделе 8, и по меньшей мере за 24 часа перед введением исследуемого препарата или после него. Образцы, взятые до инфузии, собирали только на неделях 8, 20, 28 и 52. Образцы сыворотки анализировали с помощью прошедшего валидацию, специфичного и чувствительного способа.

Оценки эффективности включали основной набор показателей JIA (общая оценка активности заболевания врачом [общая оценка (MD); визуально-аналоговая шкала (VAS) в диапазоне 0–10 см от «отсутствие активности артрита» до «крайне активного артрита»], количество суставов с активным артритом [определяемое как припухлость или, в отсутствие припухлости, ограниченный диапазон движений, связанный с болью при движении или чувствительностью], количество суставов с ограниченным диапазоном движений, кросс-культурно адаптированная и валидированная версия Опросника по оценке состояния здоровья детей [CHAQ; включает оценку родителем общего состояния здоровья и боли с использованием VAS (в диапазоне 0–10 см)] и уровня С-реактивного белка [СРБ; нормальный уровень СРБ ($\leq$ 0,287 мг/дл) у субъектов без базового воспалительного заболевания]) и продолжительность утренней скованности.

Оценки безопасности выполняли на каждом визите; они включали стандартные лабораторные анализы. Любые нежелательные явления (НЯ) были представлены в виде дословного термина и закодированы в соответствии с Медицинским словарем

терминологии регулятивной деятельности (MedDRA), версии 21.1. Антитела к голимумабу оценивали в образцах сыворотки крови, собранных на 0, 4, 8, 12, 28 и 52 неделях с использованием валидированного, высокочувствительного метода иммуноферментного анализа, устойчивого к лекарственным средствам. Образцы, содержащие антитела, специфичные к голимумабу, были классифицированы как положительные на антитела к лекарственному средству (ADA). Пациенты с образцами, классифицированными как ADA-положительные (усиленные лечением [повышенный титр, если исходный образец был ADA-положительным] или индуцированные лечением) в любое время после первого введения им голимумаба до недели 52 классифицировались как положительные на антитела к голимумабу. Пациенты с исходными образцами, классифицированными как ADA-положительные и без повышения титра после лечения, были классифицированы как отрицательные на антитела к голимумабу. Наличие антинуклеарных антител (ANA)/антител к двухцепочечной ДНК (дцДНК) оценивали в образцах сыворотки крови, собранных на исходном уровне, а также на неделях 24 и 52.

Конечные показатели исследования

Основным конечным показателем этого исследования являлись уровень воздействия ФК на неделе 28 (минимальные концентрации на неделе 28) и спрогнозированная моделью равновесная площадь под кривой «концентрация — время» [AUC_{ss}] в течение 1-го интервала введения, составляющего 8 недель (исходя из моделирования и симуляции популяционной ФК) на неделе 28. Главными вторичными конечными показателями этого исследования являлись уровень воздействия ФК на неделе 52 (минимальные концентрации на неделе 52) и спрогнозированная моделью AUC_{ss} на неделе 52.

Конечные показатели эффективности включали ответы согласно Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) JIA ACR 30, JIA ACR 50, JIA ACR 70 или JIA ACR 90 (определяемые как улучшение по сравнению с исходным уровнем на 30%, 50%, 70% или 90% в ≥3 пациентов без ухудшения ≥30% в >1 пациента остальных основных измерений JIA), рассчитанные по ближайшей оценке, выполняемой до первого в/в введения голимумаба (неделя 0); модифицированный вариант критериев неактивного заболевания JIA ACR (определяемый как отсутствие суставов с активным артритом и отсутствие активного увеита; отсутствие лихорадки, серозита, спленомегалии, гепатомегалии или генерализованной лимфаденопатии, связываемых с JIA; нормальный уровень СРБ; общая оценка активности заболевания врачом (общая оценка

MD) ≤5 мм [отсутствие активного заболевания]; и продолжительность утренней скованности < 15 минут); клиническая ремиссия при приеме лекарственного препарата от pJIA, определяемая как неактивное заболевание при каждом визите в течение ≥ 6 месяцев в период приема лекарственных препаратов; а также оценка активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71); пороговые значения составляли >10,5 для высокой активности заболевания [HDA], в пределах 3,9–10,5 для умеренной активности заболевания [MDA], в пределах 1,1–3,8 для низкой активности заболевания [LDA] и ≤1 для неактивного заболевания [ID]).

Статистический анализ

При проведении данного исследования следовали рекомендациям Единых стандартов представления результатов испытаний (CONSORT); результаты были представлены для выборки для полного анализа. Все пациенты, получившие по крайней мере 1 дозу исследуемого препарата, были включены в анализ ФК (если у них было достаточно образцов для анализа ФК), анализ эффективности и безопасности. Был выполнен популяционный анализ ФК с данными до недели 28, чтобы охарактеризовать ФК голимумаба и идентифицировать важные ковариантны ФК в пациентов детского возраста с pJIA. Популяционное ФК-моделирование использовали для оценки сходства ФК у пациентов детского возраста и взрослых. Клиренс и объем распределения были оценены с использованием метода моделирования нелинейных смешанных эффектов (NONMEM). Был выполнен анализ зависимости воздействие-ответ, чтобы исследовать и охарактеризовать взаимосвязь между уровнем воздействия и эффективностью. Уровень воздействия ФК в группе пациентов детского возраста сравнивали с уровнем воздействием ФК из предшествующего исследования у взрослых с РА, которые получали в/в голимумаб в дозе 2 мг/кг на неделях 0, 4 и 1 р/8 нед после этого; этих взрослых пациентов использовали в качестве контрольной группы.

Для анализа бинарных комбинированных конечных показателей эффективности использовали метод подстановки (подстановка данных при отсутствии ответа [NRI] и использование последнего документированного значения [LOCF] для отсутствующих компонентов) для подстановки недостающих данных на основании принципа «Выборка с назначенным лечением» (ITT). Метод подстановки не использовали для непрерывных конечных показателей или отсутствующих данных о концентрации. Формальная проверка гипотезы не проводилась. В целом, для подведения итоговых данных использовали методы описательной статистики, такие как среднее, медианное значение, стандартное отклонение, межквартильный размах, минимальное и

максимальное значения для непрерывных переменных, а также количества и процентные доли для категорийных переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение участников исследования и характеристика заболевания

Из 180 прошедших скрининг пациентов 127 (71%) были зачислены в исследование, получили по меньшей мере 1 дозу в/в голимумаба и были включены в набор данных полного анализа (фиг. 19). Из 127 пациентов, получивших лечение, 113 (89%) оставались в исследовании до недели 52. Основной причиной прекращения участия в исследовании были НЯ.

Исходные демографические данные, характеристики заболевания, а также данные о ранее принимавшихся лекарственных препаратах от pJIA, приведены в таблице 9. Медианный возраст на исходном уровне составил 13 лет; большинство пациентов были женщинами (73%) и европеоидами (67%); средний вес составил 42,4 кг. Большинство пациентов были классифицированы как имеющие RF-отрицательный (43%) и RF-положительный (35%) pJIA. Наиболее распространенными ранее принимавшимися лекарственными препаратами были НПВС (94%) и системные глюкокортикоиды (57%). Из 25 пациентов, ранее получавших анти-ФНО-терапию, большинство (80%) получали этанерцепт. На исходном уровне 72% пациентов принимали НПВС, 37% принимали пероральные глюкокортикоиды и 10% принимали s-DMARD, отличные от метотрексата. На исходном уровне 121 (99%) пациентов имели высокую активность заболевания, измеренную JADAS 71 (таблица 10).

Таблица 9. Исходные демографические данные, характеристики заболевания, а также данные о ранее принимавшихся лекарственных препаратах

Характеристика	**Голимумаб (N=127)**
Возраст, лет	13,0 (8,0, 15,0)
Женский пол, n (%)	93 (73,2)
Раса, n (%)	
Европеоиды	85 (66,9)
Прочее	28 (22,0)
Латиноамериканцы, n (%)	63 (49,6)
Масса тела, кг	42,4 (29,2, 57,0)
BSA, $м^2$	1,3 (1,0, 1,6)
Продолжительность заболевания, годы	1,4 (0,5, 4,0)

Классификация по ILAR, n (%)	
Полиартикулярный, отрицательный по ревматоидному фактору	54 (42,5)
Полиартикулярный, положительный по ревматоидному фактору	44 (34,6)
Связанный с энтезитом артрит	12 (9,4)
Олигоартикулярный продолжительный	8 (6,3)
Ювенильный псориатический артрит	5 (3,9)
Системный без системных симптомов, но с полиартикулярным течением	4 (3,1)
ANA-положительный, n (%)	64 (50,4)
Предшествующая процедура или инъекция относительно сустава, n (%)	26 (20,5)
Инъекция кортикостероида в сустав	25 (96,2)
Прочее[a]	10 (38,5)
Препараты от JIA, вводившиеся до исследования[b]	
Метотрексат, n (%)	127 (100)
Доза метотрексата, мг/м^2/неделя	13,6 (4,5)
s-DMARD, отличные от метотрексата, n (%)	13 (10,2)
Пероральные глюкокортикоиды, n (%)	47 (37,0)
Преднизон или эквивалентная доза, мг/кг/сут	0,16 (0,1)
НПВС, n (%)	92 (72,4)
Ранее принимавшиеся лекарственные препараты от JIA,[c] n (%)	
Метотрексат	127 (100)
s-DMARD, отличные от метотрексата[d]	25 (19,7)
Анти-ФНО-терапия	25 (19,7)
b-DMARD, отличные от анти-ФНО-терапии	3 (2,4)
Системные глюкокортикоиды	72 (56,7)
НПВС	119 (93,7)

Значения являются медианой (диапазон IQ), если не указано иное.

[a] Артроцентез, артроскопия (хирургическая или диагностическая), остеотомия, операция на сухожилиях

[b] Препараты от JIA, вводившиеся до исследования — это любое лекарственное средство, которое применялось как до, так и после первого введения исследуемого препарата.

[c] Ранее принимавшиеся лекарственные препараты от JIA — это любые лекарственные средства, дата начала применения которых предшествует дню первого введения исследуемого препарата.

[d] Включая иммунодепрессанты циклоспорин (n=2) и азатиоприн (n=1)

ANA — антинуклеарные антитела; b-DMARD — изменяющее течение заболевания противоревматическое лекарственное средство; BSA — площадь поверхности тела; DMARD — модифицирующие течение заболевания противоревматические препараты; ILAR — Международная лига ассоциаций по ревматологии; IQ — межквартильный интервал; JIA — ювенильный идиопатический артрит; N — все пациенты, получавшие лечение; n — число пациентов; НПВС — нестероидное противовоспалительное средство; s-DMARD — синтетические модифицирующие течение заболевания противоревматические препараты; ФНО — фактор некроза опухоли

Таблица 10. Резюме основных показателей JIA и других параметров активности заболевания (N=127)

Характеристика	Исходный уровень	Неделя 4	Неделя 28	Неделя 52
Основные показатели JIA				
Общая оценка MD активности заболевания, VAS в диапазоне 0–10 см	5,5 (4,5, 6,8)[a]	2,2 (1,0, 3,8)	0,5 (0,1, 1,2)	0,3 (0,0, 1,4)
Оценка общего состояния здоровья родителем, VAS в диапазоне 0–10 см	5,4 (3,3, 6,9)	2,6 (1,1, 5,0)	1,7 (0,3, 4,8)	1,1 (0,2, 4,2)
Количество активных суставов	14,0 (9,0, 22,0)	6,0 (2,0, 11,0)	1,0 (0,0, 4,0)	0,0 (0,0, 3,0)
Количество	10,0 (4,0, 18,0)	3,0 (0,0, 9,0)	1,0 (0,0, 4,0)	1,0 (0,0, 5,0)

суставов с ограниченным диапазоном движений				
CHAQ, 0–3 балла	1,25 (0,8, 1,9)	0,9 (0,4, 1,4)	0,4 (0,0, 1,1)	0,4 (0,0, 1,1)
СРБ, мг/дл	0,5 (0,1, 1,1)	0,1 (0,0, 0,3)	0,1 (0,0, 0,7)	0,1 (0,0, 0,6)
Продолжительность утренней скованности, минуты	40 (20, 60)	5 (0, 30)	0 (0, 15)	0 (0, 15)
JADAS 71, среднее (95% доверительный интервал)	28,4 (26,1, 30,7)	14,6 (12,4, 16,8)	6,8 (5,2, 8,3)	5,4 (3,9, 6,9)
JADAS 71 высокая активность заболевания >10,5, n (%)	121 (99,2)	73 (58,9)	23 (20,2)	16 (14,5)
JADAS 71 умеренная активность заболевания 3,9–10,5, n (%)	1 (0,8)	32 (25,8)	37 (32,5)	32 (29,1)
JADAS 71 низкая активность заболевания 1,1–3,8, n (%)	0	15 (12,1)	27 (23,7)	23 (20,9)
JADAS 71 неактивное заболевание ≤1, n (%)	0	4 (3,2)	27 (23,7)	39 (35,5)

Все значения являются медианой (диапазон IQ), если не указано иное.

[a] n=122

[b] Норма составляет ≤0,287 мг/дл

95% доверительный интервал основан на нормальной аппроксимации: среднее значение ±1,96 x SD/√N

CHAQ — опросник по оценке состояния здоровья детей; СРБ — С-реактивный белок; IQ — межквартильный интервал; JADAS 71 — Оценка активности

ювенильного артрита, для 71 сустава; JIA — ювенильный идиопатический артрит; MD — врач; VAS = визуальная аналоговая шкала.

Фармакокинетика и иммуногенность

В целом, уровень воздействия ФК у пациентов с pJIA после введения в/в голимумаба в дозе 80 мг/м^2 на неделе 0, 4 и 1 р/8 нед после этого было сходным с таковым у контрольной группе взрослых с RA (фиг. 20A и 20B). Общая медианная равновесная минимальная концентрация голимумаба у пациентов с pJIA составила 0,40 мкг/мл (среднее значение ± CO: 0,50±0,43 мкг/мл) на неделе 28 и 0,45 мкг/мл (среднее значение ± SD: 0,52±0,48 мкг/мл) на неделе 52. Общие медианные равновесные минимальные концентрации голимумаба были сходными для всех возрастных категорий детей на неделе 28 и сходными с медианной минимальной концентрацией голимумаба, наблюдаемой на неделе 36 (0,31 мкг/мл; среднее значение ± CO 0,41±0,52 мкг/мл) в контрольной группе взрослых с PA (фиг. 20A). Наблюдаемые медианные минимальные концентрации голимумаба также были сходными для всех квартилей массы тела на неделе 28.

Спрогнозированная популяционной ФК моделью медиана общей AUC_{ss} для пациентов с pJIA в течение 8-недельного интервала дозирования составила 399 мкг·сут/мл на неделе 28 и 421 мкг·сут/мл на неделе 52. Эти значения были согласованными для всех возрастных категорий пациентов детского возраста (фиг. 20B). Спрогнозированные моделью значения AUC_{ss} у пациентов с pJIA были немного выше, чем AUC_{ss} (248 мкг·сут/мл) в контрольной группе взрослых с RA (фиг. 20B); однако было показано, что моноклональные антитела обладают от умеренной до высокой вариабельностью ФК.

