



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201337266 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：102119988

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/566 (2006.01)**

(30)優先權：2005/11/01 美國 60/732,444

(71)申請人：亞培生物科技公司 (百慕達) ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD. (BM)  
百慕達

(72)發明人：麥克斯默奇 華特 P MAKSYMOWYCH, WALTER P. (CA)；汪 羅勃特 L WONG,  
ROBERT L. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：54 項 圖式數：4 共 106 頁

(54)名稱

利用生物標記診斷關節黏連脊椎炎之方法及組合物

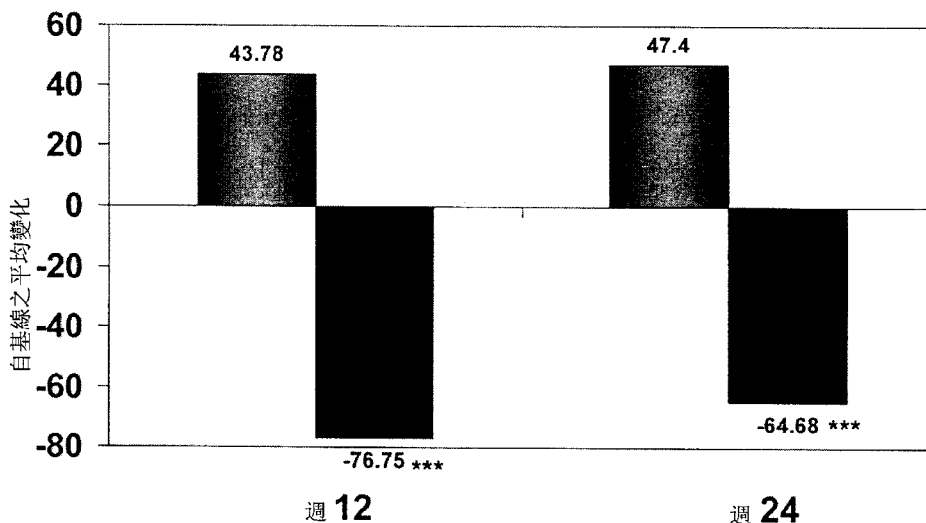
METHODS AND COMPOSITIONS FOR DIAGNOSING ANKYLOSING SPONDYLITIS USING BIOMARKERS

(57)摘要

本發明提供一種使用膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記測定 TNF $\alpha$  抑制劑(諸如 TNF $\alpha$  抗體或其抗原結合部分)用於治療關節黏連脊椎炎(ankylosing spondylitis；AS)之功效的方法。

第12及24週之CTX-II濃度變化<sup>†</sup>

■ 安慰劑      ■ 阿達木單抗



<sup>†</sup> LOCF調整平均值 \*\*\* p=0.001水準時統計學上有效，阿達木單抗對安慰劑



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201337266 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：102119988

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/566 (2006.01)**

(30)優先權：2005/11/01 美國 60/732,444

(71)申請人：亞培生物科技公司 (百慕達) ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD. (BM)  
百慕達

(72)發明人：麥克斯默奇 華特 P MAKSYMOWYCH, WALTER P. (CA)；汪 羅勃特 L WONG,  
ROBERT L. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：54 項 圖式數：4 共 106 頁

(54)名稱

利用生物標記診斷關節黏連脊椎炎之方法及組合物

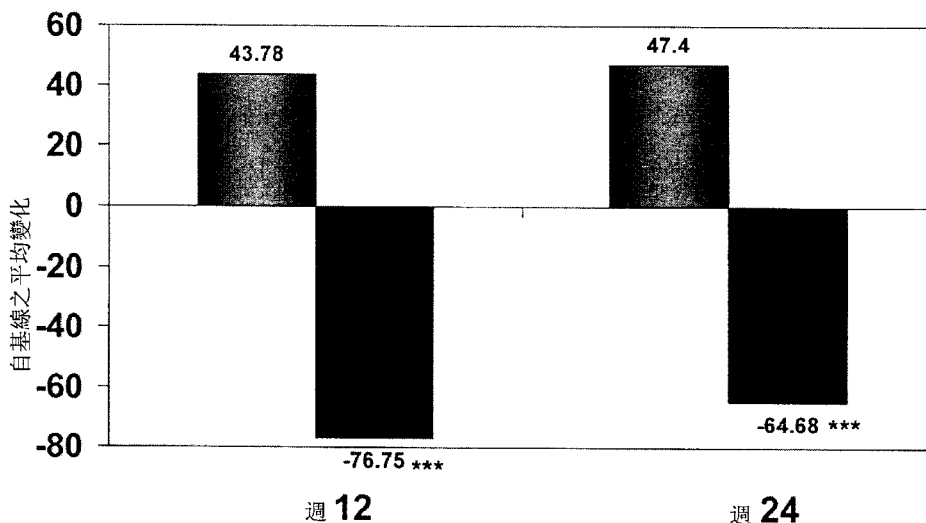
METHODS AND COMPOSITIONS FOR DIAGNOSING ANKYLOSING SPONDYLITIS USING BIOMARKERS

(57)摘要

本發明提供一種使用膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記測定 TNF $\alpha$  抑制劑(諸如 TNF $\alpha$  抗體或其抗原結合部分)用於治療關節黏連脊椎炎(ankylosing spondylitis；AS)之功效的方法。

第12及24週之CTX-II濃度變化<sup>†</sup>

■ 安慰劑      ■ 阿達木單抗



<sup>†</sup> LOCF調整平均值 \*\*\* p=0.001水準時統計學上有效，阿達木單抗對安慰劑

## 發明摘要

※ 申請案號：102119988 (由95140333分案)  
※ 申請日：95.10.31 ※IPC 分類：G01N 33/566 (2006.01)

### 【發明名稱】(中文/英文)

利用生物標記診斷關節黏連脊椎炎之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR DIAGNOSING  
ANKYLOSING SPONDYLITIS USING BIOMARKERS

### 【中文】

本發明提供一種使用膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記測定TNF $\alpha$ 抑制劑(諸如TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於治療關節黏連脊椎炎(ankylosing spondylitis ; AS)之功效的方法。

### 【英文】

The invention provides a method for determining the efficacy of a TNF $\alpha$  inhibitor, such as a TNF $\alpha$  antibody, or an antigen-binding portion thereof, for treating ankylosing spondylitis (AS), using a collagen degradation biomarker and/or a synovitis biomarker.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（2）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

（無元件符號說明）

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

（無）

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

利用生物標記診斷關節黏連脊椎炎之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR DIAGNOSING

ANKYLOSING SPONDYLITIS USING BIOMARKERS

## 【技術領域】

本發明係關於利用生物標記診斷關節黏連脊椎炎之方法及組合物。

## 【先前技術】

高含量之TNF在病理性炎症中起重要作用。亦稱為(TNF $\alpha$ )的TNF與包括膿毒症、感染、自體免疫疾病、移植物排斥反應及移植物抗宿主病在內之多種人類疾病及病症的病理生理學有關。(參見，例如Moeller等人，(1990) Cytokine 2:162；頒予Moeller等人的美國專利第5,231,024號；Moeller, A等人之歐洲專利第260 610 B1號；Vasilli (1992) Annu. Rev. Immunol. 10:411；Tracey及Cerami (1994) Annu. Rev. Med. 45:491)。

與高含量TNF關聯之關節黏連脊椎炎(AS)(Lange等人(2000) Eur J Med Res. 5(12):507)為一種普通的炎性風濕性疾病，該疾病導致進行性脊椎僵硬及活動能力受限。AS為脊柱及骶髂關節之慢性炎症形式，其會造成脊柱內及脊柱周圍疼痛及僵硬。隨著時間遷移，慢性脊椎炎症(脊椎炎)會導致椎骨完全黏連在一起(融合)，此過程稱為關節黏連，其又會導致脊柱活動能力喪失。

AS通常使用包括檢查症狀、身體檢查及X射線分析在內之方法之組合來診斷。AS患者的症狀包括伴有或不伴有其他關節、腱及器官

炎症之脊柱及骶骨區域的疼痛及晨起僵硬。然而，AS之早期症狀可極具欺騙性，由於下背僵硬及疼痛可見於多種其他病狀中，因此過一段時間才考慮診斷為AS。此外，患者之身體檢查可揭示發炎病徵及關節活動範圍降低，脊柱中通常尤其明顯。下背及/或頸的可撓曲性會降低。由脊柱之X射線異常或血液測試遺傳標記HLA-B27基因之存在可暗示診斷的其他線索。

結構損壞與AS相關，且由導致關節破壞的關節軟骨及骨中之退化及再吸收引起。在治療上，重要的為識別患有AS之患者的症狀以及與該疾病關聯之關節破壞所引起之結構損壞。

AS之傳統治療包括將非類固醇消炎藥(NSAID)投與患者以減輕脊柱及其他關節之疼痛及僵硬。常用之NSAID包括吲哚美辛(indomethacin)(Indocin)、托美汀(tolmetin) (Tolectin)、舒林酸(sulindac)(Clinoril)、萘普生(naproxen) (Naprosyn)及雙氯芬酸(diclofenac)(Voltaren)。最近，已證明諸如依那西普(etanercept)、英利昔單抗(infliximab)及阿達木單抗(adalimumab)之抗TNF生物製劑可有效減輕與AS關聯之症狀。

### 【發明內容】

儘管使用抗TNF生物製劑改良AS之治療，但需要診斷性及預後性測試以幫助執業醫師診斷患者症狀及推薦適當之治療方式。此外，需要診斷性及預後性測試以更好地評估患者疾病狀況之改善，其可提供對患者之更佳醫療護理以及降低之治療成本。

本發明提供可用於判定患者總體AS疾病狀況(尤其對於與AS關聯之結構損壞)之改良的生物標記。本發明描述一種判定TNF抑制劑減輕軟骨退化及/或與AS關聯之滑膜炎之功效的方法。本發明亦包括一種根據AS患者軟骨退化程度及/或滑膜炎生物標記鑑別適合以TNF抑制劑(例如阿達木單抗)治療之AS患者的方法。

本發明描述判定人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分用於治療關節黏連脊椎炎(AS)之功效的方法，該方法包含將以人類TNF $\alpha$ 抗體治療後之患有AS患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的預定含量與與該病態關聯之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量比較；及評估該患者之治療後膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量是否低於該膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量，其中相對於該已知標準含量以人類TNF $\alpha$ 抗體治療後之患者的膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量較低表示人類TNF $\alpha$ 抗體可有效治療AS。

本發明亦提供監測人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分用於減緩患者中與關節黏連脊椎炎關聯之結構損壞發展之功效的方法，該方法包含測定患者中膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的含量及比較該膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的含量與與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量，其中生物標記含量下降表示人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分可有效降低患者中與AS相關之結構損壞之發展速率。

本發明包括預測人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分用於治療患者中AS之功效的方法，該方法包含將以人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分治療後之患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的預定含量與與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量比較；及評估患者之治療後膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量是否低於該膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量，其中相對於已知標準含量患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量較低表示人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分預計可有效治療患者之AS。

本發明亦描述判定人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分對於關節黏

連脊椎炎(AS)之功效的方法，該方法包含將獲自患有AS患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的治療前含量與獲自該患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的治療後含量比較，其中治療後生物標記含量較低表示人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之功效。

在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。在另一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為尿II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。在另一實施例中，該滑膜炎生物標記為血清金屬蛋白酶3(MMP3)。

在一實施例中，判定人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分用於改善與AS關聯之結構損壞的功效。

在一實施例中，本發明之方法進一步包含將患者之C-反應性蛋白(CRP)含量與與該病態關聯之已知標準CRP含量比較；及

評估患者之CRP含量是否高於已知標準CRP含量，其中C-反應性蛋白含量相對於已知標準較低表示治療功效。

在一實施例中，人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分以均由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-8}$  M或小於 $1 \times 10^{-8}$  M之 $K_d$ 及 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離，且在標準活體外L929檢定中以 $1 \times 10^{-7}$  M或小於 $1 \times 10^{-7}$  M之 $IC_{50}$ 中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性。

在一實施例中，該人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分具有以下特性：

a)以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離；



b)具有輕鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列，或在位置1、4、5、7或8藉由單丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9藉由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：3修飾之胺基酸序列；

c)具有重鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列，或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11藉由單丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12藉由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：4修飾之胺基酸序列。

在另一實施例中，該人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分包含具有CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)，該CDR3域包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列，或在位置1、4、5、7或8藉由單丙胺酸取代自SEQ ID NO：3修飾之胺基酸序列；且包含具有CDR3域之重鏈可變區(HCVR)，該CDR3域包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列，或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11藉由單丙胺酸取代自SEQ ID NO：4修飾之胺基酸序列。

在本發明之另一實施例中，該人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分包含包括SEQ ID NO：1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)及包括SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)。

在又一實施例中，該人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為阿達木單抗。

在本發明之另一實施例中，使用ELISA測定生物標記含量。

本發明亦包括一種用於執行上述方法中之任一者的套組，該套組包含特異性識別膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的可偵測劑；使用說明書；及視情況之用於自患者分離樣品之試劑。

在一實施例中，該可偵測劑識別尿CTX-II或者血清MMP3。

本發明亦提供判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於治療患者中AS之功效的方法，該方法包含將以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患者之CTX-II的預定含量

與與該病態關聯之CTX-II的已知標準含量比較；及評估該患者之治療後CTX-II含量是否低於已知CTX-II標準含量，其中相對於已知標準含量該患者之CTX-II含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效治療該患者之AS。

本發明進一步提供判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於減輕患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞之功效的方法，該方法包含將以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患有AS患者之CTX-II的預定含量與與該病態關聯之CTX-II的已知標準含量比較；及評估該患者之治療後CTX-II含量是否低於CTX-II之已知標準含量，其中相對於該已知標準含量以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患者的CTX-II含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效減少患者中與AS關聯的結構損壞。

本發明亦提供判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於治療患者中AS之功效的方法，該方法包含將獲自該患者之CTX-II之預定、治療後含量與獲自該患者之CTX-II之預定、治療前含量比較；及評估該治療後CTX-II含量是否低於該治療前CTX-II含量，其中相對於治療前CTX-II含量該患者之治療後CTX-II含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效治療患者中之AS。

在一實施例中，治療後CTX-II含量相對於治療前CTX-II含量減少至少約5-10%。在另一實施例中，治療後CTX-II含量相對於治療前CTX-II含量減少至少約9%。

在一實施例中，CTX-II為尿CTX-II。

在一實施例中，CTX-II含量係使用ELISA測定。

本發明亦描述判定患有AS患者是否適合以阿達木單抗治療的方法，該方法包含將該患者之膠原蛋白降解生物標記含量與未感染受檢者之已知標準膠原蛋白降解生物標記含量比較，及評估該患者之膠原蛋白降解生物標記含量是否高於已知標準膠原蛋白降解生物標記含量，其中較高生物標記含量表示該患者適合以阿達木單抗治療。

在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽。在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記之含量係藉由量測患者尿中之II型膠原蛋白C-端肽之濃度來測定。

在一實施例中，本發明進一步包含將該患者之滑膜炎生物標記含量與未感染受檢者之已知標準滑膜炎生物標記含量比較；及評估該患者之滑膜炎生物標記含量是否高於已知標準滑膜炎生物標記含量，其中較高患者滑膜炎生物標記含量表示該患者適合以阿達木單抗治療。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。

本發明包括判定患有AS患者是否適合以阿達木單抗治療的方法，該方法包含將該患者之滑膜炎生物標記含量與未感染受檢者之已知標準滑膜炎生物標記含量比較，及評估該患者之滑膜炎生物標記含量是否高於已知標準滑膜炎生物標記含量，其中較高生物標記含量表示該患者適合以阿達木單抗治療。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記之含量係藉由量測患者之MMP3血清濃度來測定。

在一實施例中，本發明進一步包含將該患者之膠原蛋白降解生物標記含量與未感染受檢者之已知標準膠原蛋白降解生物標記含量比較；及評估該患者之膠原蛋白降解生物標記含量是否高於已知標準膠原蛋白降解生物標記含量，其中較高患者膠原蛋白降解生物標記含量表示該患者適合以阿達木單抗治療。

在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽。

本發明包括監測治療性治療關節黏連脊椎炎(AS)之功效的方法，該方法包含測定受檢者中膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標

記之含量，其中生物標記含量減少或改變表示AS中結構損壞之發展速率的降低或改變。

在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為尿II型膠原蛋白C-端肽。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記為血清基質金屬蛋白酶3(MMP3)。

在一實施例中，該治療性治療為投與阿達木單抗。

本發明亦包括判定患有AS患者中結構損壞的方法，該方法包含測定患者中膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的基線含量以獲得該患者之基線生物標記含量；一段時間後測定該患者中膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之含量以獲得該患者之基線後生物標記含量；比較該患者之基線生物標記含量與基線後生物標記含量；及評估患者之基線後生物標記含量是否低於患者之基線生物標記含量，其中較低基線後生物標記含量表示結構損壞減少。

本發明進一步包括用於調節患有AS患者中之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的方法，該方法包含將阿達木單抗投與該患者。

在一實施例中，該TNF $\alpha$ 抑制劑係選自由TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分、TNF融合蛋白或重組TNF結合蛋白組成之群。

在一實施例中，該TNF融合蛋白為依那西普。

在一實施例中，該TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分係選自由嵌合抗體、人源化抗體、人類抗體及多價抗體組成之群。

在一實施例中，該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分係選自由英利昔單抗、高力木單抗(golimumab)及阿達木單抗組成之群。

在一實施例中，該人類抗體或其抗原結合部分以均由表面

電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-8}$  M或小於 $1 \times 10^{-8}$  M之 $K_d$ 及 $1 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>或小於 $1 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離，且在標準活體外L929檢定中以 $1 \times 10^{-7}$  M或小於 $1 \times 10^{-7}$  M之IC<sub>50</sub>中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性。

在一實施例中，該人類抗體或其抗原結合部分具有以下特性：

a)以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>或小於 $1 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離；

b)具有輕鏈CDR3域，該域包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列，或在位置1、4、5、7或8藉由單丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9藉由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：3修飾之胺基酸序列；

c)具有重鏈CDR3域，該域包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列，或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11藉由單丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12藉由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：4修飾之胺基酸序列。

在一實施例中，該人類抗體或其抗原結合部分包含包括SEQ ID NO：1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)及包括SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)。

在一實施例中，本發明進一步包含將獲自患者之滑膜炎生物標記的預定、治療後含量與與AS關聯之滑膜炎生物標記的已知標準含量比較；及評估治療後滑膜炎生物標記含量是否低於已知標準滑膜炎生物標記含量，其中相對於已知標準滑膜炎生物標記含量治療後滑膜炎生物標記含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可

有效治療患者中之AS。

在一實施例中，該滑膜炎生物標記為MMP-3。

本發明亦描述用於執行上述方法之套組，其中該套組包含特異性識別CTX-II之可偵測劑；使用說明書及視情況之用於自患者分離樣品之試劑。

在一實施例中，該套組進一步包含特異性識別MMP-3之可偵測劑。

### 【圖式簡單說明】

圖1展示實例1>中所述研究之研究設計。

圖2展示一圖表，該圖表表示在第12週及24週與安慰劑相比，阿達木單抗患者經歷尿CTX-II含量顯著降低。

圖3展示一圖表，該圖表表示在第12週及24週與安慰劑患者相比，阿達木單抗患者經歷統計學上明顯的MMP3含量降低。

圖4展示一圖表，該圖表表示在第12週及24週與安慰劑患者相比，阿達木單抗患者中之CRP含量顯著降低。

### 【實施方式】

#### I. 定義

為使本發明更易於瞭解，首先定義某些術語。

如本文中所使用之術語"生物標記"一般係指一種分子，亦即基因(或編碼該基因之核酸)、蛋白質、醣結構或糖脂，其在源自哺乳動物組織或細胞之樣品中或樣品上之表現可由此項技術中之標準方法(以及本文中所揭示之彼等方法)偵測且可預測或指示其所來源之受檢者的病狀。當生物標記為蛋白質時，表現之調節或改變涵蓋經由不同轉譯後修飾來調節。生物標記可用於根據該生物標記之含量鑑別疾病活性，包括病狀改良及病

狀惡化。因此，在一實施例中，適用於本發明之生物標記為任何其表現可在患有病狀(例如脊柱關節病)之患者中加以調節(上調或下調)(當與正常對照(亦即未感染受檢者)相比時)的分子。在一實施例中，可將本發明之生物標記中之一、兩、三及三個以上的選定組用作判定患者對抗TNF治療之反應的快速診斷或預測之終點。

術語"膠原蛋白降解生物標記"係指與膠原蛋白破壞關聯之分子，亦即基因(或編碼該基因之核酸)、蛋白質、醣結構或糖脂。膠原蛋白降解生物標記係用於鑑別樣品或組織所來源之受檢者中之疾病活性，亦即膠原蛋白破壞。在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為膠原蛋白之片段，例如II型膠原蛋白之片段。在一實施例中，該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。

術語"滑膜炎生物標記"係指與滑膜炎或滑膜之炎症關聯的分子，亦即基因(或編碼該基因之核酸)、蛋白質、醣結構或糖脂。滑膜炎生物標記可用於表示患者之滑液或滑液膠原蛋白之轉換、增殖、降解、發炎、破壞、分解、病理再成型或退化。在一實施例中，滑膜炎生物標記為與細胞外基質(ECM)降解關聯的肽鏈內切酶，例如基質金屬蛋白酶。在一實施例中，用於本發明之滑膜炎生物標記為MMP-3。

術語"已知標準含量"或"對照含量"係指生物標記之公認含量或預定含量，該含量係用於與源自患者之樣品之生物標記含量進行比較。在一實施例中，膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之已知標準含量係基於受檢者或患有AS之受檢者，且因此可表示病態。在另一實施例中，生物標記之已知標準含量表示不患有AS之受檢者的未感染(亦即非疾病)狀態。

當與特定生物標記之已知標準含量比較時，與已知標準含量之偏差一般表示病態改善或惡化。或者，當與特定生物標記之已知標準含量比較時，與已知標準含量相等一般表示疾病活性之確定、非病態之確定，或若在疾病之治療性治療後獲得患者之生物標記含量，則表示改善患者病態之治療失敗。

如本文中所使用，術語"表現"，當結合偵測本發明之生物標記之表現使用時，可係指偵測編碼生物標記蛋白之基因的轉錄，偵測生物標記蛋白的轉譯，及/或偵測更大蛋白之新陳代謝所產生的生物標記蛋白，例如產生CTX-II片段之II型膠原蛋白降解。偵測生物標記之表現係指主動測定生物標記是否表現之行爲。量化表現係指測定給定生物標記之含量(例如，ng/ml)之行爲。偵測及/或量化表現可包括測定生物標記表現與已知標準含量相比是否上調，與已知標準含量相比是否下調，或與已知標準含量相比是否大體不變。因此，量化及/或偵測表現之步驟無需實際上上調或下調生物標記之表現，而寧可亦可包括偵測生物標記之無表現或偵測生物標記之表現未改變或並無不同(亦即偵測生物標記之未顯著表現，或與對照相比，生物標記之表現無顯著變化)。

如本文中所使用之術語"含量"或"量"係指生物標記之可計量之量。該量可爲(a)絕對量，如以分子數、莫耳數、重量/單位體積或細胞數所計量，或(b)相對量，例如由密度計分析法所量測。在一較佳實施例中，測定生物標記之RNA及/或蛋白的含量。

如本文中所使用之術語"受檢者"或"患者"係指人類或非人類動物。

如本文中所使用之術語"樣品"係指獲自受檢者之類似細胞



或組織之集合。組織或細胞樣品之來源可為來源於新鮮、經冷凍及/或經保藏之器官或組織樣品或生物檢體或吸出物的固體組織；血液或任何血液成份；或體液，諸如血液、血清、血漿、尿、唾液、汗或滑膜液。在一實施例中，滑膜炎生物標記係獲自血清樣品。在一實施例中，軟骨退化生物標記係獲自尿樣品。

如本文中所使用之術語"人類TNF $\alpha$ "(本文中縮寫為hTNF $\alpha$ ，或簡寫為hTNF)意欲指作為17 kD分泌形式及26 kD膜關聯形式存在的人類細胞激素，其生物活性形式包含非共價結合之17 kD分子之三聚體。hTNF $\alpha$ 之結構另外描述於例如Pennica, D., 等人(1984) *Nature* 312:724-729；Davis, J.M., 等人(1987) *Biochemistry* 26:1322-1326；及Jones, E.Y., 等人(1989) *Nature* 338:225-228中。術語人類TNF $\alpha$ 意欲包括重組人類TNF $\alpha$ (rhTNF $\alpha$ )，其可藉由標準重組表現方法製備或市購(R&D Systems，目錄號210-TA，Minneapolis，MN)。TNF $\alpha$ 亦稱為TNF。

術語"TNF $\alpha$ 抑制劑"包括干擾TNF $\alpha$ 活性之藥劑。該術語亦包括本文中所述抗TNF $\alpha$ 人類抗體及抗體部分之每一者，以及美國專利第6,090,382號、第6,258,562號、第6,509,015號及美國專利申請案第09/801185號及第10/302356號中所述之彼等藥劑。在一實施例中，用於本發明中之TNF $\alpha$ 抑制劑為抗TNF $\alpha$ 抗體或其片段，包括英利昔單抗(Remicade<sup>®</sup>，Johnson及Johnson；描述於美國專利第5,656,272號中，該專利以引用方式併入本文中)、CDP571(人源化單株抗TNF- $\alpha$  IgG4抗體)、CDP 870(人源化單株抗TNF- $\alpha$ 抗體片段)、抗TNF dAb(Peptech)、CNTO 148(高麗木單抗(golimumab)；Medarex及Centocor，參見WO 02/12502)及阿達

木單抗(Humira® Abbott Laboratories, 人類抗TNF mAb, 於US 6,090,382中描述為D2E7)。可用於本發明中之其他TNF抗體描述於美國專利第6,593,458號、第6,498,237號、第6,451,983號及第6,448,380號,各專利以引用方式併入本文中。在另一實施例中,該TNF $\alpha$ 抑制劑為TNF融合蛋白,例如依那西普(Enbrel®, Amgen; 描述於WO 91/03553及WO 09/406476中,該等專利以引用方式併入本文中)。在另一實施例中,該TNF $\alpha$ 抑制劑為重組TNF結合蛋白(r-TBP-I)(Serono)。

如本文中所使用之術語"抗體"意欲指包含由二硫鍵互相連接之四條多肽鏈(兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L))的免疫球蛋白分子。每條重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)與重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域CH1、CH2及CH3。每條輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)與輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域CL。VH及VL區可進一步細分為分散於更保守之區(稱為框架區(FR))中的高變區(稱為互補判定區(CDR))。每個VH及VL包含三個CDR及四個FR,且胺基末端至羧基末端按以下順序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本發明之抗體更詳細描述於美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015號,各專利以引用方式全文併入本文中。

如本文中所使用之術語抗體之"抗原結合部分"(或僅"抗體部分")係指保留特異性結合至抗原之能力的抗體(例如hTNF $\alpha$ )之一或多個片段。已經證明,抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。涵蓋於術語抗體之"抗原結合部分"中之結合片段的實例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段;(ii)F(ab')<sub>2</sub>片段,包含兩個在鉸鏈區由二硫鍵所連接之Fab