По прошествии 52 недель 39 из 125 (31%) пролеченных пациентов, сдавшие соответствующие образцы, имели положительный результат на антитела к голимумабу, а 24 (19%) пациента, имели положительный результат на нейтрализующие антитела. Пиковый титр антител к голимумабу составил <10 у 5 пациентов, от ≥10 до <100 у 17 пациентов, от ≥100 до <1000 у 13 пациентов и ≥1000 у 4 пациентов. Медианная минимальная концентрация голимумаба, как правило, была ниже у пациентов с положительным результатом на антитела, чем у пациентов с отрицательным результатом на антитела (0,00 [n=32] по сравнению с 0,61 мкг/мл [n=63] на неделе 52).

Эффективность

Как показано в таблице 10, улучшение по сравнению с исходным уровнем показателей компонента JIA ACR наблюдалось уже на неделе 4 и сохранялось с 28 по 52 неделю. На 28 и 52 неделе, соответственно, среднее процентное улучшение составило 92% и 96% для общей оценки MD активности заболевания, 63% и 70% для оценки общего состояния здоровья родителем, 94% и 100% для количества активных суставов, 89 % и 85% для количества суставов с ограниченным диапазоном движений, 57% и 63% для физической функции по опроснику CHAQ и 53% и 48% для уровня СРБ.

Подобным образом, ответы JIA ACR 30, 50, 70 и 90 наблюдались уже на неделе 4, при этом более 50% пациентов достигли по меньшей мере JIA ACR 50 (фиг. 21A). На неделе 28 70% пациентов достигли по меньшей мере ответа JIA ACR 70 и почти половина (47%) — ответа JIA ACR 90. Эти показатели ответов сохранялись до недели 52. На неделях 28 и 52 были отмечены стабильно высокие показатели ответа JIA ACR во всех квартилях сывороточной концентрации голимумаба для JIA ACR 30, 50, 70 и 90 (данные не показаны). По прошествии 52 недель медианная сывороточная концентрация голимумаба была выше у пациентов с ответом на лечение JIA ACR 30 (0,47 мкг/мл, n=83), чем у пациентов, не ответивших на лечение (0,04 мкг/мл, n=12); 6 из 12 пациентов, не ответивших на лечение, были положительными в отношении антител голимумаба.

Показатели ответов JIA ACR 30, 50, 70 и 90 среди разных подтипов pJIA, в целом, были сходными с наблюдаемыми в общей популяции; однако показатели ответа, как правило, были ниже у пациентов с системным pJIA без системных симптомов, но с полиартикулярным течением (на неделе 52 25% пациентов достигли по меньшей мере ответа JIA ACR 70) и, как правило, выше у пациентов с олигоартикулярным продолжительным или ювенильным псориатическим артритом (на неделе 52, 88% и 80%, соответственно, достигли по меньшей мере ответа JIA ACR 70). Следует отметить, что пациентов с этими подтипами заболевания было также меньше, чем пациентов с другими подтипами (таблица 9). Доля ответов JIA ACR 30 на неделе 52 также был сходной у пациентов, ранее применявших и не применявших анти-ФНО-терапию (76% в обеих группах).

Неактивное заболевание JIA ACR достигли 4% пациентов уже на неделе 4, и эта доля увеличилась до 29% на неделе 28 и до 34% на неделе 52 (фиг. 21B). Клиническая ремиссия при приеме лекарственного препарата достигли уже на неделе 28 2%

пациентов и 13% пациентов на неделе 52 (фиг. 21B). Среднее улучшение относительно исходного уровня балла по опроснику CHAQ было отмечено уже на неделе 4 (0,34); показатель увеличился до 0,62 на неделе 28 и оставался стабильным в течение до недели 52 (фиг. 21C). Характер улучшения был сходным оценке боли родителем (фиг. 21C).

Снижение среднего значения JADAS 71 наблюдалось уже на неделе 4 и продолжалось до недели 52 (фиг. 21D). Среднее снижение относительно исходного уровня JADAS 71 составило -21,28 на неделе 28 и -22,18 на неделе 52. Уже на неделе 4 LDA достигли 12% пациентов, а ID — 3% пациентов (таблица 10). К 52 неделе 21% пациентов достигли LDA и 36% достигли ID.

Безопасность

До недели 52 у большинства пациентов (85%) было зарегистрировано как минимум 1 НЯ; 7% пациентов испытали по меньшей мере 1 серьезное НЯ (СНЯ), а 9% — по меньшей мере 1 НЯ, которые привели к прекращению лечения (таблица 11). Более половины пациентов, получивших лечение (65%), перенесли 1 или более инфекций, 6% пациентов перенесли 1 или более серьезных инфекций и 1 пациент перенес оппортунистическую инфекцию. Доля пациентов с инфузионными реакциями была низкой; ни одна из реакций не была тяжелой и не привела к прекращению лечения; воздействие антител к голимумабу на инфузионные реакции отсутствовало. Не сообщалось об активной форме туберкулеза, демиелинизирующих явлениях, анафилактических или сывороточных реакциях. Системная красная волчанка была зарегистрирована у 1 пациента; это явление посчитали несерьезным и не связанным с голимумабом. В течение 52 недель не было зарегистрировано ни одного случая смерти, но после недели 52 был зарегистрирован 1 случай смерти вследствие септического шока (вероятно, из-за запора, приведшего к транслокации бактерий сквозь стенку кишечника). Пациент получил последнюю дозу в/в голимумаба на неделе 76 и умер на неделе 78. Это явление посчитали серьезным, тяжелым по интенсивности и, вероятно, связанным с голимумабом.

В целом, НЯ согласовывали с установленными профилями безопасности голимумаба и другими анти-ФНО-препаратами. Системно-органным классом MedDRA (SOC) с самой высокой частотой ПЯ на неделе 52 был «Инфекции и инвазии» (67%) (таблица 11). Чаще всего отмечаемым НЯ была инфекция верхних дыхательных путей (21,3%) и назофарингит (18%). В течение 52 недель девять (7%) пациентов испытали СНЯ; у 1 (1%) пациента наблюдались диссеминированный опоясывающий герпес,

инфекционное обострение бронхоэктатической болезни, сепсис, ветряная оспа, грибовидный микоз, суицидальные мысли, флегмона, пневмония, стрептококковая пневмония и плевральный выпот (у одного и того же пациента сообщалось о стрептококковой пневмонии и множественном выпоте). Все эти явления, за исключением ветряной оспы, целлюлита и пневмонии, привели к окончательному прекращению в/в применения голимумаба. В течение 52 недель впервые диагностированный передний увеит обоих глаз был зарегистрирован у 1 пациента. Это явление посчитали начинающимся/очень легким и не требующим лечения.

Из 115 пациентов, обследованных на неделе 24, 57 были ANA-отрицательными на исходном уровне, а 13 (23%) были впервые ANA-положительными на неделе 24. Из 110 пациентов, обследованных на неделе 52, 51 был ANA-отрицательным на исходном уровне, а 13 (26%) из этих пациентов были впервые ANA-положительными на неделе 52. Из этих впервые положительных пациентов 7 было ANA-отрицательным на наделе 24, а 6 были ANA-положительными. Шесть пациентов, которые были ANA-положительными на неделе 24, стали ANA-отрицательными на неделе 52, а 1 прекратил исследование. На неделе 24 титры составили 1:40 у 11 пациентов и 1:160 у 2 пациентов. На неделе 52 титры составили 1:40 у 8 пациентов, 1:80 у 3 пациентов и 1:160 у 2 пациентов. Количественное определение оставалось стабильным на протяжении всего исследования. Ни один из пациентов, впервые положительных на неделях 24 и 52, не имел ANA-положительности в анамнезе, и ни один из пациентов не имел положительности на антитела к дцДНК на исходном уровне, неделях 28 и 52.

Таблица 11. Обобщенная информация по возникшим в ходе лечения нежелательным явлениям до недели 52

	Голимумаб (N=127)
Ср. продолжительность последующего наблюдения (недели)	49,8
Средний уровень воздействия, количество введений	6,6
Пациенты, прекратившие применение исследуемого препарата из-за ≥ 1 НЯ	11 (8,7)
Пациенты с ≥ 1 НЯ	108 (85,0)
Пациенты с ≥ 1 тяжелым НЯ	5 (3,9)
Пациенты с ≥ 1 СНЯ	9 (7,1)

НЯ на 100 пациенто-лет воздействия, n (95% ДИ)	359,6 (326,7, 394,9)
СНЯ на 100 пациенто-лет воздействия, n (95% ДИ)	8,2 (4,0, 15,1)
Летальный исход[a]	0
Пациенты с ≥ 1 инфекцией	83 (65,4)
≥ 1 серьезной инфекцией	7 (5,5)
≥ 1 оппортунистической инфекцией	1 (0,8)
Инфекции на 100 пациенто-лет воздействия, n (95% ДИ)	151,4 (130,3, 174,9)
Серьезная инфекция на 100 пациенто-лет воздействия, n (95% ДИ)	6,6 (2,8, 13,0)
Пациенты с ≥1 инфузионной реакцией	3 (2,4)
Пациенты с ≥1 злокачественным новообразованием[b]	1 (0,8)
Пациенты с активной формой туберкулеза	0
ANA/антитела к дцДНК[c]	13 (25,5)
Частые НЯ (встречающиеся в ≥5% пациентов) в разбивке по SOC и связанным PT	
Инфекции и инвазии	85 (66,9)
Инфекция верхних дыхательных путей	27 (21,3)
Назофарингит	23 (18,1)
Заболевания желудочно-кишечного тракта	30 (23,6)
Тошнота	11 (8,7)
Рвота	10 (7,9)
Боль в животе	8 (6,3)
Заболевания скелетно-мышечной и соединительнотканной систем	24 (18,9)
Ювенильный идиопатический артрит	14 (11,0)
Заболевания нервной системы	20 (15,7)
Головная боль	14 (11,0)
Лабораторные исследования	13 (10,2)
Повышение аланинаминотрансферазы	7 (5,5)

Все значения являются n (%), если не указано иное.

[a] Один летальный исход (из-за септического шока) был зарегистрирован на

неделе 78.

[b] Грибовидный микоз

[c] Впервые развившийся; из 51 пациента, которые были ANA-отрицательными на исходном уровне

НЯ — нежелательное явление; ANA — антинуклеарные антитела; Антитела к дцДНК — антитела к двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоте; ДИ — доверительный интервал; N — все пациенты, получавшие лечение; n — число пациентов; PT — предпочтительный термин; СНЯ — серьезное нежелательное явление; СКО — системно-органный класс.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом открытом исследовании фазы 3 с участием пациентов с pJIA в/в голимумаб плюс MTX обеспечили уровень воздействия ФК, сходный с тем, который был эффективным у взрослых с RA. Медианные минимальные сывороточные концентрации голимумаба и AUC_{ss}, в целом, сохранялись с течением времени и были сходными для возрастных групп и квартилей массы тела, что указывает на то, что дозирование, основанное на BSA, позволяло достичь сходного уровня воздействия ФК во всем диапазоне возрастов и массы тела пациентов с pJIA.

Общепризнанно, что осуществлять перекрестные сравнения минимальных равновесных уровней бывает сложно, особенно если минимальные уровни относительно низки и, таким образом, сильно варьируются от исследования к исследованию. Чтобы поместить вариабельность между исследованиями в контекст перекрестных сравнений, минимальные равновесные концентрации, наблюдаемые при pJIA, также сравнивали со всеми 3 исследованиями фазы 3 в/в введения голимумаба, в которых принимали участие взрослые, включая пациентов, страдающих RA, псориатическим артритом и анкилозирующим спондилоартритом. Медианная (среднее значение ± СО) минимальная равновесная сывороточная концентрация голимумаба у пациентов с pJIA на неделе 28, 0,40 мкг/мл (0,50±0,43 мкг/мл) находились в пределах значений, наблюдаемых у взрослых с RA, псориатическим артритом или анкилозирующим спондилоартритом на неделе 36 при в/в введении голимумаба (0,31 [0,41±0,52], 0,61 [0,69± 0,58] и 0,71 [0,74±0,51] мкг/мл, соответственно). Принимая во внимание вариабельность между исследованиями, эти данные ФК подтверждают вывод о том, что равновесные концентрации голимумаба, наблюдаемые у детей в этом

исследовании, в целом были сходными с отмеченными у контрольной группы взрослых с RA.

Примечательно, что в этом исследовании с участием детей у пациентов из квартиля с наивысшей массой тела средняя масса тела составила 73 кг (диапазон: 57,00 до 142,70 кг), что было сходно со средней массой тела контрольной группы взрослых с RA (72 кг; диапазон: 39,00–0125,00 кг). Кроме того, рассчитанная разница в общей дозе для дозы 2 мг/кг, использованной в исследовании RA у взрослых, по сравнению с дозой 80 мг/м^2, использованной в этом исследовании при участии детей, показала небольшую разницу в дозе (в среднем 2%; диапазон: от -13% до 16%) для группы с самым высоким квартилем массы тела, демонстрируя, что пациенты с pJIA в этой группе получали дозы голимумаба, сравнимые с дозами в контрольной группе взрослых с RA. Таким образом, уровень воздействия ФК в группе с самым высоким квартилем массы тела служит внутренним эталоном для сравнения ФК в подгруппах разного возраста и веса, чтобы продемонстрировать, что уровень воздействия ФК во всех подгруппах с pJIA был сходным с таковым в контрольной группы взрослых с RA.

В/в введение голимумаба привело к уменьшению клинических признаков и симптомов pJIA, которые в целом сохранялось до недели 52. Стабильно высокие показатели ответа при JIA ACR 30, 50, 70 и 90 были отмечены в целом, по квартилям минимальных сывороточных концентраций голимумаба для ответа JIA ACR и подтипов pJIA, а также у пациентов, ранее применявших и не применявших анти-ФНО-терапию. Показатели ответа JIA ACR и другие клинические ответы, которые мы наблюдали для в/в голимумаба в этом исследовании, согласуются с данными, полученными для п/к голимумаба и других b-DMARD в сходных исследованиях фазы 3 у пациентов с pJIA.

Медианная минимальная концентрация голимумаба была ниже у ADA-положительных пациентов по сравнению с ADA-отрицательными пациентами, а также у пациентов с JIA ACR 30, не ответивших на лечение, по сравнению с ответившими на лечение. Низкая медианная концентрация голимумаба у пациентов с JIA ACR 30, не ответивших на лечение, в целом была связана с тем, что 6 из 12 пациентов с JIA ACR 30, не ответивших на лечение, были ADA-положительными и имели медианные концентрации голимумаба ниже нижнего предела количественного определения. Тем не менее, как представляется, статус ADA не влиял на профиль эффективности, потому что 6 из 12 пациентов, не ответивших на лечение на неделе 52 также были ADA-отрицательными. Кроме того, показатели ответа JIA ACR 30 были сходными у ADA-

положительных и ADA-отрицательных пациентов (79% по сравнению с 74%, соответственно).

На неделе 52 общий профиль безопасности в/в голимумаба у пациентов с pJIA согласовывался с профилем безопасности в/в голимумаба у взрослых пациентов с ревматическими заболеваниями и п/к голимумаба у пациентов с pJIA. Хотя в течение 52 недель летальных исходов не было, на неделе 78 был зарегистрирован 1 случай смерти, который посчитали вероятно связанным с в/в голимумабом. В сходных исследованиях фазы 3, в которых участвовали пациенты с pJIA, летальных исходов при применении п/к голимумаба и других b-DMARD не зарегистрировано. На неделе 52 тринадцать пациентов имели впервые выработавшиеся антиядерные антитела, и ни у одного из этих пациентов не было антител к дцДНК.

Этическим требованием Международной организации по исследованиям в области педиатрической ревматологии (PRINTO) и Совместной исследовательской группы по педиатрической ревматологии (PRCSG) является то, что компании, участвующие в исследованиях в целях регистрации препарата, должны продолжать предоставлять препарат детям, включенным в клиническое испытание, до тех пор, пока не будет определен альтернативный способ обеспечения препаратом. Как сообщалось ранее, это требование имеет особое значение для стран с меньшими ресурсами, где дети могут не иметь государственной или частной страховки для покрытия высокой стоимости b-DMARD. В этом испытании предоставление лекарственного средства было прекращено через 252 недели для детей, включенных в испытание, которые достигли возраста 18 лет. В/в голимумаб в настоящее время одобрен для лечения RA, псориатического артрита (PsA) или анколизирующего спондилита (AS) во многих странах (7 из 9), участвующих в данном испытании.

Ограничением этого исследования является его открытый, нерандомизированный и неконтролируемый дизайн. Данное исследование было разработано таким образом, чтобы экстраполировать результаты из испытаний эффективности с участием взрослых.

В заключение, в/в голимумаб в дозе 80 мг/м^2 на неделях 0 и 4, а затем 1 р/8 нед до недели 52 с еженедельным введением MTX обеспечивали надлежащий уровень воздействие ФК для обеспечения клинической эффективности у пациентов с активною формой pJIA, включая подгруппу пациентов, ранее получавших анти-ФНО-терапию. Данный режим в/в ввдения голимумаба также хорошо переносился этой группой пациентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >50% пациентов детского возраста соответствуют критериям JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) 30, JIA ACR 50 и JIA ACR 70 после 52 недель лечения.

2. Способ по п. 1, в котором возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

3. Способ по п. 1, в котором указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

4. Способ по п. 1, в котором в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

6. Способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 >20% педиатрических пациентов имеют минимальную оценку активности ювенильного артрита для 71 сустава (JADAS 71), соответствующую низкой активности заболевания после 52 недель лечения.

7. Способ по п. 6, в котором возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

8. Способ по п. 6, в котором указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

9. Способ по п. 6, в котором в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

10. Способ по п. 6, дополнительно включающий введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

11. Способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

12. Способ по п. 11, в котором >30% пациентов детского возраста соответствуют критериям неактивного заболевания JIA ACR после 52 недель лечения.

13. Способ по п. 11, в котором возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

14. Способ по п. 11, в котором указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

15. Способ по п. 11, в котором в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

16. Способ по п. 11, дополнительно включающий введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

17. Способ лечения ювенильного идиопатического артрита (JIA) у пациентов детского возраста, включающий введение пациенту внутривенно (в/в) дозы антитела к

ФНО, причем 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 пациенты детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA Американской коллегии ревматологов (JIA ACR) после 52 недель лечения.

18. Способ по п. 17, в котором >10% пациентов детского возраста соответствуют критериям клинической ремиссии JIA ACR после 52 недель лечения.

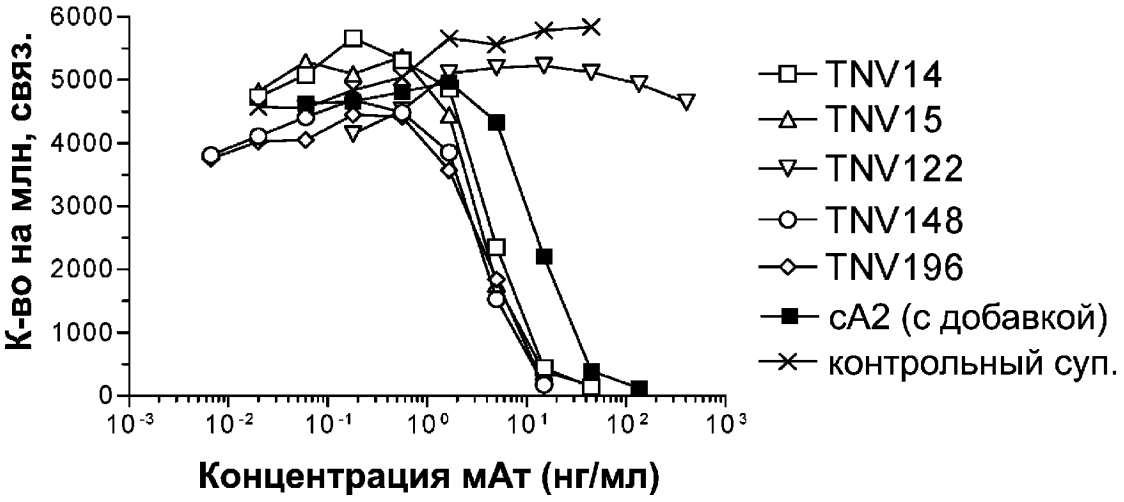
19. Способ по п. 17, в котором возраст указанных пациентов детского возраста составляет от 2 до <18 лет.

20. Способ по п. 17, в котором указанный ювенильный идиопатический артрит (JIA) представляет собой полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит (pJIA).

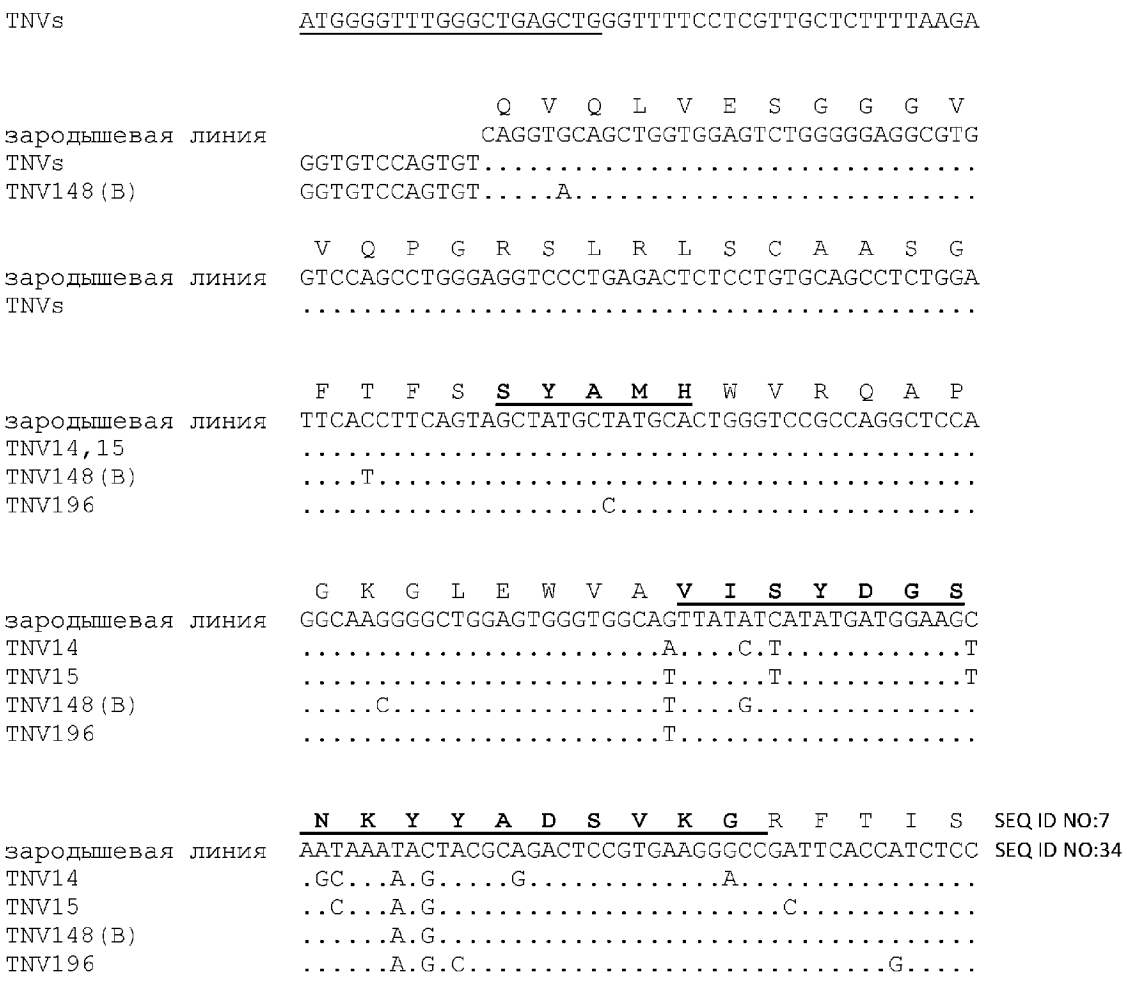
21. Способ по п. 17, в котором в/в доза составляет 80 мг/м^2 антитела к ФНО на неделях 0, 4 и впоследствии каждые 8 недель после этого.

22. Способ по п. 17, дополнительно включающий введение метотрексата (MTX) пациентам детского возраста.

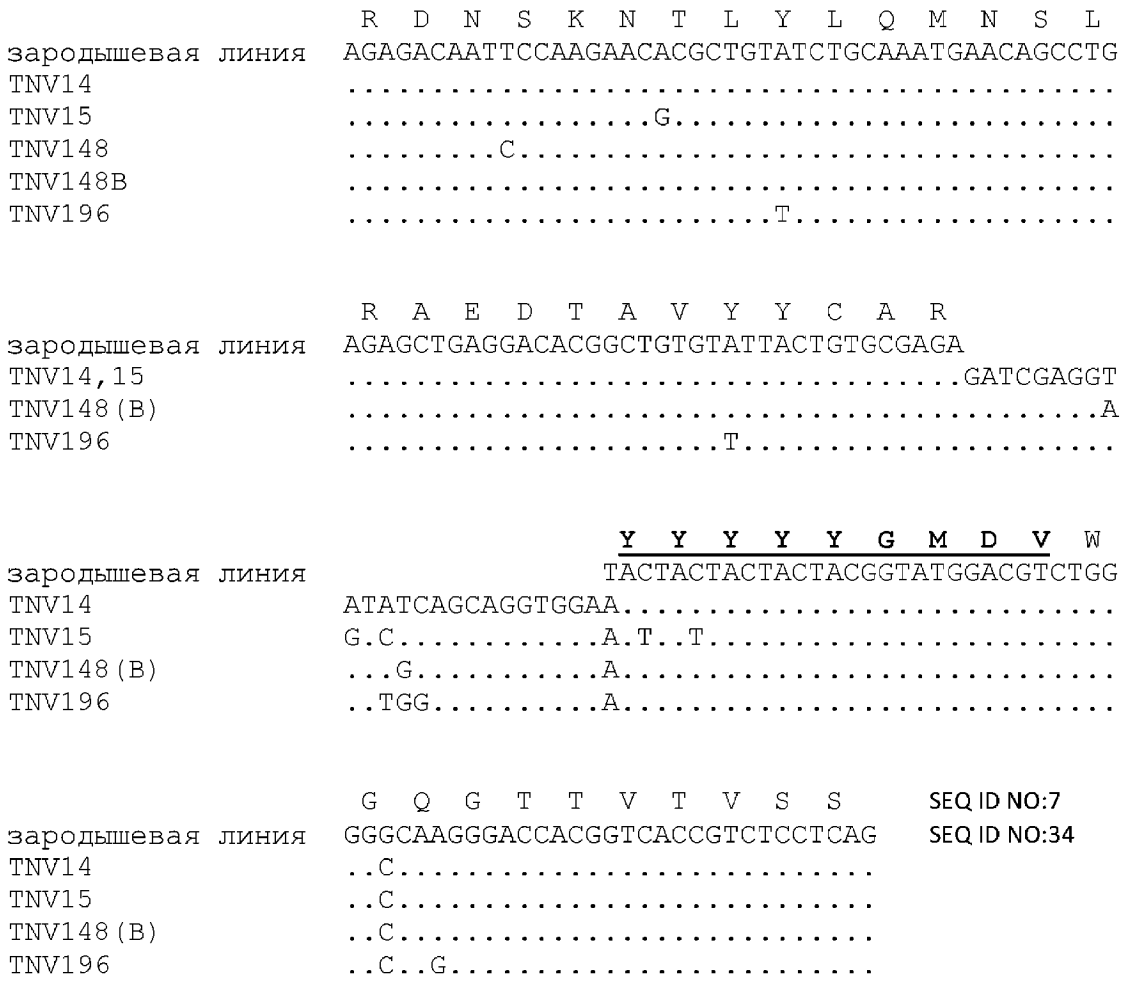
Фиг. 1


К-во на млн, связ.
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
Концентрация мАт (нг/мл)
TNV14
TNV15
TNV122
TNV148
TNV196
cA2 (с добавкой)
контрольный суп.