片段之二價片段；(iii)Fd片段，其由VH及CH1域組成；(iv)Fv片段，其由抗體之單臂之VL與VH域組成；(v)dAb片段(Ward等人，(1989) *Nature* 341:544-546)，其由VH域組成；及(vi)經分離的互補判定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域VL及VH由單獨基因編碼，但其可藉由合成連接子使用重組方法聯接，該合成連接子能使其成爲其中VL與VH區配對以形成單價分子之單蛋白鏈(稱爲單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird等人(1988)*Science* 242:423-426；及Huston等人(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之"抗原結合部分"之範圍內。亦涵蓋其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體。雙功能抗體爲二價雙特異性抗體，其中VH與VL域表現於單多肽鏈上，然而使用太短而不允許在同一鏈上之兩個域之間配對之連接子，從而迫使該等域與另一條鏈之互補域配對且形成兩個抗原結合位點(參見例如Holliger等人，(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak等人，(1994) *Structure* 2:1121-1123)。本發明之抗體部分更詳細描述於美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015號，各專利以引用方式全文併入本文中。

結合片段係藉由重組DNA技術或藉由酶促裂解或化學裂解完整免疫球蛋白產生。結合片段包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、單鏈及單鏈抗體。應瞭解，除"雙特異性"或"雙功能"免疫球蛋白或抗體外，免疫球蛋白或抗體之結合位點相同。"雙特異性"或"雙功能"抗體爲具有兩條不同重鏈/輕鏈對及兩個不同結合位點之人造雜交抗體。雙特異性抗體可由多種方法(包括雜交瘤融合或Fab'片段連接)產生。參見，例如Songsivilai及Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990)；Kostelny等

人，J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

如本文中所使用之"保守胺基酸取代"為其中一種胺基酸殘基置換為另一種具有類似側鏈之胺基酸殘基之取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已於此項技術中定義，其包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 $\beta$ -支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。

"嵌合抗體"係指該抗體中重鏈及輕鏈之胺基酸序列中之每一者之一部分與源自特定物種或屬於特定種類的抗體中的相應序列同源，而該等鏈之剩餘片段與來源於另一物種的相應序列同源之抗體。在一實施例中，本發明描述一種嵌合抗體或抗原結合片段，其中輕鏈與重鏈之每一者之可變區與源自一哺乳動物物種之抗體的可變區類似，而恆定部分與源自另一物種之抗體中的序列同源。在一本發明之較佳實施例中，嵌合抗體係藉由將小鼠抗體之CDR移植於人類抗體之框架區上而製備。

"人源化抗體"係指包含至少一條鏈的抗體，該至少一條鏈包含大體上來源於人類抗體鏈(稱為受體免疫球蛋白或抗體)之可變區框架殘基及至少一個大體上來源於非人類抗體(例如小鼠)之互補判定區(CDR)。除移植CDR之外，人源化抗體通常經歷進一步改造以改良親和性及/或免疫原性。

術語"多價抗體"係指包含一個以上抗原識別位點之抗體。舉例而言，"二價"抗體具有兩個抗原識別位點，而"四價"抗體具有四個抗原識別位點。術語"單特異性"、"雙特異性"、"三

特異性"、"四特異性"等係指存在於多價抗體中之不同抗原識別位點特異性的數目(與抗原識別位點數目相反)。舉例而言，"單特異性"抗體之抗原識別位點均結合相同抗原決定基。"雙特異性"或"雙重特異性"抗體具有至少一個結合第一抗原決定基的抗原識別位點及至少一個結合不同於第一抗原決定基之第二抗原決定基的抗原識別位點。"多價單特異性"抗體具有多個均結合相同抗原決定基之抗原識別位點。"多價雙特異性"抗體具有多個抗原識別位點，其中一些結合第一抗原決定基且一些結合不同於第一抗原決定基之第二抗原決定基。

如本文中所使用之術語"人類抗體"意欲包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區與恆定區的抗體。本發明之人類抗體可包括例如在CDR及尤其CDR3中不由人類生殖系免疫球蛋白序列所編碼的胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機誘變或位點特異性誘變或藉由活體內體細胞突變所引入之突變)。然而，如本文中所使用之術語"人類抗體"不欲包括其中來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植在人類框架序列上之抗體。

如本文中所使用之術語"重組人類抗體"意欲包括所有由重組方式製備、表現、產生或分離之人類抗體，諸如使用轉染於宿主細胞中之重組表現載體所表現之抗體(下文進一步描述)、自重組、組合人類抗體文庫中所分離之抗體(下文進一步描述)、自轉有人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠)所分離之抗體(參見例如Taylor等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287)或由任何其他方式(包括將人類免疫球蛋白基因序列拼接至其他DNA序列)所製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，

在某些實施例中，使該等重組人類抗體經受活體外誘變(或者當使用人類Ig序列之動物轉基因時，經受活體內體細胞誘變)，且因此該等重組抗體之VH區及VL區的胺基酸序列當來源且關聯於人類生殖系VH及VL序列時為活體內天然不存在於人類抗體生殖系目錄內之序列。

該等嵌合、人源化、人類及雙重特異性抗體可由此項技術中已知之重組DNA技術、例如使用以下專利文獻中所述之方法製備：PCT國際申請案第PCT/US86/02269號；歐洲專利申請案第184,187號；歐洲專利申請案第171,496號；歐洲專利申請案第173,494號；PCT國際公開案第WO 86/01533號；美國專利第4,816,567號；歐洲專利申請案第125,023號；Better等人，(1988) *Science* 240:1041-1043；Liu等人(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443；Liu等人，(1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526；Sun等人，(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218；Nishimura等人，(1987) *Cancer Res.* 47:999-1005；Wood等人，(1985) *Nature* 314:446-449；Shaw等人，(1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559；Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207；Oi等人，(1986) *BioTechniques* 4:214；美國專利第5,225,539號；Jones等人，(1986) *Nature* 321:552-525；Verhoeyan等人，(1988) *Science* 239:1534；及 Beidler 等人，(1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060, Queen 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)，US 5,530,101，US 5,585,089，US 5,693,761，US 5,693,762；Selick 等人，WO 90/07861；及 Winter，US 5,225,539。

如本文中所使用之"分離抗體"意欲指大體上不含其他具有不同抗原特異性之抗體的抗體(例如特異性結合hTNF $\alpha$ 之分離抗

體大體上不含特異性結合除hTNF $\alpha$ 外之抗原的抗體)。然而，特異性結合hTNF $\alpha$ 之分離抗體與諸如來源於其他物種之TNF $\alpha$ 分子之其他抗原具有交叉反應性(下文進一步詳述)。此外，分離抗體可大體上不含其他細胞物質及/或化學物質。

如本文中所使用之"中和抗體"(或"中和hTNF $\alpha$ 活性之抗體")意欲指其與hTNF $\alpha$ 之結合導致抑制hTNF $\alpha$ 之生物活性的抗體。該對hTNF $\alpha$ 生物活性之抑制可藉由量測hTNF $\alpha$ 生物活性之一或多種指標來評估，諸如hTNF $\alpha$ 誘發之細胞毒性(活體外或活體內)、hTNF $\alpha$ 誘發之細胞活化及hTNF $\alpha$ 與hTNF $\alpha$ 受體結合。hTNF $\alpha$ 生物活性之該等指標可由此項技術中已知之若干種標準活體外或活體內檢定中之一或多種來評估(參見美國專利第6,090,382號)。抗體中和hTNF $\alpha$ 活性之能力較佳藉由抑制L929細胞之hTNF $\alpha$ 誘發細胞毒性來評估。作為hTNF $\alpha$ 活性之另一或替代參數，當量測hTNF $\alpha$ 誘發之細胞活化時，可評估抗體抑制hTNF $\alpha$ 誘發之ELAM-1在HUVEC上表現之能力。

如本文中所使用之術語"表面電漿共振"係指一種光學現象，其允許藉由偵測生物感應器矩陣內蛋白質濃度之變化分析即時生物特異性相互作用，例如使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden及Piscataway, NJ)。其他描述請參見美國專利第6,258,562號之實例1及Jönsson等人，(1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19；Jönsson等人(1991) *Biotechniques* 11:620-627；Johnsson等人，(1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125；及Johnson等人，(1991) *Anal. Biochem.* 198:268。

如本文中所使用之術語" $K_{off}$ "意欲指抗體自抗體/抗原複合物解離之解離速率常數。

如本文中所使用之術語" $K_d$ "意欲指特定抗體-抗原相互作用

之解離常數。

如本文中所使用之術語"IC<sub>50</sub>"意欲指抑制所關注之生物終點(例如中和細胞毒性活性)所需之抑制劑濃度。

如本文中所使用之術語"核酸分子"意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單股或雙股，但較佳為雙股DNA。

如本文提及編碼結合hTNF $\alpha$ 之抗體或抗體部分(例如VH、VL、CDR3)之核酸時所使用的術語"分離之核酸分子"意欲指一種核酸分子，其中編碼該抗體或抗體部分之核苷酸序列不含其他編碼結合除hTNF $\alpha$ 以外之抗原之抗體或抗體部分的核苷酸序列，其他序列可天然側接於人類基因組DNA中之核酸。因而，例如，編碼抗hTNF $\alpha$ 抗體之VH區的本發明之分離核酸不包含其他編碼結合除hTNF $\alpha$ 外之抗原之其他VH區的序列。

如本文中所使用之術語"載體"意欲指能夠輸送已與其連接之另一核酸的核酸分子。一類型的載體為"質體"，其係指可其他DNA片段可連接於其中之環狀雙股DNA環。另一類型之載體為病毒載體，其中其他DNA片段可連接於該病毒基因組中。某些載體能夠在其所引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中之後整合於宿主細胞之基因組中，且從而與宿主基因組一同被複製。此外，某些載體能夠指導其所操作性連接之基因的表現。該等載體在本文中稱為"重組表現載體"(或僅"表現載體")。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體通常為質體形式。由於質體為載體之最常用形式，因此在本說明書中，"質體"及"載體"可互換使用。然而，本發明意欲包括提供相同功能之該等其他形式之表現載體，諸如病毒載體(例如複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及腺相



關病毒)。

如本文中所使用之術語"重組宿主細胞"(或僅"宿主細胞")意欲指其中已引入重組表現載體之細胞。應瞭解，該等術語意欲不僅係指特定受檢者細胞而且亦係指該細胞之後代。由於後代中因突變或環境影響而可存在某些修飾，因此該後代事實上會與親本細胞不同，然而仍包括於如本文中所使用之術語"宿主細胞"範疇內。

如本文中所使用之術語"劑量"係指投予至受檢者之TNF $\alpha$ 抑制劑的量。

術語"多元可變劑量"包括為治療性治療而投與受檢者之TNF $\alpha$ 抑制劑之不同劑量。"多元可變劑量方案"或"多元可變劑量療法"描述一種治療時程，該治療時程係基於在整個治療過程中在不同時點投與不同量之TNF $\alpha$ 抑制劑。多元可變劑量方案描述於PCT申請案第PCT/US05/12007號中。

如本文中所使用之術語"給藥"係指投與一種物質(例如抗TNF $\alpha$ 抗體)以實現一種治療目標(例如治療類風濕性關節炎)。

如本文中所使用之術語"雙週給藥方案"、"雙週給藥"及"雙週投藥"係指向受檢者投與物質(例如抗TNF $\alpha$ 抗體)以達成治療目標之時程。雙週給藥方案並不意欲包括每週給藥方案。較佳該物質係每9-19天投與；更佳地，每11-17天投與；甚至更佳地，每13-15天投與，且最佳地，每14天投與。

如短語"與第二藥劑組合之第一藥劑"中之術語"組合"包括共同投與例如可溶解於或混合於同一醫藥學上可接受之載劑中之第一藥劑與第二藥劑；或先投與第一藥劑，繼而投與第二藥劑，或先投與第二藥劑，繼而投與第一藥劑。因此本發明包括組合治療性治療方法及組合醫藥組合物。

如短語"並行治療性治療"中之"並行"包括在第二藥劑存在下投與一藥劑。並行治療性治療方法包括其中將第一、第二、第三或額外藥劑共同投與之方法。並行治療性治療方法亦包括其中在第二或額外藥劑存在下投與第一或額外藥劑之方法，其中第二或額外藥劑例如可預先投與。並行治療性治療方法可由不同操作者逐步執行。舉例而言，一操作者可向受檢者投與第一藥劑且第二操作者可向該受檢者投與第二藥劑，且該等投藥步驟可同時執行或幾乎同時執行或隔期執行，只要第一藥劑(及額外藥劑)係在第二藥劑(及額外藥劑)存在下投與。操作者及受檢者可為同一實體(例如人類)。

如本文中所使用之術語"組合療法"係指投與兩種或兩種以上治療物質，例如抗TNF $\alpha$ 抗體與另一種藥物。其他藥物可與抗TNF $\alpha$ 抗體並行投與，可在投與抗TNF $\alpha$ 抗體之前或之後投與。

如本文中所使用之術語"套組"係指包含與本發明之TNF $\alpha$ 抗體一起投與以治療TNF $\alpha$ 相關病症之組份之包裝產品。該套組較佳包含容納該套組之組份的盒或容器。該盒或容器黏貼有標籤或食品與藥物管理局(Food and Drug Administration)批准之方案。該盒或容器容納較佳包含於塑料、聚乙烯、聚丙烯、乙烯或丙烯容器內之本發明之組份。該等容器可為帶蓋之管或瓶。該套組亦可包括投與本發明之TNF $\alpha$ 抗體之說明書。在一實施例中，本發明之套組包括包含人類抗體D2E7之調配物，如PCT/IB03/04502及美國申請案第10/222140號中所述。