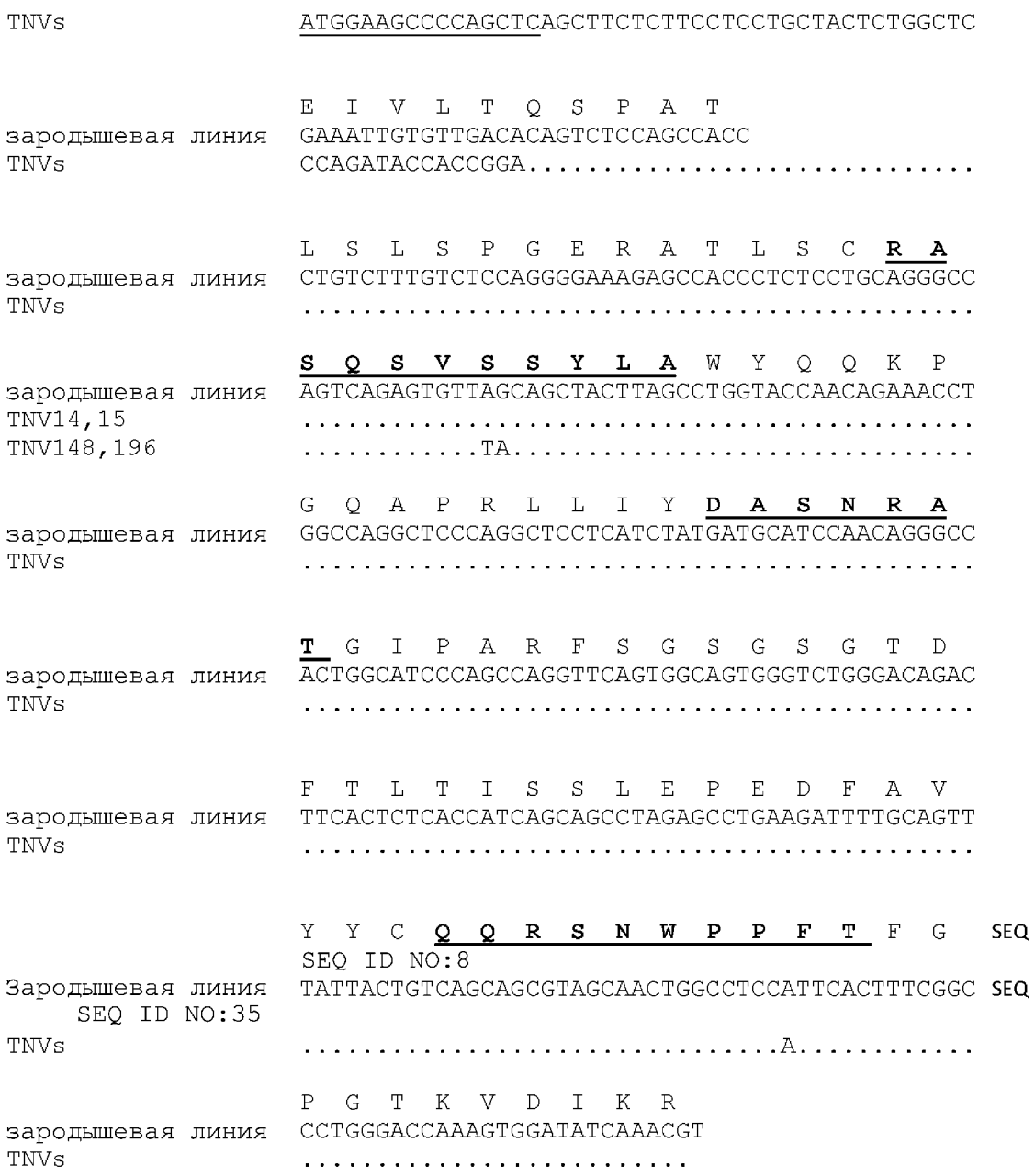
Фиг. 2A


TNVs ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGA
Q V Q L V E S G G G V
зародышевая линия CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG
TNVs GGTGTCCAGTGT.....
TNV148(B) GGTGTCCAGTGT.....A.....
V Q P G R S L R L S C A A S G
зародышевая линия GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TNVs .....
F T F S S Y A M H W V R Q A P
зародышевая линия TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
TNV14,15 .....
TNV148(B) ....T.....
TNV196 .....C.....
G K G L E W V A V I S Y D G S
зародышевая линия GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
TNV14 .....A....C.T.....T
TNV15 .....T.....T.....T
TNV148(B) .....C.....T....G.....
TNV196 .....T.....
N K Y Y A D S V K G R F T I S SEQ ID NO:7
зародышевая 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.....

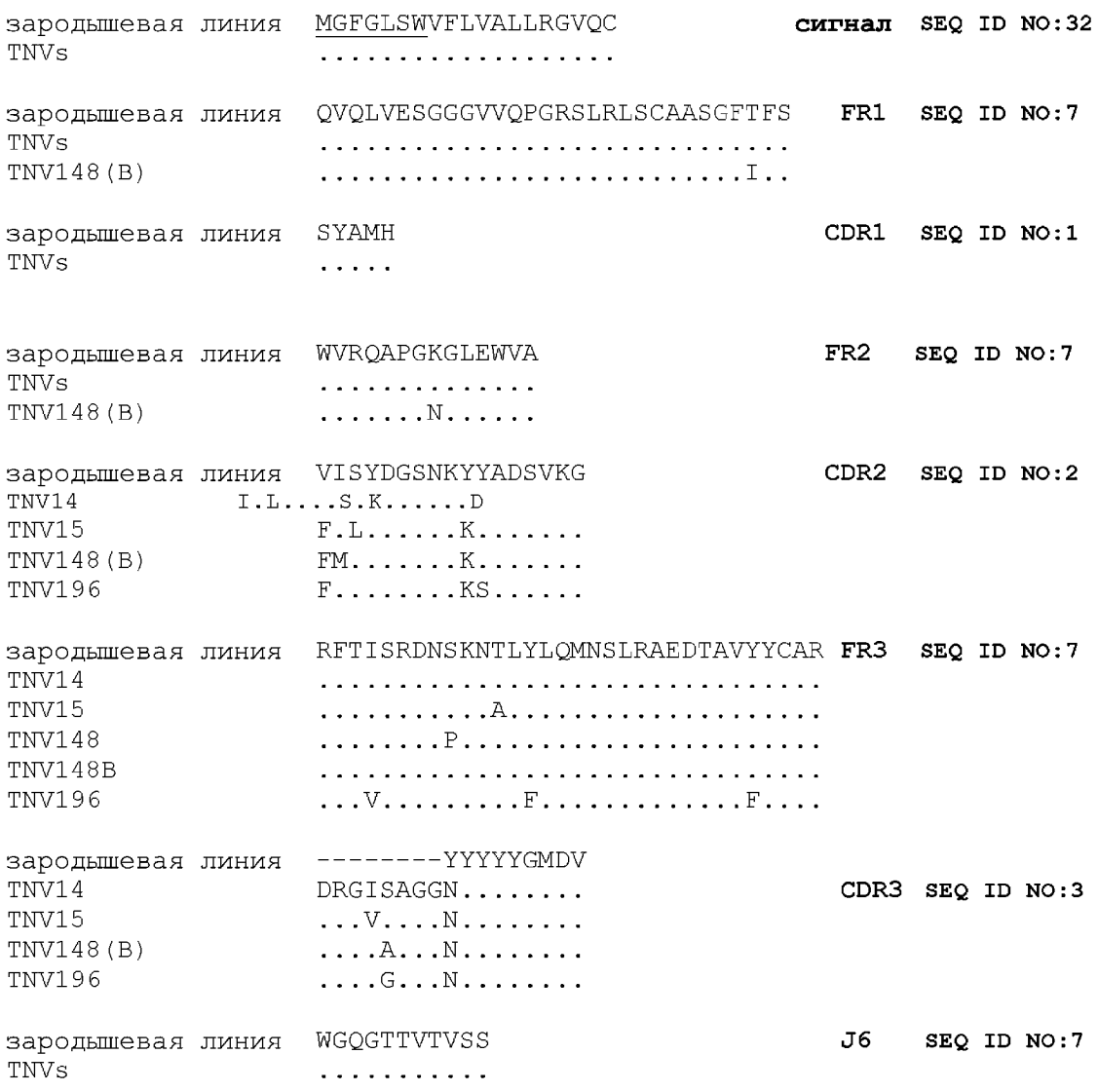
Фиг. 2B


R D N S K N T L Y L Q M N S L
зародышевая линия AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV14 .....
TNV15 .....G.....
TNV148 .....C.....
TNV148B .....
TNV196 .....T.....
R A E D T A V Y Y C A R
зародышевая линия AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV14,15 .....GATCGAGGT
TNV148(B) .....A
TNV196 .....T.....
Y Y Y Y Y G M D V W
зародышевая линия TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
TNV14 ATATCAGCAGGTGGAA.....
TNV15 G.C.....A.T..T.....
TNV148(B) ...G.....A.....
TNV196 ..TGG.....A.....
G Q G T T V T V S S
SEQ ID NO:7
зародышевая линия GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
SEQ ID NO:34
TNV14 ..C.....
TNV15 ..C.....
TNV148(B) ..C.....
TNV196 ..C..G.....

Фиг. 3


TNVs ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC
E I V L T Q S P A T
зародышевая линия GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC
TNVs CCAGATACCACCGGA.....
L S L S P G E R A T L S C R A
зародышевая линия CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
TNVs .....
S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
зародышевая линия AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV14,15 .....
TNV148,196 .....TA.....
G Q A P R L L I Y D A S N R A
зародышевая линия GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
TNVs .....
T G I P A R F S G S G S G T D
зародышевая линия ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TNVs .....
F T L T I S S L E P E D F A V
зародышевая линия TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT
TNVs .....
Y Y C Q Q R S N W P P F T F G SEQ
SEQ ID NO:8
Зародышевая линия TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC SEQ
SEQ ID NO:35
TNVs .....A.....
P G T K V D I K R
зародышевая линия CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
TNVs .....

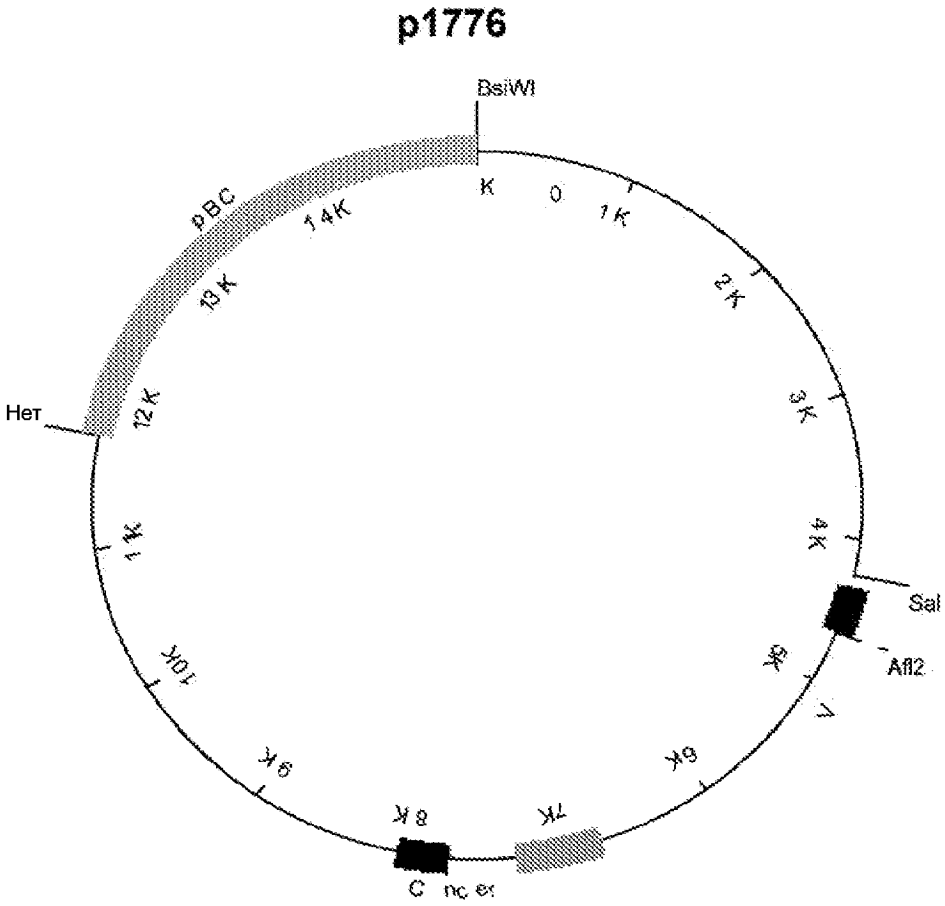
Фиг. 4


зародышевая линия MGFGLSWVFLVALLRGVQC сигнал SEQ ID NO:32
TNVs .....
зародышевая линия QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS FR1 SEQ ID NO:7
TNVs .....
TNV148(B) .....I..
зародышевая линия SYAMH CDR1 SEQ ID NO:1
TNVs .....
зародышевая линия WVRQAPGKGLEWVA FR2 SEQ ID NO:7
TNVs .....
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 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR 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
TNVs .....

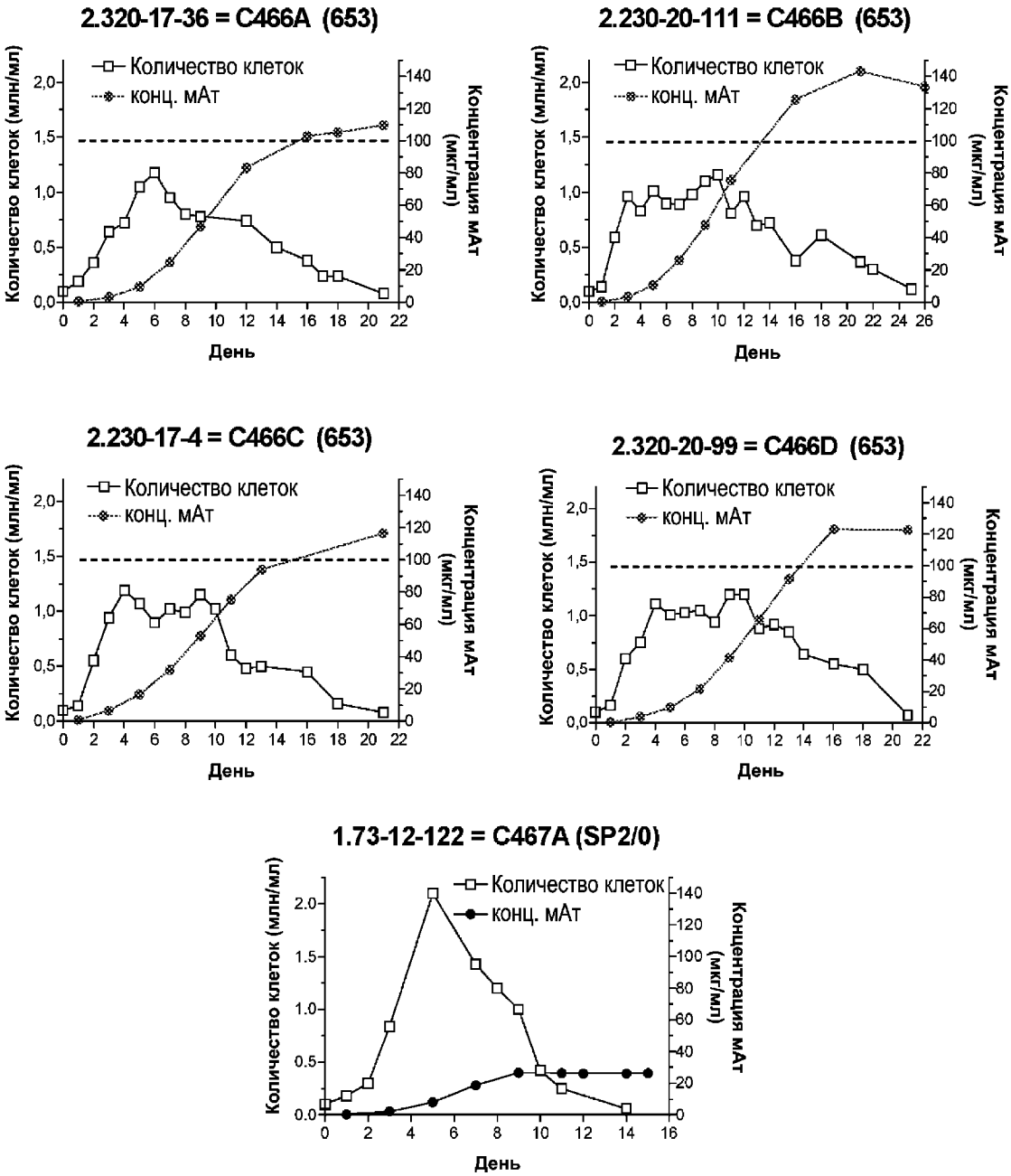
Фиг. 5

TNVs	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	**сигнал SEQ ID NO:33**
зародышевая линия	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**FR1 SEQ ID NO:8**
TNVs	.....	
зародышевая линия	RASQSVSSYLA	**CDR1 SEQ ID NO:4**
TNV14	.....	
TNV15	.....	
TNV148(B)	.....Y....	
TNV196	.....Y....	
зародышевая линия	WYQQKPGQAPRLLIY	**FR2 SEQ ID NO:8**
TNVs	.....	
зародышевая линия	DASNRAT	**CDR2 SEQ ID NO:5**
TNVs	.....	
зародышевая линия	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	**FR3 SEQ ID NO:8**
TNVs	.....	
зародышевая линия	QQRSNWPPFT	**CDR3 SEQ ID NO:6**
TNVs	.....	
зародышевая линия	FGPGTKVDIK	**J3 SEQ ID NO:8**
TNVs	.....	