本發明之各種態樣在本文中進一步詳細描述。

## II. 軟骨退化及脊椎炎生物標記

對在經受TNF抑制劑療法之AS患者中建立能夠判定改善、尤其早期結構改善之有意義的關節黏連脊椎炎(AS)評估手段存

在需要。目前，紅血球沉降率(ESR)及C-反應性蛋白(CRP)含量為評估AS活性之最廣泛使用之方法，然而僅該等標記並不足以評估AS疾病活性(Ruof及Stucki(1999)J Rheumatol 26:966)。本發明提供已經鑑別適用於評估抗TNF療法預防患者中與AS關聯之結構損壞之能力的生物標記。此外，本發明提供判定患者對與AS關聯之關節結構破壞之改善之反應的方法。本文所述之方法鑑別患者之結構損壞發展之變化，該變化使用諸如射線照相術之更傳統方法並不易於明顯。本發明之方法具有優勢，因為其可為醫師提供判定抗TNF治療在患者中之功效而無需等待臨床結果(其會佔用較長時間)之方法。

通常，本發明包括將獲自患有AS患者或懷疑患有AS之患者之生物標記含量與與疾病活性關聯之已知標準含量比較，以判定患者生物標記含量相對於對照含量是否增加、減少或不變。在判定TNF抑制劑用於治療患者中之AS之功效中，尤其關於改善結構損壞，生物標記含量可預先確定，或可包括自該患者獲取樣品且接著在本發明之比較評估中使用自該樣品所測定的生物標記含量。

本發明可鑑別某些與結構破壞(包括軟骨退化及滑膜炎)關聯之生物標記，該等生物標記可用於判定所選抗TNF療法是否適用於治療或包括不同抗TNF療法在內之不同療法是否應予考慮。該等預測方式對受檢者之總體健康有利，因為可產生更快的反應以判定適當的療法。本文中所述之方法亦可藉由更快去除無效療法而降低治療過程之總成本。

本發明提供判定TNF抑制劑用於治療脊柱關節病(例如關節黏連脊椎炎)之功效的方法，該方法包含量測軟骨破壞及滑膜炎之生物標記。根據TNF抑制劑減少已知可反映與受檢者中軟骨

退化及/或滑膜炎關聯之疾病活性之生物標記的能力來判定功效。

在一個實施例中，本發明包括判定TNF $\alpha$ 抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於治療關節黏連脊椎炎(AS)之功效的方法，其中將獲自以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患有AS患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的預定含量與與該病態關聯之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量比較。比較兩種含量後，即可判定患者治療後之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量是否低於已知標準含量，其中相對於已知標準含量獲自以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之該患者的膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑用於治療AS的功效。

在另一實施例中，本發明提供判定TNF抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於關節黏連脊椎炎(AS)之功效的方法，該方法包含將獲自患有AS患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之治療前含量與獲自該患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之治療後含量比較，其中較低治療後生物標記含量表示TNF抑制劑用於治療患者中AS之功效。

由於可降低與軟骨退化及/或滑膜炎關聯之生物標記的含量，TNF抑制劑可用來減少或預防與AS關聯之結構損壞。在一個態樣中，本發明提供監測TNF抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於降低患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞發展之功效的方法，該方法包含測定患者中膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之含量，且將該膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量與與AS關聯之膠原蛋白降解

生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量比較。在此情況下，獲自患者之生物標記含量相對於已知標準含量降低表示TNF抑制劑可有效降低患者中與AS關聯之結構損壞之發展速率。

在另一態樣中，本發明提供預測TNF抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於治療患者中AS之功效的方法，該方法包含將獲自以人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分治療後之患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的預定含量與患有AS患者之膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記的已知標準含量比較。根據該兩種生物標記含量，對患者之治療後膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量是否低於該膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記之已知標準含量加以評估。在此情況下，相對於已知標準含量膠原蛋白降解生物標記及/或滑膜炎生物標記含量較低表示預計人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分可有效治療患者中之AS。

在以上判定TNF抑制劑有效減少與軟骨破壞及/或滑膜炎關聯之生物標記而其又反映結構破壞(亦即關節破壞)之情形中，可考慮延續TNF抑制劑治療。在一實施例中，吾人可考慮對該患者實施相同給藥方案。或者，吾人可考慮減少經證明可有效治療患者中之AS之TNF抑制劑之劑量。

此外，可對獲自仍未接受TNF抑制劑治療之患者的樣品執行膠原蛋白降解及/或滑膜炎生物標記分析。可執行膠原蛋白降解及滑膜炎生物標記分析判定患者是否會對抗TNF $\alpha$ 抗體(例如阿達木單抗)治療作出反應。相對於可表徵為指示AS之含量之已知標準含量，獲自患者樣品之膠原蛋白降解及/或滑膜炎生物標記之可比含量表示患者患有AS，且因此適合以TNF抑制劑治

療。因此，選擇該患者以抗TNF $\alpha$ 抗體(例如阿達木單抗)治療，以預防隨該疾病之發展可能會出現之結構損壞。

在一實施例中，該對照含量係基於患者自身之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記基線含量，其中該基線含量在以TNF抑制劑治療之前測定。在該實例中，將治療後所測定之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量與患者之基線含量比較。其後，根據治療後患者軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量是否降低來作出TNF抑制劑是否有效之判定。在另一實施例中，用作對照之基線含量係基於以TNF抑制劑治療期間患者在給定時點自身之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量，其中將治療期間該給定時點之基線含量與在其後患者仍保持治療之給定時間時的生物標記含量比較。

在一實施例中，已知標準含量係基於與該病態關聯(亦即與患有AS患者關聯)之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記之公認含量。軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量之已知標準含量可基於單個AS患者或者基於獲自AS患者群之平均值。舉例而言，在一實施例中，AS患者之血清MMP-3的已知標準含量係介於約10至160 ng/ml之間、約20至140 ng/ml之間、約30至120 ng/ml之間、約40至100 ng/ml之間、約50至80 ng/ml之間、約25至57 ng/ml之間或約60至70 ng/ml之間。在另一實施例中，AS患者之尿CTX-II的已知標準含量係介於約300至500 ng/ml之間、約315至395 ng/ml之間、約320至390 ng/ml之間、約325至385 ng/ml之間、約330至380 ng/ml之間、約325至385 ng/ml之間、約324至388 ng/ml之間、約330至380 ng/ml之間、約335至375 ng/ml之間、約340至370 ng/ml之間、約345至365 ng/ml之間或約350至360 ng/ml之間。

或者，在另一實施例中，已知標準含量係基於獲自健康未感染受檢者之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量。軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量之已知標準含量可基於單個未感染健康受檢者，或者基於未感染健康受檢者群之平均值。尿CTX-II之正常值(亦即獲自健康之非AS受檢者的值)的實例描述於Haima (2005) Osteo Medical Group Clinical and Technical Monograph及Mouritzen等人，(2003) Annals of the Rheumatic Diseases 62:332中。舉例而言，在一實施例中，未感染健康受檢者中之血清MMP-3的已知標準含量係介於約13與15 ng/ml之間(參見Chen等人，(2006) Rheumatology 45:414)。

上述生物標記含量中間之範圍，例如尿CTX-II之約323至約329 mg/ml，亦意欲為本發明之部分。此外，意欲包括使用上述值中任一者之組合作為上限與下限之數值範圍。此外，上述上限並非意謂對AS患者中MMP-3及CTX-II之增加含量加以限制。

若軟骨退化及/或滑膜炎生物標記之含量相對於對照含量(亦即患者自身之治療前含量或已知標準含量)較高/增加或者較低/減少，則可認為該含量不同於該對照含量。在一實施例中，若軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量比對照含量高/增加的量大於用於評估該含量之檢定的標準誤差，則認為獲自AS患者之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記的含量相對於對照含量較高/增加。在一實施例中，若軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量比對照含量低/減少的量大於用於評估該含量之檢定的標準誤差，則認為獲自AS患者之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記的含量相對於對照含量較低/或減少。在另一實施例中，若對照含量與獲自患者樣品之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記含量的差高於或低於對照及樣品量測之標準誤差至少約兩倍、三倍、四倍或五倍，則可認為

獲自患病患者的軟骨退化含量及/或滑膜炎生物標記含量比對照含量高/增加或低/減少。

在一實施例中，當患有AS之受檢者之CTX-II含量相對於基線含量或已知標準含量降低至少介於約5至50%之間、約5至45%之間、約5至40%之間、約5至35%之間、約5至30%之間、約5至25%之間、約5至20%之間、約5至15%之間、約5至10%之間、約6至9%之間、約7至8%之間或約9%時，展示TNF抑制劑之功效。在一實施例中，當患有AS之受檢者之MMP-3含量相對於基線含量或已知標準含量降低至少約5至50%、約5至45%、約5至40%、約5至35%、約5至30%、約5至25%、約5至20%、約5至15%、約5至13%、約6至12%、約7至11%或約8%時，展示TNF抑制劑之功效。在另一實施例中，當MMP-3含量相對於患有AS之受檢者的基線含量或已知標準含量降低約12%時，展示TNF抑制劑之功效。

上述生物標記含量中間之範圍，例如約8至約10%，亦意欲為本發明之部分。此外，意欲包括使用上述值之任一者之組合作為上限及/或下限的數值範圍。

本發明提供單獨或與滑膜炎生物標記組合使用軟骨退化生物標記之方法。

### 軟骨退化生物標記

關節軟骨主要包括與蛋白聚糖聚集體複合之II型膠原蛋白基原纖維網(參見Poole AR, 2003. *Rheum Dis Clin North Am* 29:803-818及Eyre (1991) *Semin Arthritis Rheum.* 21(3增刊2):2-11)。在關節疾病中，II型膠原蛋白由膠原酶逐漸裂解。II型膠原蛋白經降解以致降解過程之產物根據特定抗原決定基在膠原蛋白分子內之定位分為三群(回顧請參見Birmingham等人，



(2006) *Biomarker Insights* 2:61，該文獻以引用方式併入本文中)。包括新抗原決定基及端肽抗原決定基之不同類型抗原決定基可用作與膠原蛋白相關之降解事件之指示劑。

成熟II型膠原蛋白由兩端具有短端肽之三股螺旋結構組成。端肽與其他膠原蛋白股共價交聯，以便將個別膠原蛋白分子連接成剛性原纖維網。當軟骨細胞外基質降解時，產生成熟膠原蛋白片段。該等片段可見於血清與尿中，且可作為軟骨退化代謝之標記加以量測。端肽包括col2CTx及CTX-II(WO 91/08478；Christgau等人，(2001) *Bone* 29:209；Matyas等人(2004) *Arthritis Rheum* 50:543；及Eyre (1989)"Peptide fragments containing HP and LP cross-links, USP 5702909，各文獻以引用方式併入本文中)。

蛋白分解導致II型膠原蛋白抗原決定基流失至體液中，因此藉由檢查體液中之II型膠原蛋白抗原決定基，可測定膠原蛋白之降解量(參見Birmingham等人，(2006) *Biomarker Insights* 2:61及Christgau等人，(2001) *Bone* 29:209，各文獻以引用方式併入本文中)。自臨床觀點而言，監測及減緩或逆轉膠原蛋白降解過程之能力為重要的，因為認為成熟交聯型II型膠原蛋白纖維之大量降解在關節破壞中為決定性、甚至可能為不可逆之階段(Billinghurst等人，(1997))。

本文中所述之本發明使用軟骨退化生物標記判定TNF抑制劑用於治療AS之功效，該AS具有包括結構損壞(亦即關節損壞)之疾病成份。在一實施例中，幾乎完全位於軟骨內的CTX-II在本發明之方法及組合物中用作軟骨破環的生物標記。

## CTX-II

在一較佳實施例中，膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白

C-端肽(CTX-II)。CTX-II為膠原蛋白之片段，其來源於II型膠原蛋白C-末端。CTX-II與新抗原決定基Col2CTx相同，可見於經裂解之II型膠原蛋白之¼長度片段的C-末端。

CTX-II已知作為軟骨退化之生物標記。CTX-II首先與患有膝骨關節炎之患者的軟骨退化相關(Garnero等人(2001)Annals Rheum Dis 60:619)，其中隨後測定患有重度骨關節炎之患者之尿中CTX-II之增加(Jung等人，(2004) Pathobiol 71:70)。CTX-II亦經證明與關節破壞程度相關(Christgau等人，(2001) Bone 29:209；Garnero及Delmas (2003) Curr Op Rheumat 25:641)。

在一態樣中，本發明提供判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於治療患者中AS之功效的方法，該方法包含將獲自以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患者之CTX-II的預定含量與與AS關聯之CTX-II的已知標準含量比較。接著就CTX-II之兩種含量之間的關係作出評估，以判定患者治療後之CTX-II含量是否比CTX-II的已知標準含量低。CTX-II含量相對於表示AS病態之已知標準降低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效治療患者中之AS。在該實例中，已知標準含量表示獲自具有AS疾病活性之受檢者(已感染、未經治療之患者)的CTX-II含量。

在另一態樣中，本發明提供判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於減緩患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞之功效的方法，該方法包含將獲自以TNF $\alpha$ 抑制劑治療後之患有AS患者的CTX-II含量與與AS關聯之CTX-II的已知標準含量比較。接著就CTX-II之兩種含量作出評估，以判定患者治療後之CTX-II含量是否比CTX-II之已知標準含量低。若患者之CTX-II含量比CTX-II之已知標準含量低，則該結果表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效減緩患者中與AS關聯之結構損壞。

在一實施例中，本發明描述判定TNF $\alpha$ 抑制劑用於治療患者中之AS之功效的方法，該方法包含將獲自該患者之CTX-II的預定、治療後含量與獲自該患者之CTX-II的預定、治療前含量比較。接著就CTX-II的兩種含量作出評估，以判定治療後之CTX-II含量是否比治療前之CTX-II含量低，其中獲自患者之治療後CTX-II含量相對於治療前CTX-II含量較低表示TNF $\alpha$ 抑制劑可有效治療患者中之AS。