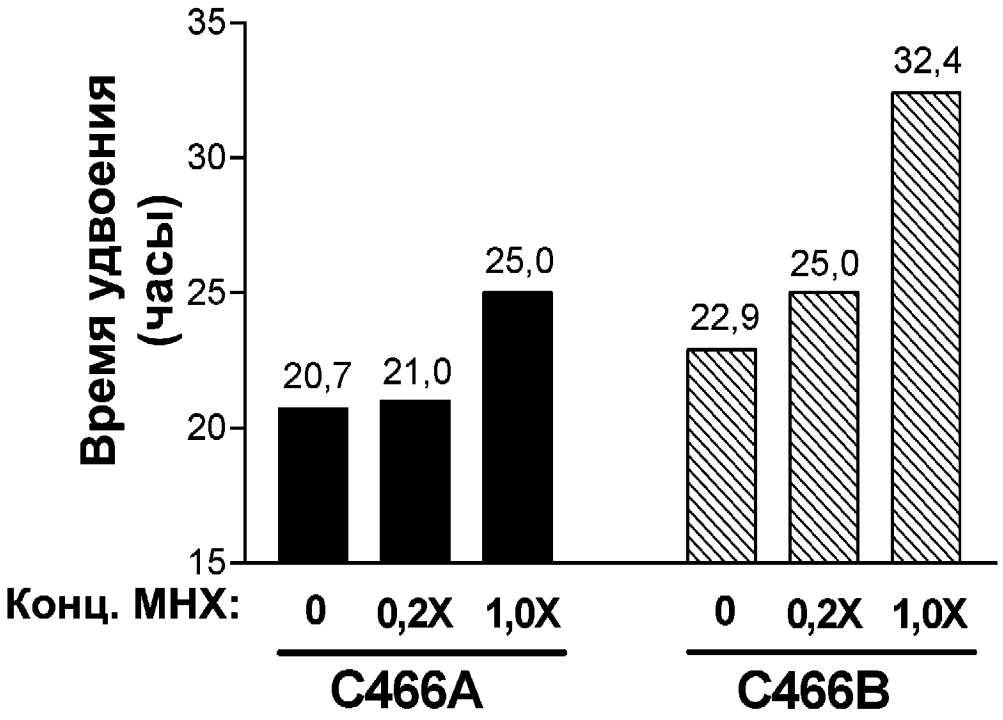
Фиг. 6


p1776
BsiWI
K
0
1K
2K
3K
4K
Sal
Afl2
5K
6K
7K
8K
9K
10K
11K
12K
13K
14K
pBC
Нет
C
nc
ex

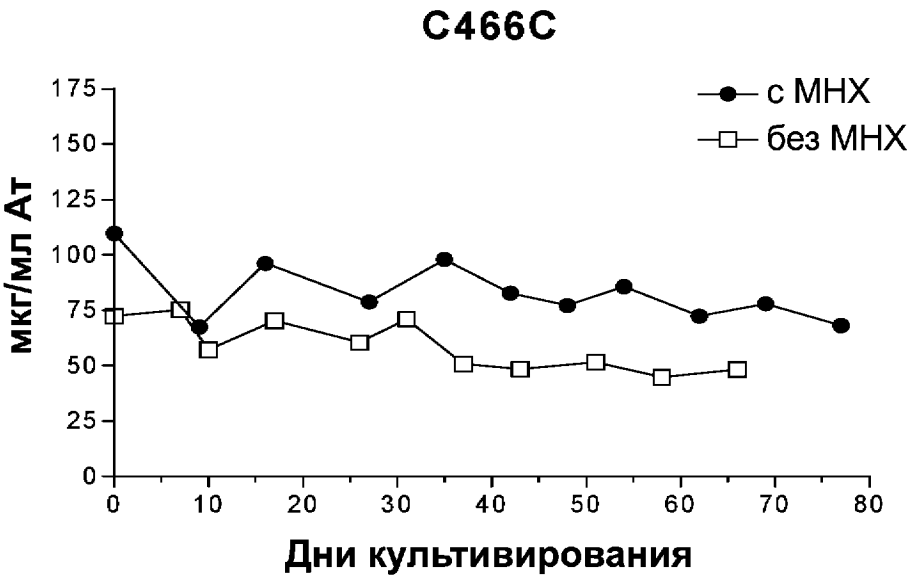
Фиг. 7

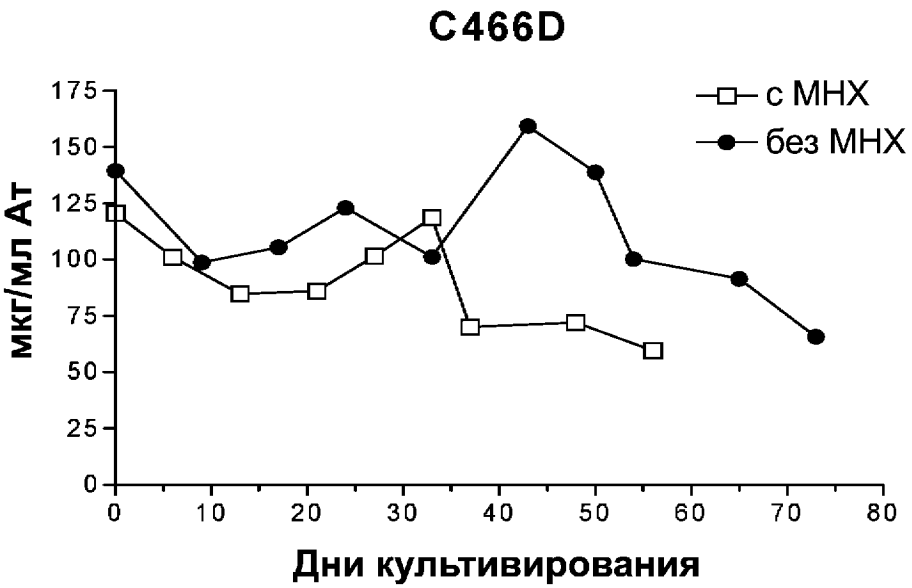

2.320-17-36 = C466A (653)
2.230-20-111 = C466B (653)
2.230-17-4 = C466C (653)
2.320-20-99 = C466D (653)
1.73-12-122 = C467A (SP2/0)
Количество клеток
конц. мАт
Количество клеток (млн/мл)
Концентрация мАт (мкг/мл)
День

Фиг. 8

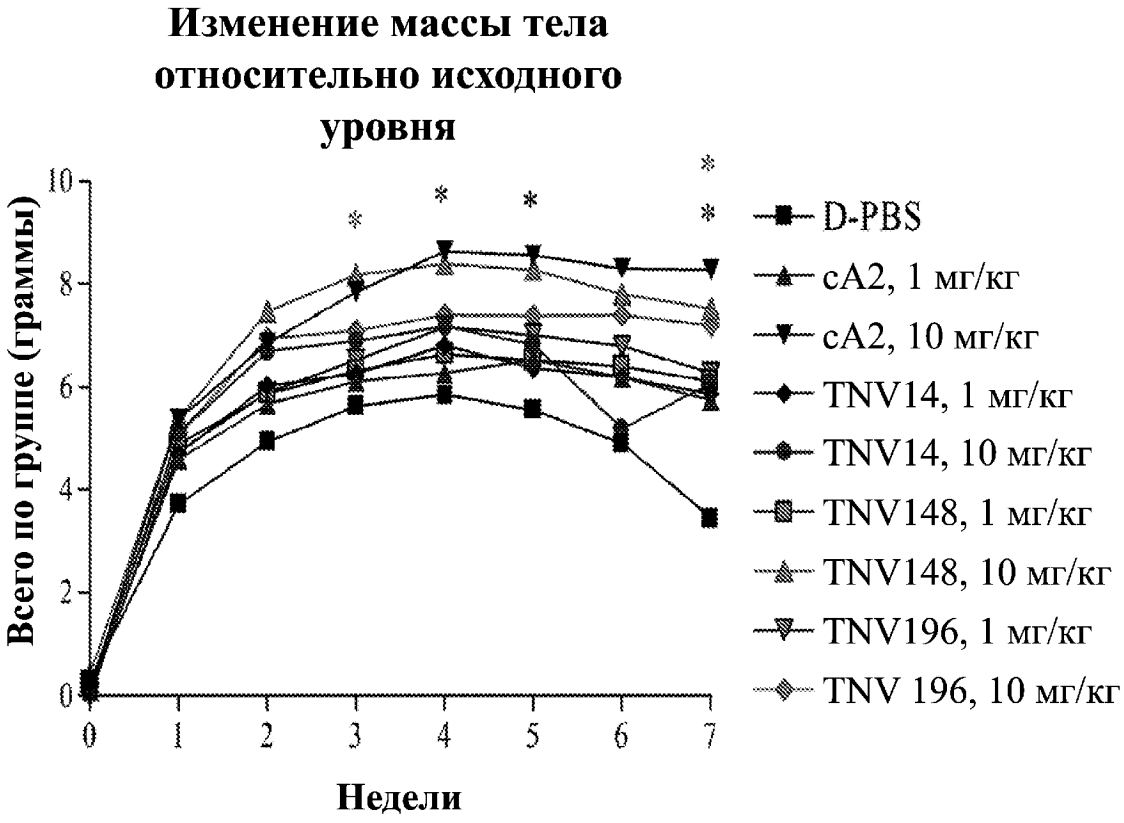

Время удвоения (часы)
35
30
25
20
15
20,7
21,0
25,0
22,9
25,0
32,4
Конц. МНХ:
0
0,2X
1,0X
0
0,2X
1,0X
C466A
C466B

Фиг. 9

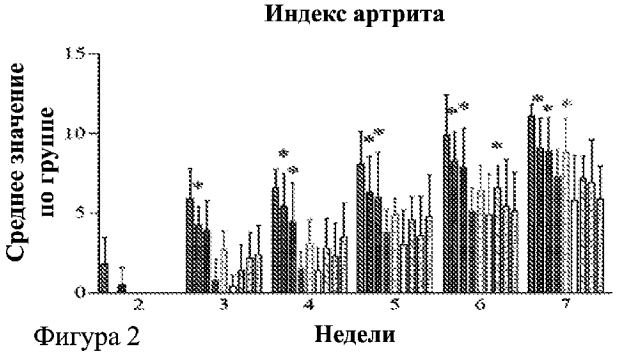

C466C
с МНХ
без МНХ
мкг/мл Ат
0
25
50
75
100
125
150
175
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Дни культивирования


C466D
с МНХ
без МНХ
мкг/мл Ат
0
25
50
75
100
125
150
175
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Дни культивирования

Фиг. 10


Изменение массы тела относительно исходного уровня
Всего по группе (граммы)
Недели
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
5
6
7
*
*
*
*
*
D-PBS
cA2, 1 мг/кг
cA2, 10 мг/кг
TNV14, 1 мг/кг
TNV14, 10 мг/кг
TNV148, 1 мг/кг
TNV148, 10 мг/кг
TNV196, 1 мг/кг
TNV 196, 10 мг/кг

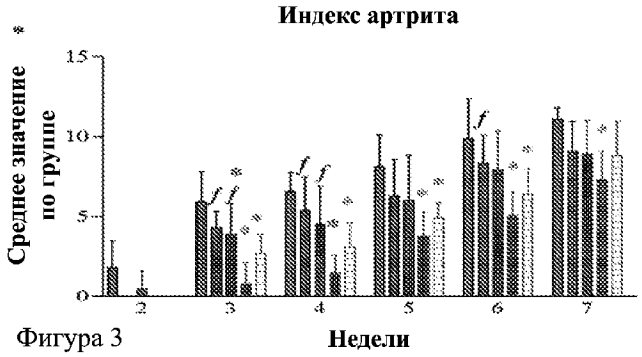
Фиг. 11A



Фигура 2

* указывает на группы, в которых НЕ БЫЛО значимого снижения по сравнению с группой фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (D-PBS). Все неотмеченные группы показали статистически значимые результаты ($p < 0,050$).

Фиг. 11B

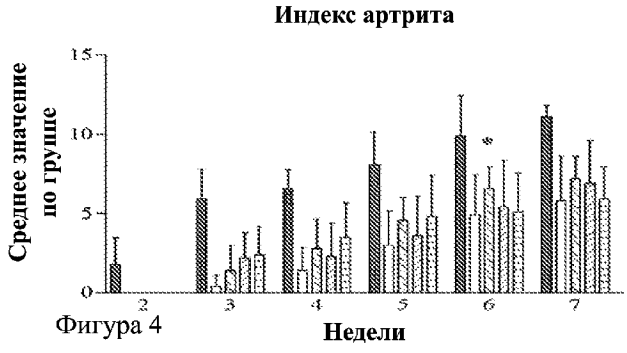


Фигура 3

* значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с физиологическим раствором.

f значимое ПОВЫШЕНИЕ по сравнению с lNV148

Фиг. 11C

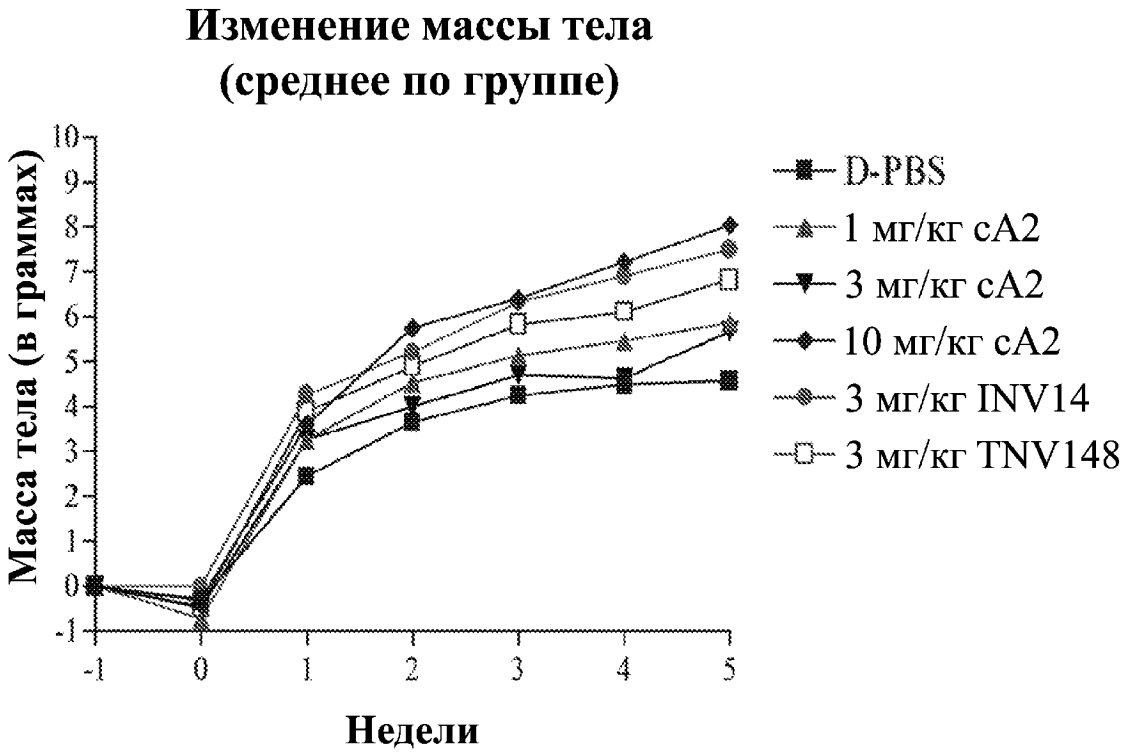


Фигура 4

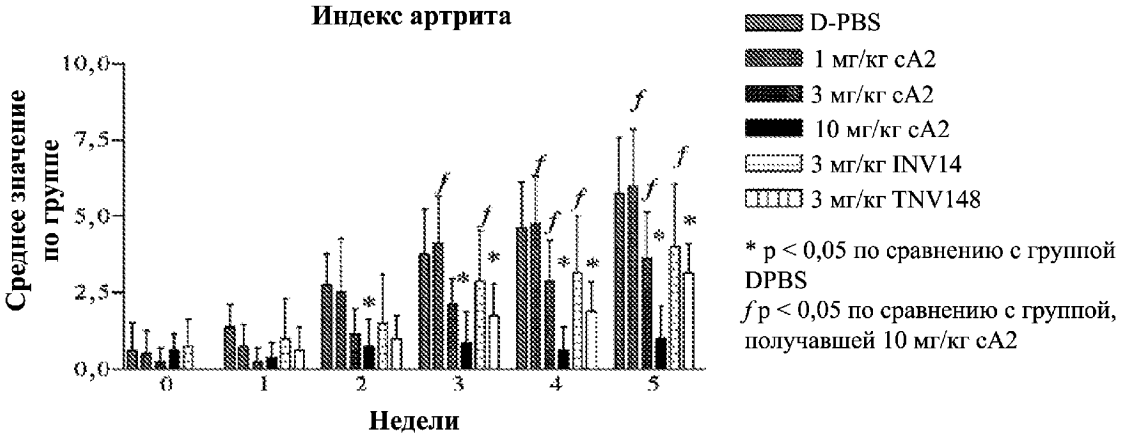
* указывает на группы, в которых НЕ БЫЛО значимого снижения по сравнению с группой D-PBS.

Все неотмеченные группы показали статистически значимые результаты ($p < 0,050$).

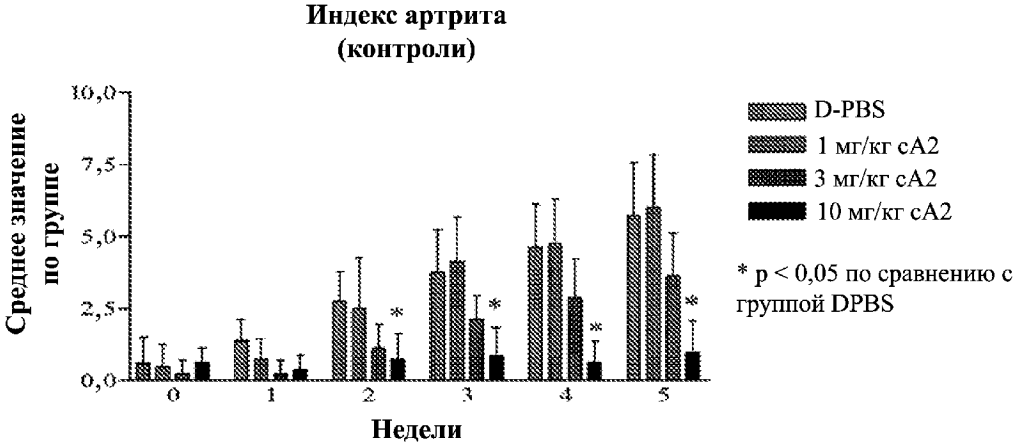
Фиг. 12


Изменение массы тела
(среднее по группе)
Масса тела (в граммах)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-1
0
1
2
3
4
5
Недели
D-PBS
1 мг/кг cA2
3 мг/кг cA2
10 мг/кг cA2
3 мг/кг INV14
3 мг/кг TNV148

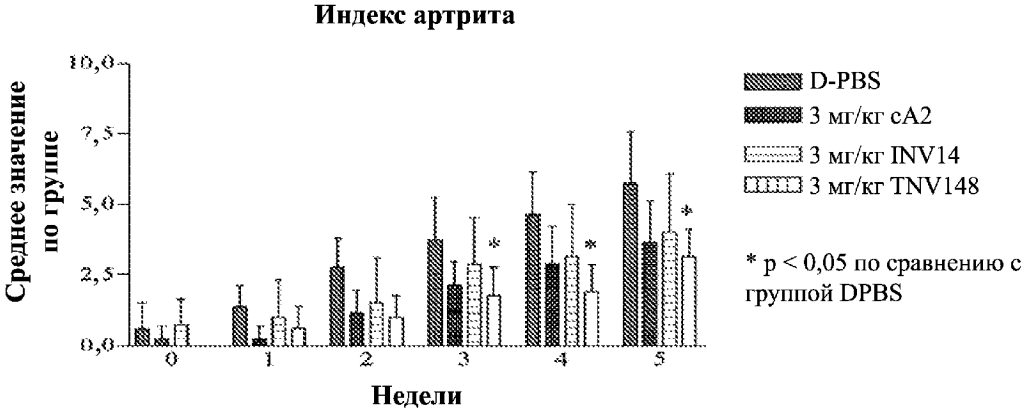
Фиг. 13A



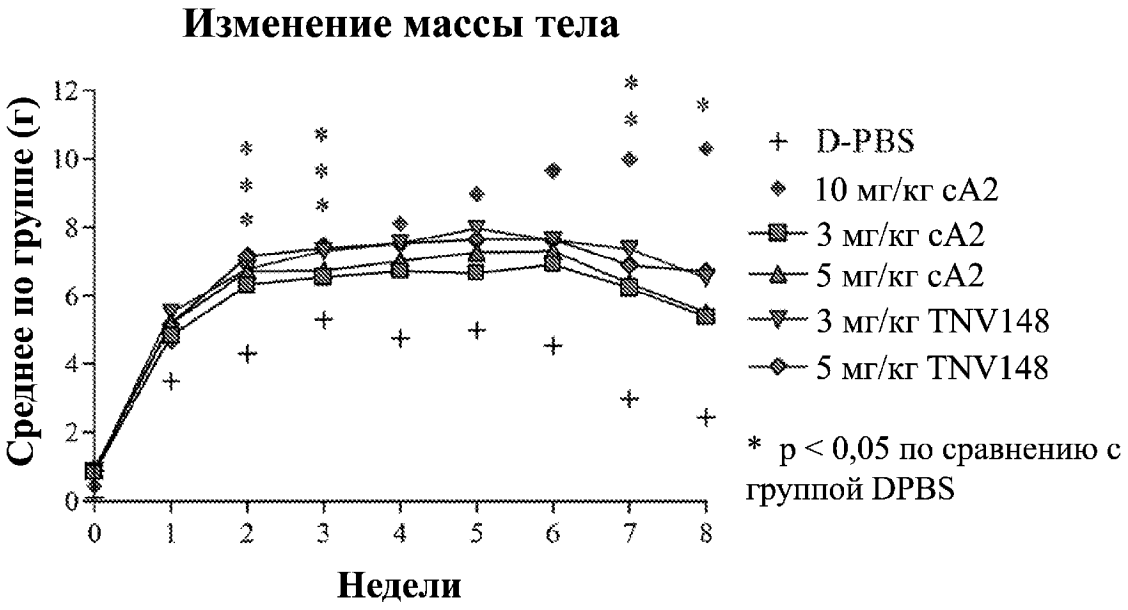
Фиг. 13B



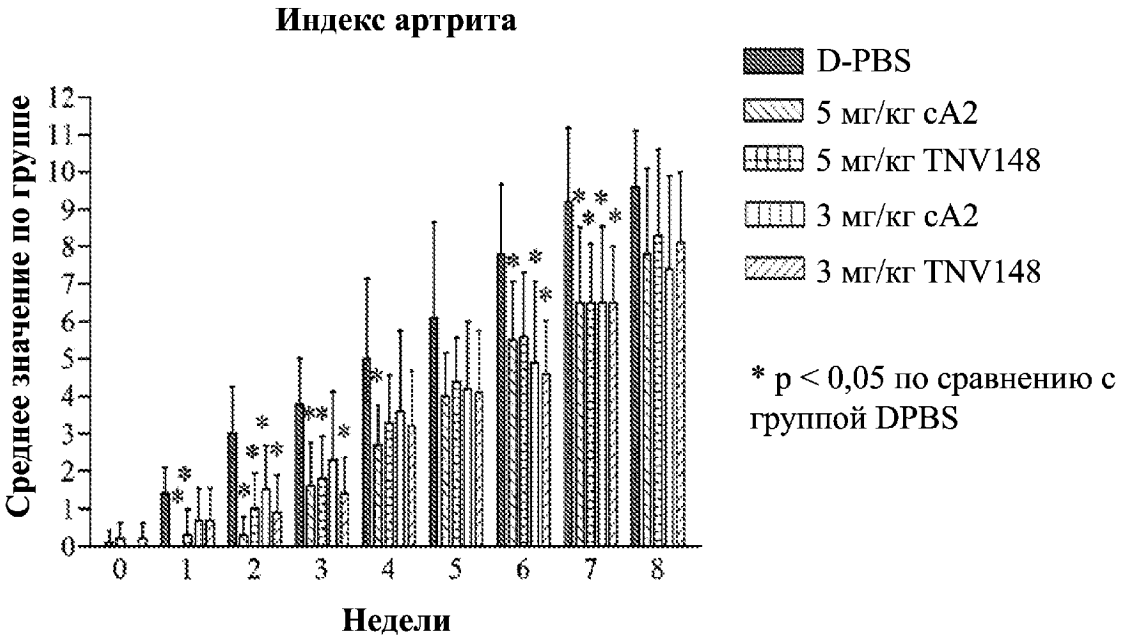
Фиг. 13C



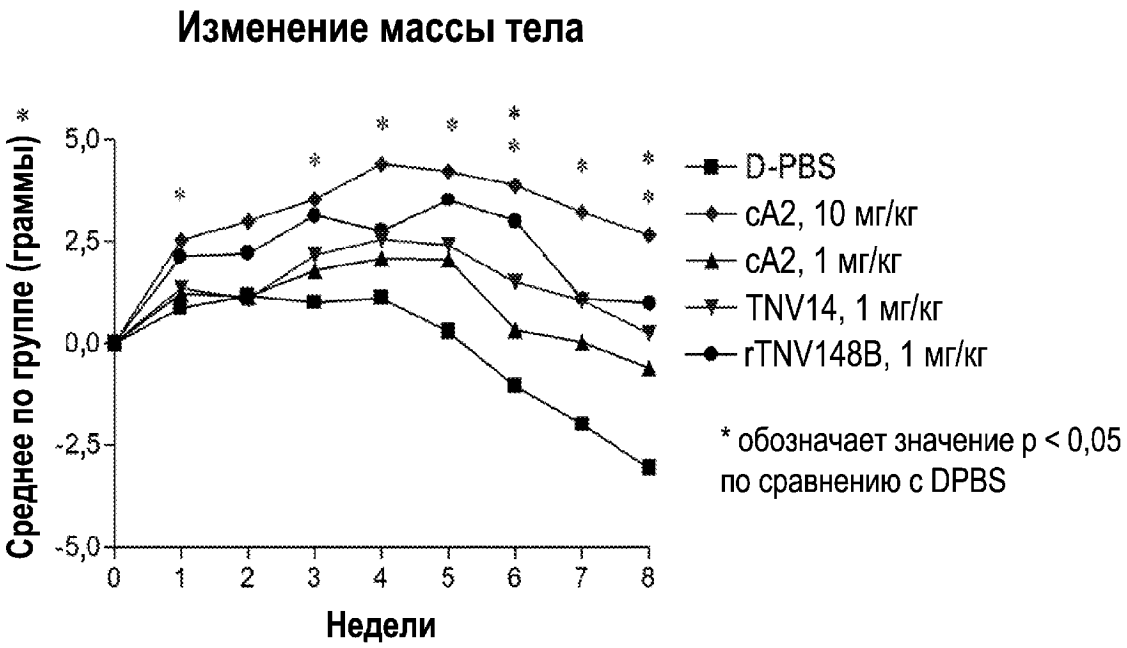
Фиг. 14


Изменение массы тела
Среднее по группе (г)
0
2
4
6
8
10
12
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Недели
D-PBS
10 мг/кг cA2
3 мг/кг cA2
5 мг/кг cA2
3 мг/кг TNV148
5 мг/кг TNV148
* p < 0,05 по сравнению с группой DPBS

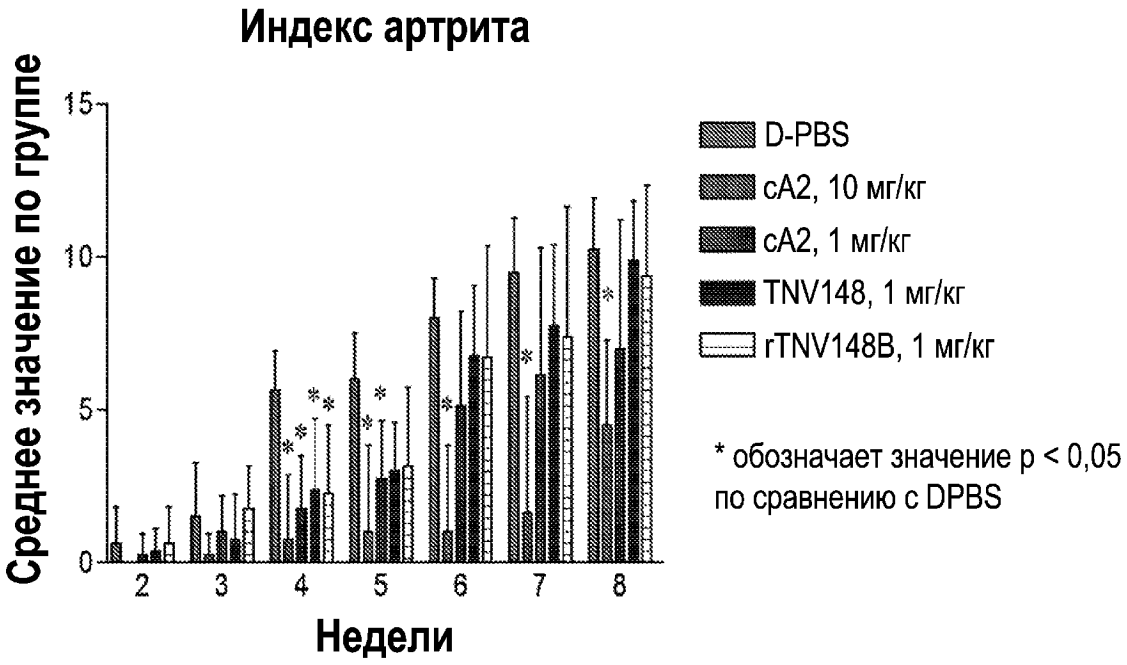
Фиг. 15


Индекс артрита
Среднее значение по группе
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Недели
D-PBS
5 мг/кг cA2
5 мг/кг TNV148
3 мг/кг cA2
3 мг/кг TNV148
* p < 0,05 по сравнению с группой DPBS