#### 滑膜炎生物標記

現已知滑膜炎(炎症)發生於炎性疾病(諸如骨關節炎)早期，且與該疾病之放射性療程相關。炎症(包括無症狀炎症)藉以加劇關節損壞之過程可能包括軟骨細胞功能改變、血管生成增強及/或骨骼轉換加速(Bonnet及Walsh DA. (2005) *Rheumatology* 44:7-16)。本文中所述之本發明使用滑液生物標記判定TNF抑制劑治療AS的功效。在一實施例中，將可能產生於發炎關節中之血清MMP-3(Kruithof等人，(2005) *Arthritis Rheum* 52:3898)用作滑膜炎生物標記以判定TNF抑制劑用於治療AS的功效。

#### MMP-3

軟骨基質分子之降解涉及鋅依賴型肽鏈內切酶，亦即基質金屬蛋白酶(MMP)。MMP，Zn<sup>2+</sup>依賴型肽鏈內切酶之家族，使諸如膠原蛋白及蛋白聚糖之細胞外基質(ECM)組份裂解。MMP藉由消化細胞外基質之組份來介導不同生理學過程。

MMP3為降解纖維結合蛋白、昆布胺酸、膠原蛋白III、IV、IX及X及軟骨蛋白聚糖之酶。目前存在至少20種類型之人類MMP，根據結構及特異性受質可將其分類為：膠原蛋白酶(MMP-1、MMP-8、MMP-13)、基質溶素、明膠酶(MMP-2、MMP-9)及質膜結合型金屬蛋白酶(參見，例如Nabeshima K等

人，2002 Pathol Int 52：255-64)。

在一較佳實施例中，用於本發明之滑膜炎生物標記為MMP-3。已經證明，MMP-3血清含量在特徵為關節滑膜炎之炎性風濕病中增加，該等炎性風濕病諸如RA、風濕性多肌痛、牛皮癬關節炎及急性結晶性關節炎。公認MMP-3血清含量可反映滑液炎症(參見Ribbens等人，(2002) Annals of the Rheumatic Diseases 61:161)。此外，上述研究利用相關基質金屬蛋白酶(MMP)，尤其MMP-3(基質溶素1)獲得AS患者中Bath關節黏連脊椎炎疾病活性指數(BASDAI)值(參見Yang, C.等人；(2004) Arthritis Rheum 51:691-9)。

MMP-3之胺基酸序列係已知的，且可見於例如GenBank寄存號第AAI07491號。MMP-3之核苷酸序列係已知的，且見於例如GenBank寄存號第NM002422號。

本發明進一步包括單獨或與彼此組合使用軟骨退化生物標記(例如CTX-II)與滑膜炎生物標記(例如MMP-3)以實現本發明之方法。此外，兩者之任一生物標記可與C-反應性蛋白組合使用以進一步判定TNF抑制劑用於治療AS的功效。

C-反應性蛋白(CRP)含量可與軟骨退化生物標記(例如CTX-II)及滑膜炎生物標記(例如MMP-3)組合使用作為AS疾病狀況及給定抗TNF療法之功效的指示劑。CRP屬於所謂之蛋白質穿透素家族，因為其具有由染色體1上之單基因所編碼之五個相同的次單元，該等次單元聯合形成穩定的圓盤樣五倍體結構。CRP只形成於肝內且在急性炎性刺激6小時內以增加量分泌。高含量之CRP提供正發生之炎症之敏感性指數，且因此為縝密之臨床評估提供有價值之輔證。

測定生物標記含量之檢定

樣品中軟骨退化及/或滑膜炎生物標記之含量可由多種方法分析。一旦自患者獲得樣品，即可使用此項技術中已知適於偵測及量化可用於本發明之方法中之軟骨退化或滑膜炎生物標記的任何方法(在核酸級，或較佳在蛋白質級)。該等方法在此項技術中熟知，且包括但不限於西方墨點法、北方墨點法、南方墨點法、免疫組織化學、ELISA(例如擴增ELISA，基於血液之定量檢定，例如血清ELISA，基於尿之定量檢定，例如在CTX-II之狀況中檢查蛋白質表現或降解程度)、免疫沉澱法、免疫螢光法、流式細胞術、免疫細胞化學、質譜分析法(例如MALDI-TOF及SELDI-TOF)、核酸雜交技術、核酸反轉錄法及核酸擴增法。

該等檢定之實例在下文更詳細描述。

#### 基於蛋白質之檢定

可使用基於蛋白質之檢定執行本發明之方法以測定給定生物標記之含量。基於蛋白質之檢定的實例包括免疫組織化學分析及/或西方墨點分析、基於血液之定量檢定，例如血清ELISA，及基於尿之定量檢定，例如尿ELISA。在一實施例中，執行免疫檢定以提供給定生物標記之量化評估。

在本發明之一實施例中，軟骨退化或滑膜炎生物標記之量係藉由偵測或量化相應所表現之多肽來測定。多肽可藉由熟習此項技術者熟知之諸多方法中之任一種偵測及量化。該等方法可包括生化分析法，諸如電泳、毛細管電泳、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(TLC)、超分散層析法及類似方法；或各種免疫方法，諸如流體或凝膠沉澱素反應、免疫擴散(單或雙)、免疫電泳、放射免疫檢定(RIA)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、螢光免疫檢定及西方墨點法。

使用熟習此項技術者熟知之技術可將蛋白質自患者樣品中分離。舉例而言，所用蛋白質分離方法可為諸如Harlow及Lane所述的彼等方法(Harlow及Lane, 1988, *Antibodies : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

使用抗本文中所述之生物標記之抗體可用於篩檢人類生物樣品(例如體液)中特異性生物標記抗原(較佳為膠原蛋白降解及/或滑膜炎生物標記)的存在。從而自患者取出之血清之活體外免疫血清學評估可非侵入性判定軟骨退化之發展或減緩以及滑膜炎之加劇或減輕。以說明之方式，自患者中採集諸如血清或尿之人類流體且在例如此項技術中已知之標準RIA或ELISA中使用抗生物標記抗體檢定樣品流體中作為釋放之抗原或結合於細胞膜上的特異性抗原決定基。該等方法中所使用的抗體較佳為單株抗體。

用於偵測軟骨退化或滑膜炎生物標記多肽的藥劑可為能夠結合軟骨退化或滑膜炎生物標記之蛋白質的抗體。抗體可為多株抗體，或更佳為單株抗體。可使用完整抗體或其片段(例如Fab或F(ab')<sub>2</sub>)。

在一實施例中，在免疫檢定(例如ELISA)中使用抗CTX-II(包括尿CTX-II)之抗體測定獲自患有AS患者之樣品中的CTX-II含量。在一實施例中，可量測獲自患者之尿或血清樣品中之CTX-II。在一實施例中，用於偵測及量化人類尿中CTX-II的抗體為單株抗體mAbF46(參見Christgau等人，(2001) *Bone* 29:209)及F4601(參見Oestergaard等人，(2006) *Osteoarthritis Cartilage*. 14(7):670)。

在一實施例中，在免疫檢定(例如ELISA)中使用抗MMP-

3(包括血清 MMP-3)之抗體測定獲自患有 AS 患者之樣品中的 MMP-3 含量。在一實施例中，可量測獲自該患者之血清樣品中的 MMP-3。在一實施例中，用於偵測及量化人類血清中 MMP-3 的抗體為單株抗體 mAb1B4(Murray GI 等人，Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. Gut 43:791-7 (1998))。

熟習此項技術者可易於調適已知蛋白質/抗體偵測方法以用於測定本發明標記(亦即 CTX-II 及/或 MMP-3)之量。

可使用競爭性結合檢定測定相當於膠原蛋白降解及/或滑膜炎生物標記之蛋白質的含量。競爭性結合檢定之一實例為酶聯免疫吸附夾心檢定(ELISA)。ELISA 可用於偵測樣品中膠原蛋白降解及/或滑膜炎生物標記的存在。ELISA 為敏感之免疫檢定，其使用與抗體或抗原連接之酶作為用於偵測特異性蛋白質(尤其抗原或抗體)的標記。在一實施例中，使用 ELISA 檢定測定軟骨退化及/或滑膜炎生物標記的含量。

在一實施例中，量測人類尿中 II 型膠原蛋白之 C-端肽片段進行定量評估軟骨退化之免疫檢定。Oestergaard 等人(2006) Osteoarthritis Cartilage. 14(7):670 及 Mouritzen 等人(2003) Annals of the Rheumatic Diseases 62:332 描述了檢定作為關節破壞之生物標記之 CTX-II 的方法，該等文獻以引用方式併入本文中。此外，用於測定 CTX-II 含量之檢定物可在市面上購得，例如 Urine Cartilaps<sup>®</sup>(Nordic Bioscience Diagnostics)。Urine Cartilaps<sup>®</sup> 已用於定量評估類風濕性關節炎及骨關節炎中之軟骨退化、監測對軟骨退化之治療效應及預測關節炎患者之疾病進程的臨床研究。

舉例而言，Urine Cartilaps<sup>®</sup> ELISA(Nordic Bioscience

Diagnostics)係基於單株抗體與結合於微量滴定盤塗有抗生蛋白鏈菌素之表面之尿中II型膠原蛋白片段或生物素標記合成肽的競爭性結合。首先，使生物素標記合成肽結合至微量滴定盤塗有抗生蛋白鏈菌素的孔表面。洗滌後，將標準、對照及尿樣品吸移入孔內，繼而添加單株抗體之溶液。將該等孔洗滌，且將過氧化酶接合之抗小鼠免疫球蛋白(兔)之溶液添加至該等孔中。繼第二洗滌步驟後，將發色受質添加至所有孔中，且用硫酸停止顯色反應，且量測吸光度。Christgau(2001 Bone 29:209，該文獻以引用方式併入本文中)描述了關於如何使用ELISA檢定CTX-II的其他實例。

在一實施例中，進行測定人類血清中滑膜炎生物標記MMP-3含量的免疫檢定。檢定作為滑膜炎生物標記之MMP-3的方法描述於。此外，可供測試MMP-3蛋白含量的商業套組包括人類基質金屬蛋白酶-3 Biotrak ELISA系統(Amersham)(亦參見Yang等人，(2004) Arthritis and Rheumatism 51:691)。描述如何檢定MMP-3蛋白的其他實例描述於Chen等人(2006) Rheumatology 45:414中。

在一實施例中，將該抗體以可偵測標記加以標記。就探針或抗體而言，術語"標記"意欲包括藉由將可偵測物質偶合(亦即實體連接)於探針或抗體來直接標記探針或抗體，以及由與經直接標記之另一試劑反應來間接標記探針或抗體。間接標記之實例包括使用螢光標記之二級抗體及末端標記生物素之DNA探針偵測初級抗體，以使得其可以螢光標記抗生蛋白鏈菌素偵測。

在一實施例中，該抗體為標記抗體，例如放射性標記抗體、發色團標記抗體、螢光發生團標記抗體或酶標記抗體。在另一實施例中，為與軟骨退化或滑膜炎生物標記蛋白質特異性



結合的抗體衍生物(例如與受質或與蛋白質-配位體對{例如生物素-抗生蛋白鏈菌素})中之蛋白質或配位體接合之抗體)或抗體片段(例如單鏈抗體、分離抗體高變域等)。

在一實施例中，可在諸如西方墨點法或免疫螢光技術之方法中使用抗體或抗體片段偵測所表現之蛋白質。在該等用途中，將抗體或蛋白質固定於固體支撐物上通常較佳。合適固相支撐物或載體包括能夠結合抗原或抗體之任何支撐物。熟知支撐物或載體包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、耐綸、澱粉酶、天然及改性纖維素、聚丙烯醯胺、輝長岩及磁鐵礦。

熟習此項技術者將瞭解其他很多適用於結合抗體或抗原之載體，且能夠調適該支撐物供本發明使用。舉例而言，自細胞所分離之蛋白質可於聚丙烯醯胺凝膠電泳上電泳且固定於諸如硝化纖維之固相支撐物上。接著將支撐物以適當緩衝劑洗滌，繼而以可偵測標記抗體處理。接著將固相支撐物以緩衝劑再次洗滌以移除未結合抗體。接著由習用方法偵測結合在固體支撐物上之標記的量。使用電泳技術偵測蛋白質的方法係為熟習此項技術者所熟知(通常參見R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. ; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology* 第182卷: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., N.Y.)。

使用抗體的其他標準方法可用於偵測及量化膠原蛋白降解及/或滑膜炎標記，該等標準方法包括但不限於放射免疫檢定("RIA")、受體檢定、酶免疫測定("EIA")、細胞化學生物鑑定、配位體檢定、免疫放射檢定、螢光免疫檢定及酶聯免疫吸附檢定("ELISA")。為便於偵測及其定量性質，另一方法包括其中存

在多種變化之夾心或雙抗體檢定，其所有意欲涵蓋於本發明中。熟習此項技術者熟知該等方法且應瞭解需要合理量的實驗以優化抗體與抗原之間的相互作用及利用抗體對抗原的偵測。該等及其他免疫檢定技術可見於 Principles And Practice Of Immunoassay，第二版，Price及Newman編，MacMillan (1997)及 Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow及Lane編，Cold Spring Harbor Laboratory，第9章(1988)，各文獻以引用方式全文併入本文中。

## RNA

在一實施例中，編碼該生物標記之mRNA的含量可使用熟習此項技術者已知的方法(例如北方墨點分析法)量測。生物標記之基因表現可在RNA級偵測。使用RNA提取技術(包括例如使用酸酚/胍異硫氰酸酯提取(RNAzol B; Biogenesis)、RNeasy RNA製備套組(Qiagen)或PAXgene PreAnalytix, Switzerland))可自細胞中提取RNA。利用核糖核酸雜交之典型檢定方式包括核連續檢定、RT-PCR、RNase保護檢定(Melton等人，Nuc. Acids Res. 12:7035)、北方墨點法及原位雜交法。如下所述，基因表現亦可由微陣列分析法偵測。

對於北方墨點法，首先在變性條件下，在瓊脂糖凝膠中經由電泳按大小將RNA樣品分離。接著將RNA轉移至膜，交聯且與標記探針雜交。可使用包括隨機引子、切口移位或PCR生成之DNA探針、活體外轉錄之RNA探針及寡核苷酸之非同位素或高比活性放射性標記探針。此外，可將僅部分同源之序列(例如獲自可含有外顯子之不同物種或基因組DNA片段之cDNA)用作探針。

核酸酶保護檢定(包括核糖核酸酶保護檢定與S1核酸酶檢

定)提供用於偵測及量化特異性 mRNA 之極為敏感之方法。NPA 之基礎為反義探針(放射性標記探針或非同位素探針)與 RNA 樣品之溶液雜交。雜交後，由核酸酶將單股、未雜交探針及 RNA 降解。在丙烯醯胺凝膠上將保留之保護片段分離。NPA 容許同時偵測若干種 RNA 物質。

原位雜交 (ISH) 為用於細胞或組織內特異性 mRNA 定位之有效及通用手段。探針雜交發生於細胞或組織內部。由於細胞結構在整個程序中得以維持，因此 ISH 提供了與組織樣品內 mRNA 之位置有關的資訊。

該程序首先將樣品於中性緩衝福馬林 (formalin) 中固定且將組織包埋於石蠟中。接著將樣品切成薄片且安裝於顯微鏡載玻片上。(或者，將組織切片冷凍且其後於聚甲醛中固定)。一系列洗滌以將該等切片脫蠟且復水後，進行蛋白酶 K 消化以增加探針可達性，且接著使標記探針與樣品切片雜交。以於載玻片上乾燥之液體膜使放射性標記探針可見，同時以比色或螢光試劑方便地偵測非同位素標記探針。該後一種偵測方法為螢光原位雜交 (FISH) 之基礎。

可使用的偵測方法包括放射性標記、酶標記、化學發光標記、螢光標記及其他適當標記。

通常，使用 RT-PCR 擴增靶 RNA。在該方法中，使用逆轉錄酶將 RNA 轉化為互補 DNA (cDNA)，接著將互補 DNA 擴增以利於偵測。相對定量 RT-PCR 包括同時擴增內部對照與所關注之基因。內部對照係用於正規化樣品。一旦正規化，即可在整個樣品中進行相對豐富之特異性 mRNA 之直接比較。常用內部對照包括例如 GAPDH、HPRT、肌動蛋白及親環蛋白。

多種 DNA 擴增方法係已知的，其中大部分依賴於酶促鏈反

應(諸如聚合酶鏈反應、連接酶鏈反應或自主序列複製)或已經將其選殖進入其中之載體之全部或部分之複製。

多種靶及信號擴增(TAS)方法已描述於文獻中，例如，該等方法之一般性回顧可見於Landegren, U.等人，*Science* 242:229-237(1988)及Lewis, R., *Genetic Engineering News* 10:1, 54-55(1990)中。PCR為此項技術中常用之核酸擴增方法且尤其描述於美國專利第4,683,195號及第4,683,202號中。PCR可用於擴增診斷環境中之任何已知核酸(Mok等人，1994, *Gynaecologic Oncology* 52:247-252)。自主序列複製(3SR)為TAS之變體，其包括經由由酶混合物及適當寡核苷酸引子介導之逆轉錄酶(RT)、聚合酶及核酸酶活性之連續循環等溫擴增核酸模板(Guatelli等人，1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874)。連接擴增反應或連接擴增系統使用DNA連接酶及四種寡核苷酸(每種靶股兩種寡核苷酸)。此技術描述於Wu, D. Y.及Wallace, R. B.之1989, *Genomics* 4:560中。在Q.beta.複製酶技術中，使用複製單股RNA之噬菌體Q.beta.之RNA複製酶擴增靶DNA，如Lizardi等人1988, *Bio/Technology* 6:1197中所述。定量PCR(Q-PCR)為可測定樣品內轉錄相對量之技術。

### III. TNF抑制劑

本發明描述判定TNF $\alpha$ 抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於治療關節黏連脊椎炎(AS)之功效的方法。本發明亦提供監測TNF $\alpha$ 抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於減緩患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞發展之功效的方法。本發明進一步包括預測TNF $\alpha$ 抑制劑(例如人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分)用於治療患者之AS之功效的方法。亦涵蓋與所主張之方法關聯的組合物及套組作為本發明之

部分。

在一實施例中，該等方法包括判定以高親和力及低解離速率結合至人類TNF $\alpha$ 且具有高中和能力之分離人類抗體或其抗原結合部分的功效。用於本發明之人類抗體較佳為重組、中和人類抗hTNF $\alpha$ 抗體。本發明之最佳重組、中和抗體在本文中稱為D2E7，亦稱為HUMIRA<sup>®</sup>及阿達木單抗(D2E7 VL區之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 1中；D2E7 VH區之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 2中)。D2E7之特性(阿達木單抗/HUMIRA<sup>®</sup>)已描述於Salfeld等人之美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015號中，該等各專利以引用方式併入本文中。本發明之方法亦可使用已經歷治療類風濕性關節炎之臨床測試的嵌合及人源化鼠類抗hTNF $\alpha$ 抗體執行(參見例如Elliott, M.J., 等人(1994) Lancet 344:1125-1127; Elliot, M.J., 等人(1994) Lancet 344:1105-1110; Rankin, E.C., 等人, (1995) Br. J. Rheumatol. 34:334-342)。

在一實施例中，本發明之方法包括判定D2E7抗體及抗體部分、D2E7相關抗體及抗體部分以及具有與D2E7相同之特性(諸如以低解離動力學及高中和能力高親和力結合至hTNF $\alpha$ )之其他人類抗體及抗體部分用於治療AS的功效。在一實施例中，本發明提供利用分離人類抗體或其抗原結合部分之療法，該分離人類抗體或其抗原結合部分以均由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-8}$  M或小於 $1 \times 10^{-8}$  M之 $K_d$ 及 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離且在標準活體外L929檢定中以 $1 \times 10^{-7}$  M或小於 $1 \times 10^{-7}$  M之 $IC_{50}$ 中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性。更佳地，該分離人類抗體或其抗原結合部分以 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{off}$ 或甚至更佳以 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{off}$ 與人類TNF $\alpha$ 解離。更

佳地，該分離人類抗體或其抗原結合部分在標準活體外L929檢定中中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性，IC<sub>50</sub>為 $1 \times 10^{-8}$  M或小於 $1 \times 10^{-8}$  M，甚至更佳IC<sub>50</sub>為 $1 \times 10^{-9}$  M或小於 $1 \times 10^{-9}$  M，且更佳IC<sub>50</sub>為 $1 \times 10^{-10}$  M或小於 $1 \times 10^{-10}$  M。在一較佳實施例中，該抗體為分離人類重組抗體或其抗原結合部分。

在此項技術中已熟知抗體重鏈及輕鏈CDR3域在抗體對抗原之結合特異性/親和力中起重要作用。因此，在另一態樣中，本發明係關於預測患者對用於AS之治療之反應的方法，其中該治療包含投與具有與hTNF $\alpha$ 締合之低解離動力學及具有輕鏈及重鏈CDR3域的人類抗體，該等輕鏈及重鏈CDR3域在結構上與D2E7之彼等域相同或相關。D2E7 VL CDR3之位置9可由Ala或Thr佔據，而大體上不影響K<sub>off</sub>。因此，D2E7 VL CDR3之一致基元包含以下胺基酸序列：Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A)(SEQ ID NO: 3)。此外，D2E7 VH CDR3之位置12可由Tyr或Asn佔據，而大體上不影響K<sub>off</sub>。因此，D2E7 VH CDR3之一致基元包含以下胺基酸序列：V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N)(SEQ ID NO: 4)。此外，如美國專利第6,090,382號實例2中所證明，D2E7重鏈及輕鏈之CDR3域可經受單丙胺酸殘基(在VL CDR3內之位置1、4、5、7或8，或在VH CDR3內之位置2、3、4、5、6、8、9、10或11)取代而大體上不影響K<sub>off</sub>。此外，熟習技工應瞭解，若D2E7 VL及VH CDR3域可經受丙胺酸取代，則CDR3域內其他胺基酸之取代，尤其經保守胺基酸取代同時仍保持該抗體之低解離速率常數可為可能的。較佳在D2E7 VL及/或VH CDR3域內形成不超過1至5個保守胺基酸取代。更佳在D2E7 VL及/或VH CDR3域內形成不超過1至3個保守胺基酸取代。此外，保守胺基酸取代應不在對結合至hTNF $\alpha$ 起關鍵作用之胺基酸位置形成。D2E7 VL

CDR3之位置2及位置5以及D2E7 VH CDR3之位置1及位置7似乎對於與hTNF $\alpha$ 之相互作用為關鍵的，且因此保守胺基酸取代較佳不在該等位置上形成(儘管如上所述，在D2E7 VL CDR3位置上之丙胺酸取代可接受)(參見美國專利第6,090,382號)。

因此，在另一實施例中，本發明提供判定包含投與分離人類抗體或其抗原結合部分之對AS之治療之功效的方法。該抗體或其抗原結合部分較佳含有以下特性：

a)以如由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{\text{off}}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離；

b)具有輕鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列，或在位置1、4、5、7或8由單丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：3修飾之胺基酸序列；

c)具有重鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列，或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11由單丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12由1至5個保守胺基酸取代自SEQ ID NO：4修飾之胺基酸序列。

更佳地，該抗體或其抗原結合部分以 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{\text{off}}$ 與人類TNF $\alpha$ 解離。甚至更佳地，該抗體或其抗原結合部分以 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或小於 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 之 $K_{\text{off}}$ 與人類TNF $\alpha$ 解離。

在又一實施例中，本發明提供判定包含投與分離人類抗體或其抗原結合部分之對AS之治療之功效的方法。該抗體或其抗原結合部分較佳含有：具有CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)，該CDR3域包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列或在位置1、4、5、7或8由單丙胺酸取代自SEQ ID NO：3修飾之胺基酸序列；以及具有CDR3域之重鏈可變區(HCVR)，該CDR3域包含SEQ ID

NO：4之胺基酸序列，或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11經單丙胺酸取代自SEQ ID NO：4修飾之胺基酸序列。較佳地，LCVR進一步具有包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR2域(亦即D2E7 VL CDR2)，且該HCVR進一步具有包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR2域(亦即D2E7 VH CDR2)。甚至更佳地，該LCVR進一步具有包含SEQ ID NO：7之胺基酸序列的CDR1域(亦即D2E7 VL CDR1)且該HCVR具有包含SEQ ID NO：8之胺基酸序列的CDR1域(亦即D2E7 VH CDR1)。VL之框架區較佳來自V<sub>κ</sub>I人類生殖系家族，更佳來自A20人類生殖系Vk基因，且最佳來自美國專利第6,090,382號圖1A及1B中所示之D2E7 VL框架序列。VH之框架區較佳來自V<sub>H</sub>3人類生殖系家族，更佳來自DP-31人類生殖系VH基因，且最佳來自美國專利第6,090,382號圖2A及2B中所示之D2E7 VH框架序列。

因此，在另一實施例中，本發明提供判定對AS之治療之功效的方法，其中該治療包含投與分離人類抗體或其抗原結合部分。該抗體或其抗原結合部分較佳含有包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)(亦即D2E7 VL)以及包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)(亦即D2E7 VH)。在某些實施例中，該抗體包含重鏈恆定區，諸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。較佳該重鏈恆定區為IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，該抗體可包含輕鏈恆定區(κ輕鏈恆定區或λ輕鏈恆定區)。較佳該抗體包含κ輕鏈恆定區。或者，該抗體部分可為例如Fab片段或單鏈Fv片段。

在其他實施例中，本發明提供判定對AS之治療之功效的方法，其中該治療包含投與含有D2E7相關VL及VH CDR3域之分離人類抗體或其抗原結合部分。舉例而言，含有具有CDR3域之輕



鏈可變區(LCVR)的抗體或其抗原結合部分，該CDR3域包含選自由以下序列組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：16、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：20、SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：22、SEQ ID NO：23、SEQ ID NO：24、SEQ ID NO：25及SEQ ID NO：26；或含有具有CDR3域之重鏈可變區(HCVR)的抗體或其抗原結合部分，該CDR3域包含選自由以下序列組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34及SEQ ID NO：35。

在另一實施例中，本發明之方法包括判定對AS之治療之功效，其中該治療包含投與包括但不限於抗TNF $\alpha$ 抗體或其片段之TNF $\alpha$ 抑制劑，其包括英利昔單抗(Remicade<sup>®</sup>，Johnson及Johnson；描述於美國專利第5,656,272號中，該專利以引用方式併入本文中)、CDP 571(人源化單株抗TNF- $\alpha$  IgG4抗體)、CDP870(人源化單株抗TNF- $\alpha$ 抗體片段)、抗TNF dAb(Peptech)、CNTO 148(高麗木單抗；Medarex及Centocor，參見WO 02/12502)及阿達木單抗(Humira<sup>®</sup> Abbott Laboratories，人類抗TNF mAb，描述於US 6,090,382中，如D2E7)。其他實例包括依那西普(描述於WO 91/03553及WO 09/406476中)、I型可溶性TNF受體、I型聚乙二醇化可溶性TNF受體(PEGs TNF-R1)或p55TNFR1gG(來那西普(Lenercept))。在另一實施例中，該TNF $\alpha$ 抑制劑為重組TNF結合蛋白(r-TBP-I)(Serono)。