Фиг. 16

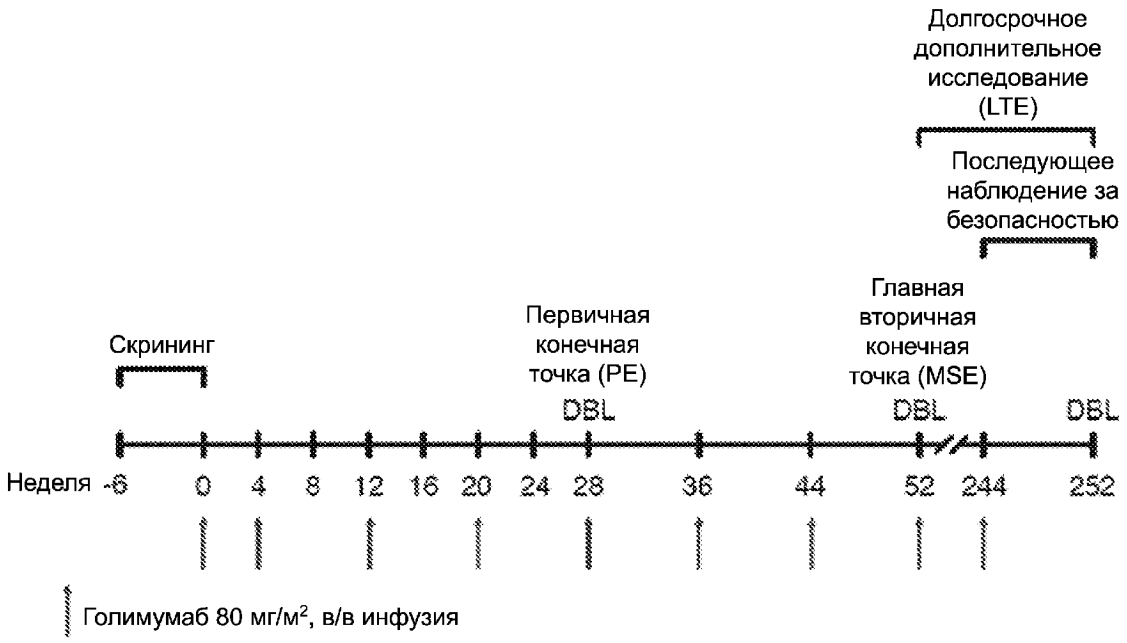

Изменение массы тела
Среднее по группе (граммы)
5,0
2,5
0,0
-2,5
-5,0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Недели
D-PBS
cA2, 10 мг/кг
cA2, 1 мг/кг
TNV14, 1 мг/кг
rTNV148B, 1 мг/кг
* обозначает значение p < 0,05
по сравнению с DPBS

Фиг. 17

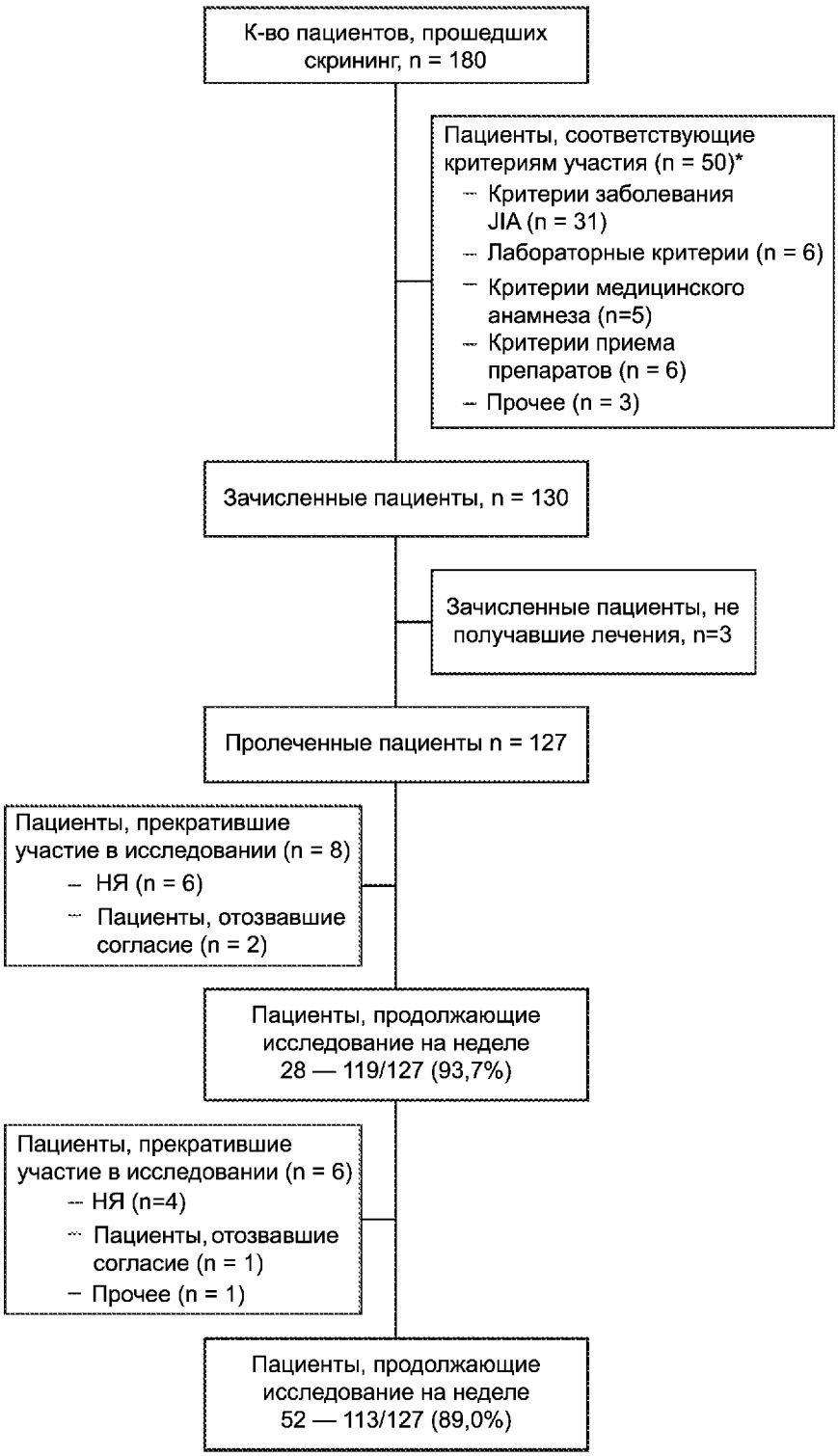

Индекс артрита
Среднее значение по группе
15
10
5
0
2
3
4
5
6
7
8
Недели
D-PBS
cA2, 10 мг/кг
cA2, 1 мг/кг
TNV148, 1 мг/кг
rTNV148B, 1 мг/кг
* обозначает значение p < 0,05
по сравнению с DPBS

Фиг. 18

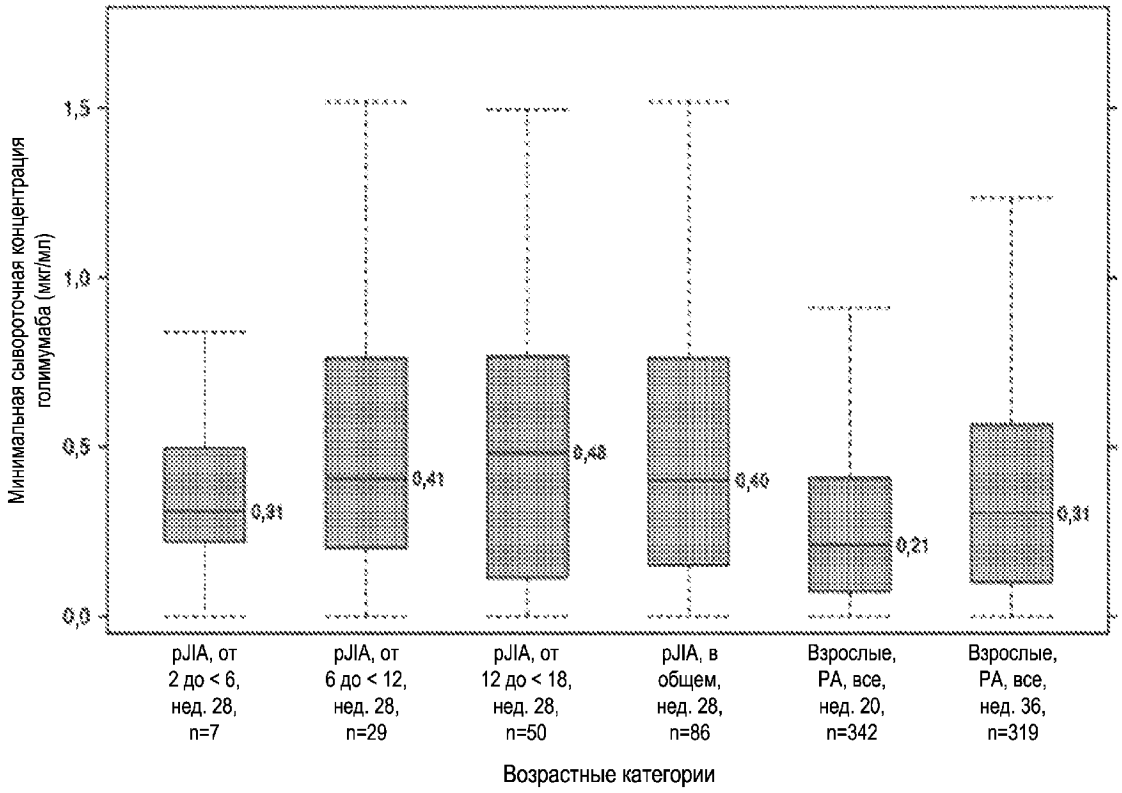
Схематический обзор исследования



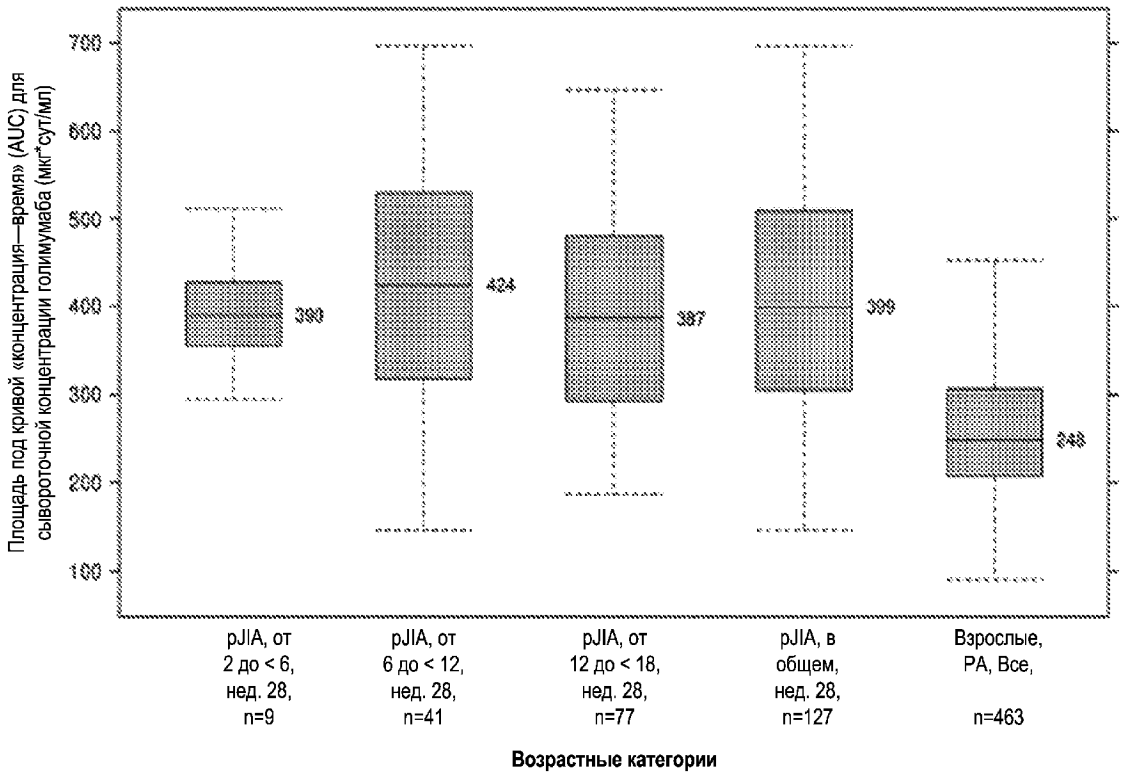
Фиг. 19


К-во пациентов, прошедших скрининг, n = 180
Пациенты, соответствующие критериям участия (n = 50)*
– Критерии заболевания JIA (n = 31)
– Лабораторные критерии (n = 6)
– Критерии медицинского анамнеза (n=5)
– Критерии приема препаратов (n = 6)
– Прочее (n = 3)
Зачисленные пациенты, n = 130
Зачисленные пациенты, не получавшие лечения, n=3
Пролеченные пациенты n = 127
Пациенты, прекратившие участие в исследовании (n = 8)
– НЯ (n = 6)
– Пациенты, отозвавшие согласие (n = 2)
Пациенты, продолжающие исследование на неделе 28 — 119/127 (93,7%)
Пациенты, прекратившие участие в исследовании (n = 6)
– НЯ (n=4)
– Пациенты, отозвавшие согласие (n = 1)
– Прочее (n = 1)
Пациенты, продолжающие исследование на неделе 52 — 113/127 (89,0%)