用於本發明之方法及組合物中的TNF $\alpha$ 抗體可經修飾以便改

良AS之治療。在一些實施例中，該TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段經化學修飾以提供所需效應。舉例而言，由此項技術中已知之任意聚乙二醇化反應進行本發明之抗體及抗體片段之聚乙二醇化，如以下參考文獻中所述：Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992)；EP 0 154 316及EP 0 401 384(各文獻以引用方式全文併入本文中)。較佳聚乙二醇化係以反應性聚乙二醇分子(或類似反應性水溶性聚合物)經由醯化反應或烷基化反應進行。用於本發明之抗體及抗體片段之聚乙二醇化的較佳水溶性聚合物為聚乙二醇(PEG)。如本文中所使用，"聚乙二醇"意欲涵蓋可用於將其他蛋白質衍生化之PEG的任意形式，諸如單(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。

製備本發明之聚乙二醇化抗體及抗體片段之方法通常包含以下步驟：(a)在藉以使抗體或抗體片段連接至一或多個PEG基團之條件下，使抗體或抗體片段與聚乙二醇(諸如PEG之反應性酯或醛衍生物)反應；及(b)獲得反應產物。基於已知參數及所需結果來選擇最佳反應條件或醯化反應對於一般熟習此項技術者係顯而易見的。

通常可藉由投與本文所述之TNF $\alpha$ 抗體及抗體片段來使用聚乙二醇化抗體及抗體片段治療AS。與非聚乙二醇化抗體及抗體片段比較，該等聚乙二醇化抗體及抗體片段通常具有增加之半衰期。該等聚乙二醇化抗體及抗體片段可單獨、與其他醫藥組合物共同或組合使用。

在本發明之又一實施例中，可改造TNF $\alpha$ 抗體或其片段，其中將抗體之恆定區加以修飾以相對於未修飾之抗體降低至少一個恆定區所介導之生物效應功能。為修飾本發明之抗體以使得其展現降低之與Fc受體之結合，可使該抗體之免疫球蛋白恆定

區片段在Fc受體(FcR)相互作用所需之特定區域突變(參見例如 Canfield, S.M.及 S.L. Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491; 及 Lund, J.等人, (1991) J. of Immunol. 147:2657-2662)。抗體之FcR結合能力之降低亦可降低依賴FcR相互作用(諸如調理作用及噬菌作用)的其他效應功能及抗原依賴型細胞之細胞毒性。

用於本發明之方法中的抗體或抗體部分可經衍生化或連接至另一功能分子(例如另一肽或蛋白質)。因此,本發明之抗體及抗體部分意欲包括本文中所述之人類抗hTNF $\alpha$ 抗體之衍生化形式及其他修飾形式,包括免疫黏附分子。舉例而言,本發明之抗體或抗體部分可(藉由化學偶合、遺傳融合、非共價結合或其他方式)功能性連接至一或多個其他分子實體,諸如另一抗體(例如雙特異性抗體或雙功能抗體)、可偵測劑、細胞毒性劑、醫藥劑及/或可介導抗體或抗體部分與另一分子(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區或聚組胺酸標記)結合的蛋白質或肽。

一類型之衍生化抗體係藉由使兩種或兩種以上抗體(同一類型或不同類型,例如以產生雙特異性抗體)交聯而製備。適當交聯劑包括具有雙官能性之具有兩個由適當間隔基隔開之不同反應性基團之彼等物質(例如間-順丁烯二醯亞胺苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯);或具有均雙官能性之彼等物質(例如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)。該等連接子可購自Pierce Chemical Company, Rockford, IL。

可用於使本發明之抗體或抗體部分衍生化之適用可偵測劑包括螢光化合物。例示性螢光可偵測劑包括螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅蛋白及類似製劑。亦可以諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、葡萄糖氧化酶

及類似酶之可偵測酶使抗體衍生化。當抗體以可偵測酶衍生化時，其可藉由添加該酶用來產生可偵測反應產物的其他試劑偵測。舉例而言，當存在可偵測劑辣根過氧化物酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺會產生可偵測的有色反應產物。亦可將抗體以生物素衍生化，且經由間接量測抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合進行偵測。

用於本發明之方法或組合物中之抗體或抗體部分可藉由在宿主細胞中重組表現免疫球蛋白輕鏈及重鏈基因而製備。為重組表現抗體，以一或多個攜帶編碼該抗體之免疫球蛋白輕鏈及重鏈之DNA片段的重組表現載體轉染宿主細胞，以使得在宿主細胞中表現該等輕鏈及重鏈，且較佳分泌進入宿主細胞於其中培養之培養基內，抗體可自該培養基中回收。使用標準重組DNA方法獲得抗體重鏈及輕鏈基因，將該等基因併入重組表現載體且將該等載體引入宿主細胞，諸如以下文獻中所述者：Sambrook, Fritsch 及 Maniatis(編)，Molecular Cloning; A Laboratory Manual，第二版，Cold Spring Harbor, N.Y.,(1989), Ausubel, F.M.等人(編)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)以及Boss等人之美國專利第4,816,397號。

為表現D2E7或D2E7相關抗體，首先獲取編碼輕鏈及重鏈可變區的DNA片段。該等DNA可藉由使用聚合酶鏈反應(PCR)擴增及修飾生殖系輕鏈及重鏈可變序列獲得。人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列在此項技術中係已知的(參見例如"Vbase"人類生殖系序列資料庫；亦參見Kabat, E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-

3242號；Tomlinson, I.M.等人，(1992)"The Repertoire of Human Germline  $V_H$  Sequences Reveals about Fifty Groups of  $V_H$  Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798；及Cox, J.P.L.等人，(1994) "A Directory of Human Germ-line  $V_{H8}$  Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836；該等各文獻之內容以引用方式明確併入本文中)。為獲得編碼D2E7或D2E7相關抗體之重鏈可變區的DNA片段，由標準PCR擴增人類生殖系VH基因之 $V_H3$ 家族之成員。最佳擴增DP-31 VH生殖系序列。為獲得編碼D2E7或D2E7相關抗體之輕鏈可變區之DNA片段，由標準PCR擴增人類生殖系VL基因之 $V_{\kappa}I$ 家族之成員。最佳擴增A20 VL生殖系序列。適用於擴增DP-31生殖系VH及A20生殖系VL序列之PCR引子可使用標準方法基於如上引用之參考文獻中所揭示的核苷酸序列設計。

一旦獲得生殖系VH及VL片段，即可突變該等序列以編碼本文中所揭示之D2E7或D2E7相關胺基酸序列。首先將由生殖系VH及VL DNA序列所編碼之胺基酸序列與D2E7或D2E7相關VH及VL胺基酸序列比較，以鑑別D2E7或D2E7相關序列中與生殖系不同的胺基酸殘基。接著，使用遺傳密碼確定應改變哪個核苷酸，使生殖系DNA序列中之適當核苷酸突變以使經突變之生殖系序列編碼D2E7或D2E7相關胺基酸序列。生殖系序列之誘變由標準方法進行，諸如PCR介導之誘變(其中將突變之核苷酸併入PCR引子以使PCR產物含有該等突變)或定點誘變。

一旦獲得編碼D2E7或D2E7相關VH及VL片段之DNA片段(藉由擴增且誘變生殖系VH及VL基因，如上所述)，該等DNA片段可由標準重組DNA技術進一步處理，例如將可變區基因轉變為

全長抗體鏈基因、轉變為Fab片段基因或轉變為scFv基因。在該等處理中，可使編碼VL或VH之DNA片段操作性連接至編碼另一蛋白質之另一DNA片段，諸如抗體恆定區或撓性連接子。如本上下文中所使用之術語 "操作性連接"意欲指使兩個DNA片段接合以使得由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框。

藉由將編碼VH之DNA操作性連接至編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之另一DNA分子，可將所分離之編碼VH區的DNA轉變為全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列在此項技術中係已知的(參見例如Kabat E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)，且包含該等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增方法獲得。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但最佳為IgG1或IgG4恆定區。對於Fab片段重鏈基因，可使編碼VH之DNA操作性連接至僅編碼重鏈CH1恆定區的另一DNA分子。

藉由將編碼VL之DNA操作性連接至編碼輕鏈恆定區CL之另一DNA分子，可使所分離之編碼VL區的DNA轉變為全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中係已知的(參見例如Kabat E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)，而包含該等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增方法獲得。輕鏈恆定區可為 $\kappa$ 恆定區或 $\lambda$ 恆定區，但最佳為 $\kappa$ 恆定區。

為產生scFv基因，可將編碼VH及編碼VL的DNA片段操作性連接至編碼撓性連接子(編碼胺基酸序列(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>)的另一片段

上，以便將VH及VL序列以連續單鏈蛋白質表現，其中VL與VH區係由撓性連接子接合(參見例如Bird等人，(1988) *Science* 242:423-426；Huston等人，(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883；McCafferty等人，*Nature* (1990) 348:552-554)。

為表現本發明中所使用的抗體或抗體部分，將如上述所獲得之編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA插入至表現載體中，以使得該等基因操作性連接至轉錄及轉譯控制序列。在本上下文中，術語"操作性連接"意欲指將抗體基因接入載體內，以使得載體內之轉錄及轉譯控制序列提供其調節抗體基因轉錄及轉譯之預定功能。選擇表現載體及表現控制序列，以便能與所使用之表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入個別載體，或更典型者，係將兩個基因插入至同一表現載體。抗體基因係以標準方法插入至表現載體(例如連接抗體基因片段與載體上之互補限制性位點；或若不存在限制性位點，則鈍端連接)。在插入D2E7或D2E7相關輕鏈或重鏈序列之前，表現載體可已經攜帶抗體恆定區序列。舉例而言，將D2E7或D2E7相關VH及VL序列轉變為全長抗體基因的一種方法係將其分別插入已編碼重鏈恆定區與輕鏈恆定區的表現載體，以使得VH片段操作性連接至載體內之CH片段，且VL片段操作性連接至載體內之CL片段。此外，或者重組表現載體可編碼利於抗體鏈自宿主細胞分泌之信號肽。可將抗體鏈基因選殖入載體以使得信號肽同框連接至抗體鏈基因的胺基末端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即來源於非免疫球蛋白蛋白質的信號肽)。

除抗體鏈基因之外，本發明之重組表現載體亦攜帶控制抗體鏈基因在宿主細胞內之表現的調控序列。術語"調控序列"意欲包括控制抗體鏈基因轉錄或轉譯之啟動子、強化子及其他表

現控制元件(例如多聚腺嘌呤信號)。例如 Goeddel 於 *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中描述了該等調控序列。熟習此項技術者應瞭解, 包括調控序列之選擇的表現載體之設計可視諸如選擇欲轉型之宿主細胞、所需蛋白質之表現量等因素而定。用於哺乳動物宿主細胞表現之較佳調控序列包括指導蛋白質在哺乳動物細胞內高含量表現之病毒元件, 諸如獲自細胞巨大病毒(CMV)的啓動子及/或強化子(諸如CMV啓動子/強化子)、獲自猿猴病毒40(SV40)的啓動子及/或強化子(諸如SV40啓動子/強化子)、獲自腺病毒的啓動子及/或強化子(例如腺病毒主要晚期啓動子(AdMLP))及獲自多形瘤的啓動子及/或強化子。欲知病毒調控元件及其序列之進一步說明, 參見例如 Stinski 之美國專利第 5,168,062 號、Bell 等人之美國專利第 4,510,245 號及 Schaffner 等人之美國專利第 4,968,615 號。

除抗體鏈基因及調控序列之外, 本發明中所使用的重組表現載體亦可攜帶其他序列, 諸如調節載體在宿主細胞內複製之序列(例如複製起點)及選擇標記基因。選擇標記基因利於選擇載體已引入其中之宿主細胞(參見例如 Axel 等人之美國專利第 4,399,216 號、第 4,634,665 號及第 5,179,017 號)。舉例而言, 選擇標記基因通常將針對諸如 G418、潮黴素或氨甲喋呤之抗藥性賦予載體已引入其中之宿主細胞。較佳選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於在 dhfr 宿主細胞中氨甲喋呤選擇/擴增)及 neo 基因(用於 G418 選擇)。

為表現該等輕鏈及重鏈, 由標準技術將編碼該等重鏈及輕鏈之表現載體轉染入宿主細胞。術語"轉染"之各種形式意欲涵蓋將外源 DNA 引入原核或真核宿主細胞內所常用之多種技術,



例如電穿孔、磷酸鈣沉澱、DEAE-葡聚糖轉染及類似技術。儘管在理論上本發明之抗體可能在原核或真核宿主細胞中表現，但抗體在真核細胞中且最佳在哺乳動物宿主細胞中表現為最佳，原因在於該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞比原核細胞更可能組裝及分泌經適當折疊且具有免疫活性之抗體。據報導原核表現抗體基因對於產生高產量的活性抗體無效(Boss, M.A.及Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13)。

用於表現本發明之重組抗體之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)(包括 dhfr-CHO細胞，描述於 Urlaub及 Chasin之(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220中，其使用DHFR選擇標記，例如R.J. Kaufman及P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621中所述)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞時，藉由將該等宿主細胞培養足以使抗體在宿主細胞內表現或更佳使抗體分泌進入宿主細胞所生長於其中之培養基內之時期而產生該等抗體。使用標準蛋白質純化方法可自該培養基回收抗體。

宿主細胞亦可用於製造完整抗體之部分，諸如Fab片段或scFv分子。應瞭解，以上程序之變化均屬於本發明之範疇。舉例而言，以編碼本發明之抗體之輕鏈或重鏈(而非兩者)的DNA轉染宿主細胞可為所希望的。DNA重組技術亦可用於移除一些或所有編碼對於與hTNF $\alpha$ 結合並非必需之輕鏈與重鏈中之任一者或兩者之DNA。本發明之抗體亦涵蓋由該等截短DNA分子所表現之分子。此外，藉由標準化學交聯方法使本發明之抗體與第二抗體交聯可製備其中一重鏈與一輕鏈為本發明之抗體而另一重鏈與輕鏈對於除hTNF $\alpha$ 之外之抗原具有特異性的雙功能抗