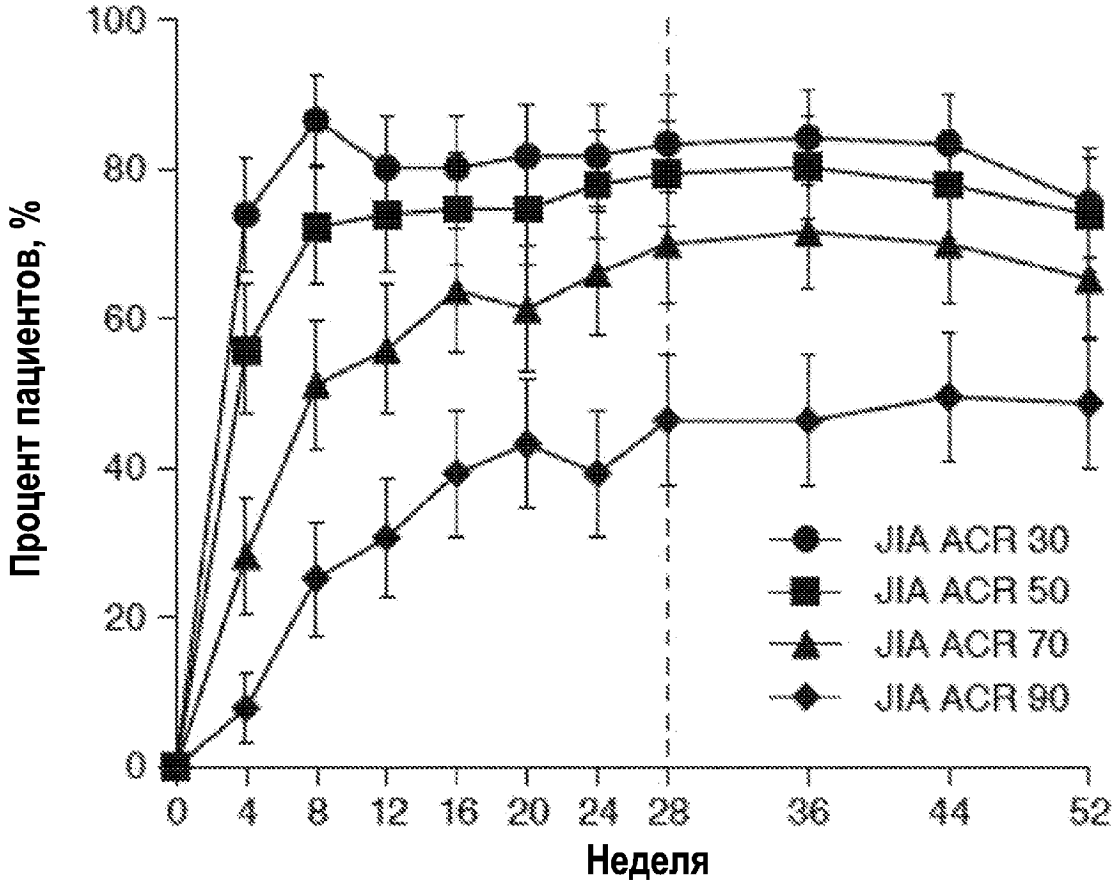
Фиг. 20A


Минимальная сывороточная концентрация голимумаба (мкг/мл)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,31
0,41
0,48
0,40
0,21
0,31
pJIA, от 2 до < 6, нед. 28, n=7
pJIA, от 6 до < 12, нед. 28, n=29
pJIA, от 12 до < 18, нед. 28, n=50
pJIA, в общем, нед. 28, n=86
Взрослые, РА, все, нед. 20, n=342
Взрослые, РА, все, нед. 36, n=319
Возрастные категории

Фиг. 20B

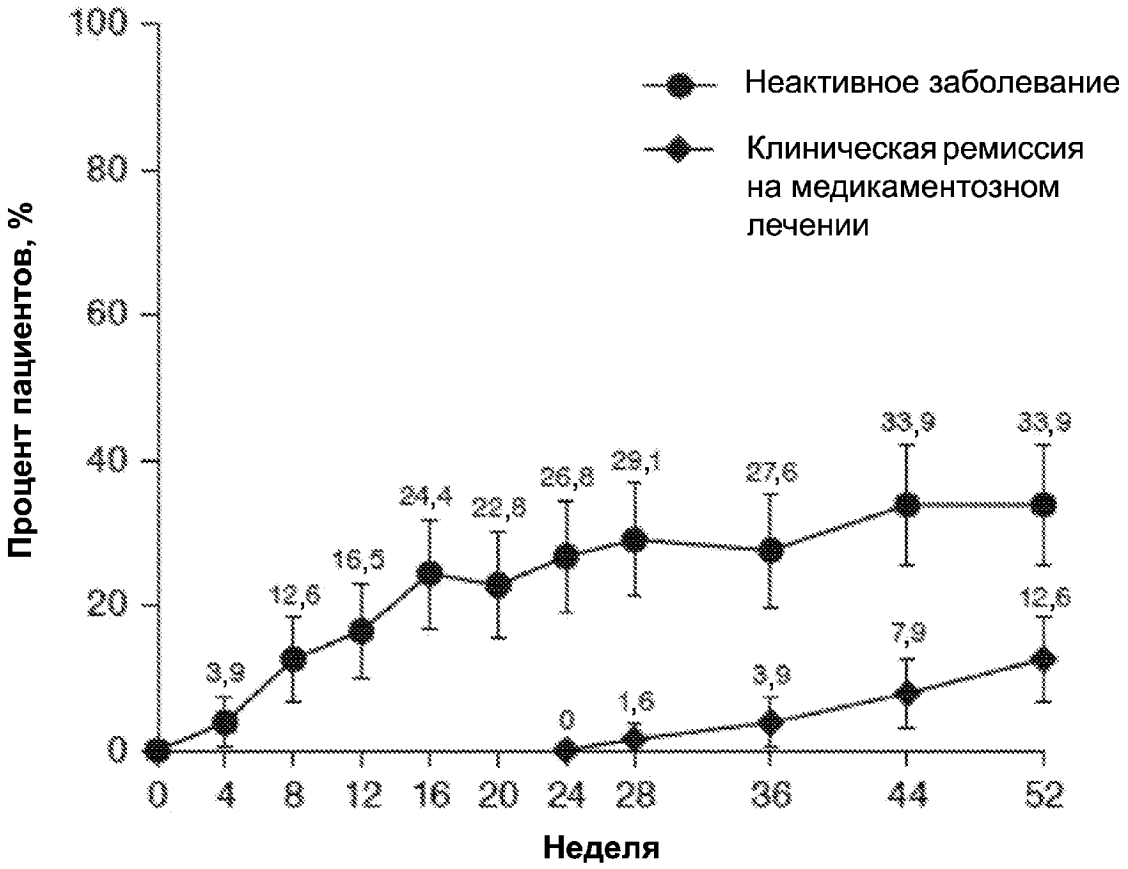

Площадь под кривой «концентрация—время» (AUC) для сывороточной концентрации голимумаба (мкг*сут/мл)
700
600
500
400
300
200
100
390
424
387
399
248
pJIA, от 2 до < 6, нед. 28, n=9
pJIA, от 6 до < 12, нед. 28, n=41
pJIA, от 12 до < 18, нед. 28, n=77
pJIA, в общем, нед. 28, n=127
Взрослые, РА, Все, n=463
Возрастные категории

Фиг. 21A

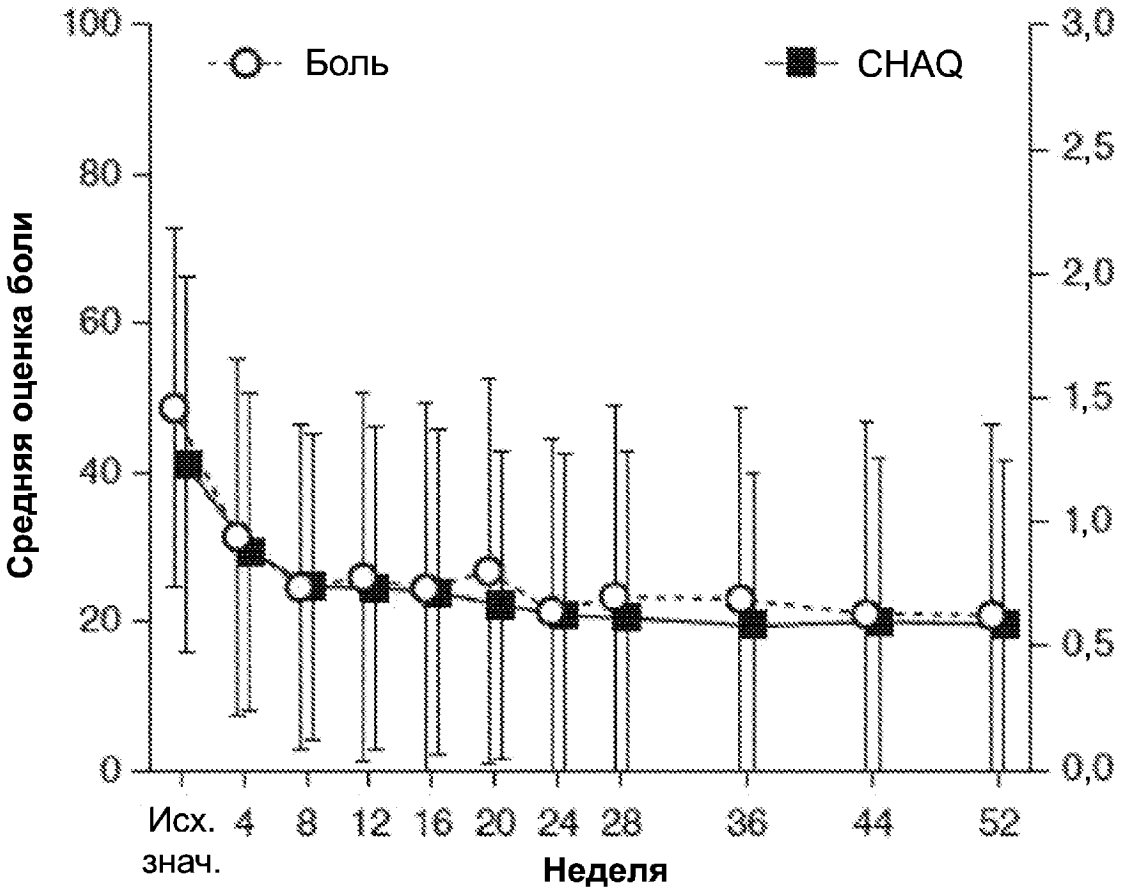


ACR, 30%	0	74,0	86,6	80,3	80,3	81,9	81,9	83,5	84,3	83,5	75,6
ACR, 50%	0	55,9	72,4	74,0	74,8	74,8	78,0	79,5	80,3	78,0	74,0
ACR, 70%	0	28,3	51,2	55,9	63,8	61,4	66,1	70,1	71,7	70,1	65,4
ACR, 90%	0	7,9	25,2	30,7	39,4	43,3	39,4	46,5	46,5	49,6	48,8

Фиг. 21B

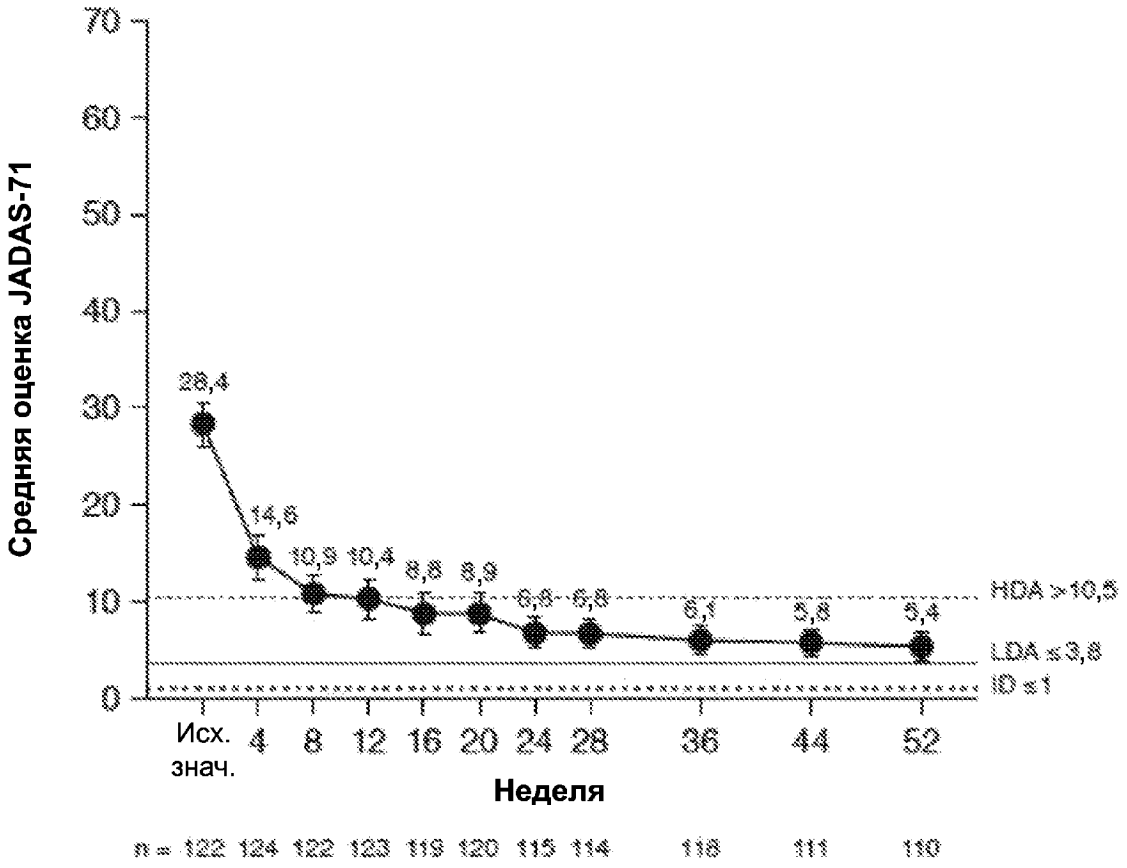

Процент пациентов, %
100
80
60
40
20
0
Неактивное заболевание
Клиническая ремиссия на медикаментозном лечении
3,9
12,6
16,5
24,4
22,6
26,8
29,1
27,6
33,9
33,9
0
1,6
3,9
7,9
12,6
0 4 8 12 16 20 24 28 36 44 52
Неделя

Фиг. 21C



Боль, n =	127	126	124	124	123	120	115	118	118	113	112
среднее	48,6	31,4	24,7	25,9	24,4	26,8	21,4	23,3	23,0	21,0	20,9
CHAQ n=	127	126	123	124	121	119	114	117	117	112	111
среднее	1,23	0,86	0,74	0,74	0,72	0,67	0,62	0,62	0,58	0,60	0,59

Фиг. 21D


Средняя оценка JADAS-71
70
60
50
40
30
20
10
0
28,4
14,6
10,9
10,4
8,8
8,9
6,8
6,8
6,1
5,8
5,4
HDA >10,5
LDA ≤3,8
ID ≤1
Исх. знач.
4
8
12
16
20
24
28
36
44
52
Неделя
n = 122 124 122 123 119 120 115 114 118 111 110