體。

在用於重組表現本發明之抗體或其抗原結合部分的較佳系統中，可由磷酸鈣介導轉染法將編碼抗體重鏈與抗體輕鏈的重組表現載體引入 dhfr-CHO 細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈與輕鏈基因各自操作性連接至 CMV 強化子/AdMLP 啟動子調控元件以驅動基因之高含量轉錄。重組表現載體亦攜帶 DHFR 基因，其允許使用氨甲喋呤選擇/擴增選擇已轉染有載體之 CHO 細胞。培養所選轉型體宿主細胞以使抗體重鏈與輕鏈表現且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞及自培養基回收抗體。

除本文中所揭示之 D2E7 或其抗原結合部分或 D2E7 相關抗體外，本發明之重組人類抗體亦可藉由篩檢重組組合抗體文庫、較佳 scFv 噬菌體展示文庫而分離，該等文庫係使用源自人類淋巴細胞之 mRNA 所製備之人類 VL 與 VH cDNA 所製備。製備及篩檢該等文庫之方法在此項技術中係已知的。除用於產生噬菌體展示文庫之市購套組(例如 Pharmacia 重組噬菌體抗體系統，目錄號第 27-9400-01 號；及 Stratagene SurfZAP™ 噬菌體展示套組，目錄號第 240612 號)外，尤其適用於產生及篩檢抗體展示文庫之方法及試劑的實例可獲得於例如，Ladner 等人之美國專利第 5,223,409 號；Kang 等人之 PCT 公開案第 WO 92/18619 號；Dower 等人之 PCT 公開案第 WO 91/17271 號；Winter 等人之 PCT 公開案第 WO 92/20791 號；Markland 等人之 PCT 公開案第 WO 92/15679 號；Breitling 等人之 PCT 公開案第 WO 93/01288 號；McCafferty 等人之 PCT 公開案第 WO 92/01047 號；Garrard 等人之 PCT 公開案第 WO 92/09690 號；Fuchs 等人，(1991) Bio/Technology 9:1370-

1372 ; Hay 等人 , (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-65 ; Huse 等人 , (1989) Science 246:1275-1281 ; McCafferty 等人 , Nature (1990) 348:552-554 ; Griffiths 等人 , (1993) EMBO J 12:725-734 ; Hawkins 等人 , (1992) J Mol Biol 226:889-896 ; Clackson 等人 , (1991) Nature 352:624-628 ; Gram 等人 , (1992) PNAS 89:3576-3580 ; Garrard 等人 , (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377 ; Hoogenboom 等人 , (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137 ; 及 Barbas 等人 , (1991) PNAS 88:7978-7982 。

在一較佳實施例中 , 為分離對 hTNF $\alpha$  具有高親和力及低解離速率常數之人類抗體 , 首先使用 Hoogenboom 等人之 PCT 公開案第 WO 93/06213 號中所述的抗原決定基印記法 , 使用對 hTNF $\alpha$  具有高親和力及低解離速率常數的鼠類抗 hTNF $\alpha$  抗體 (例如具有寄存編號 ECACC 87 050801 的 MAK 195 雜交瘤) 選擇對 hTNF $\alpha$  具有類似結合活性的人類重鏈及輕鏈序列。該方法中所使用之抗體文庫較佳為如 McCafferty 等人之 PCT 公開案第 WO 92/01047 號 ; McCafferty 等人 , Nature (1990) 348:552-554 ; 及 Griffiths 等人 , (1993) EMBO J 12:725-734 中描述所製備及篩檢之 scFv 文庫。較佳使用重組人類 TNF $\alpha$  作為抗原篩檢 scFv 抗體文庫。

一旦選擇人類 VL 及 VH 片段 , 即可進行 "混合搭配" 實驗 , 其中篩檢不同對之初選 VL 及 VH 片段用於 hTNF $\alpha$  結合 , 以選擇較佳 VL/VH 對組合。此外 , 為進一步提高 hTNF $\alpha$  結合之親和力及 / 或降低 hTNF $\alpha$  結合之解離速率常數 , 可以與活體內體細胞突變方法 (負責天然免疫反應期間抗體之親和性成熟) 類似之方法使較佳 VL/VH 對之 VL 及 VH 片段隨機突變 , 較佳在 VH 及 / 或 VL 之 CDR3 區內部突變。該活體外親和性成熟可使用分別與 VH CDR3 或 VL CDR3 互補之 PCR 引子擴增 VH 區及 VL 區 , 該等引子已在某

些位點"插"有四個核苷酸鹼基的任意混合物以便所得PCR產物編碼其中隨機突變已引入VH及/或VL CDR3區的VH及VL片段。可再篩檢結合至hTNF $\alpha$ 之該等經隨機突變之VH及VL片段，且可選擇對hTNF $\alpha$ 結合展現高親和力及低解離速率的序列。

自重組免疫球蛋白展示文庫篩檢且分離本發明之抗hTNF $\alpha$ 抗體後，可自展示封裝(例如自噬菌體基因組)中回收編碼所選抗體之核酸，且由標準重組DNA技術將其次選殖入其他表現載體。若需要，核酸可進一步處理以產生本發明之其他抗體形式(例如連接至編碼諸如其他恆定區之其他免疫球蛋白域的核酸)。為表現藉由篩檢組合文庫所分離之重組人類抗體，如上文中所詳述，將編碼抗體之DNA選殖入重組表現載體且引入哺乳動物宿主細胞中。

分離對hTNF $\alpha$ 具有高親和力及低解離速率常數之人類抗體的方法亦描述於美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015號中，各專利以引用方式併入本文中。

#### IV. 脊柱關節病

TNF $\alpha$ 與多種病症(包括炎性疾病，諸如脊柱關節病)之病理生理學有關(參見例如Moeller等人，(1990) Cytokine 2:162；美國專利第5,231,024號；歐洲專利公開案第260 610號)。

如本文中所使用，使用術語"脊柱關節病"以指影響脊柱關節之若干疾病中之任一種，其中該等疾病具有共同之臨床、放射性及組織特徵。很多脊柱關節病具有共同遺傳特徵，亦即其與HLA-B27等位基因有關。在一實施例中，使用術語脊柱關節病以指影響脊柱關節之若干疾病中之任一種，但不包括關節黏連脊椎炎，其中該等疾病具有共同之臨床、放射性及組織特徵。脊柱關節病之實例包括關節黏連脊椎炎、牛皮癬關節炎/脊

椎炎、腸病關節炎、反應性關節炎或萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)及未分化脊柱關節病。用於研究脊柱關節病的動物模型實例包括 ank/ank 轉基因小鼠、HLA-B27 轉基因大鼠(參見 Taurog 等人, (1998) *The Spondylarthritides*. Oxford:Oxford University Press)。

本發明之方法亦可用於治療處於患脊柱關節病之危險中的受檢者。處於患脊柱關節病之危險中的受檢者之實例包括患有關節炎之人類。脊柱關節病可與其他形式之關節炎(包括類風濕性關節炎)關聯。在本發明之一實施例中,測定處於患脊柱關節病之危險中之患者之軟骨退化及/或滑膜炎生物標記的生物標記含量且用於評估患者是否處於患脊柱關節病的危險中。下文描述可以 TNF $\alpha$  抗體治療且因此可使用本文中所述方法檢驗之脊柱關節病的實例:

#### 1. 關節黏連脊椎炎(AS)

腫瘤壞死因子與關節黏連脊椎炎(AS)之病理生理學相關(參見 Verjans 等人, (1991) *Arthritis Rheum.* 34:486; Verjans 等人, (1994) *Clin Exp Immunol.* 97:45; Kaijtz 等人, (1999) *Hum Immunol.* 60:140)。AS 為涉及一或多個椎骨發炎之炎性病。AS 為影響軸向骨架及/或周圍關節(包括脊柱之椎骨與骶髂關節之間的關節以及脊柱與骨盆之間的關節)的慢性炎性疾病。AS 最終會使得感染椎骨融合或生長在一起。包括 AS 在內之脊柱關節病可與牛皮癬關節炎(PsA)及/或炎性腸病(IBD)(包括潰瘍性結腸炎及克隆氏病(Crohn's disease))相關。

AS 之早期表現可由放射線照相測試(包括 CT 掃描及 MRI 掃描)測定。AS 之早期表現通常包括如由軟骨下骨之皮質邊緣模糊、繼而侵蝕及硬化所證明之骶髂關節炎及骶髂關節變化。疲

勞亦視為AS之共同症狀(Duffy等人，(2002) ACR第66屆科學年會摘要(Annual Scientific Meeting Abstract))。因此，本發明之方法可用於藉由提供判定包含投與TNF抑制劑之治療之功效的方法而提供對AS之經改良之治療。

在一實施例中，使用本發明之方法判定投與TNF抑制劑用於治療與IBD關聯之脊柱關節病(包括AS)的功效。

AS通常以諸如阿司匹靈或吲哚美辛之非類固醇消炎藥物(NSAID)治療。因此，本發明之方法可用於判定包含與常用於減輕一般與關節黏連脊椎炎關聯之炎症及疼痛之藥劑組合投與TNF $\alpha$ 抗體之治療的功效。

## 2. 牛皮癬關節炎

腫瘤壞死因子與牛皮癬關節炎(PsA)之病理生理學有關(Partsch等人，(1998) *Ann Rheum Dis.* 57:691；Ritchlin等人，(1998) *J Rheumatol.* 25:1544)。如本文中所述，與皮膚關聯之牛皮癬關節炎或牛皮癬係指與牛皮癬關聯的慢性炎性關節炎，其為導致在軀體上產生紅色斑點之常見慢性皮膚病狀。20個患牛皮癬之個體中約有1個將隨皮膚病狀產生關節炎，且在約75%之病例中，牛皮癬先於關節炎產生。PsA自身以自輕度關節炎至重度關節炎之各種形式展現，其中該關節炎通常影響手指及脊柱。當脊柱受影響時，症狀與如上所述之關節黏連脊椎炎的彼等症狀類似。因此，TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段用於治療PsA的功效可使用本發明之方法及組合物來判定。

PsA有時與關節炎性磨損有關。關節炎性磨損係指特徵為過度骨侵蝕導致毀傷關節之總體侵蝕性畸變之病症。在一實施例中，TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段用於治療關節炎性磨損的功效可使用本發明之方法及組合物判定。

### 3. 反應性關節炎/萊特爾氏症候群

腫瘤壞死因子與反應性關節炎之病理生理學關聯，其亦稱為萊特爾氏症候群 (Braun 等人，(1999) *Arthritis Rheum.* 42(10):2039)。反應性關節炎(ReA)係指在體內其它地方兼有感染之關節炎，通常在腸感染或泌尿生殖系統感染之後。ReA之特徵通常為某些臨床症狀，包括關節炎症(關節炎)、尿道炎、結膜炎以及皮膚及黏膜病變。此外，ReA可繼性傳播疾病感染或痢疾感染(包括披衣菌(chlamydia)、彎曲桿菌(campylobacter)、沙門氏菌(salmonella)或耶氏桿菌(yersinia))後發生。在一實施例中，TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段用於治療ReA的功效可使用本發明之方法及組合物判定。

### 4. 未分化脊柱關節病

在一實施例中，使用本發明之方法所獲得之抗體用於治療患有未分化脊柱關節病的受檢者(參見 Zeidler 等人，(1992) *Rheum Dis Clin North Am.* 18:187)。用於描述未分化脊柱關節病之其他術語包括血清反應陰性寡關節炎及未分化寡關節炎。如本文中所使用之未分化脊柱關節病係指其中受檢者僅表現一些與脊柱關節病關聯之症狀之病症。此病狀通常發現於無IBD、牛皮癬或AS或萊特爾氏症候群之典型症狀的青年成人中。在一些情況下，未分化脊柱關節病可為AS之早期適應症。在一實施例中，TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段用於治療未分化脊柱關節病的功效可使用本發明之方法及組合物判定。

## V. 醫藥組合物及投藥

### A. 組合物及投藥

用於本發明之方法的抗體、抗體部分及其他TNF $\alpha$ 抑制劑可併入適合投與受檢者的醫藥組合物中。通常，該醫藥組合物包

含本發明之抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑及醫藥學上可接受之載劑。如本文中所使用，"醫藥學上可接受之載劑"包括任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及生理上相容的類似藥劑。醫藥學上可接受之載劑的實例包括水、鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物中之一或多者，以及其組合。在多種狀況下，組合物中較佳包括等張劑(例如糖、諸如甘露醇、山梨糖醇之多元醇或氯化鈉)。醫藥學上可接受之載劑可進一步包含少量增加抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑之存放期或效用之輔助性物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑。

用於本發明之方法的組合物可為多種形式。該等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射溶液及可注入溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、粉劑、脂質體及栓劑。較佳形式視預定投藥方式及治療應用而定。較佳典型組合物為可注射溶液或可注入溶液之形式，諸如與用於以其他抗體或其他TNF $\alpha$ 抑制劑被動免疫人類之彼等組合物物類似的組合物。較佳投藥方式為非經腸方式(例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌內)。在一較佳實施例中，該抗體或其他TNF $\alpha$ 抑制劑係藉由靜脈內灌輸或注射方式投與。在另一較佳實施例中，該抗體或其他TNF $\alpha$ 抑制劑係藉由肌內或皮下注射方式投與。

治療性組合物在製備及儲存條件下通常必須為無菌且穩定的。該組合物可調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或適於高藥物濃度的其他有序結構。無菌可注射溶液可藉由在具有以上所列舉之一種成份或成份之組合的適當溶劑中併入所需量的活性化合物(亦即抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑)繼而需要時過濾滅菌來製備。通常，分散液係藉由將活性化合物併入含



有鹼性分散介質及選自以上所列舉之彼等物質之所需其他成份的無菌媒劑內製備。在無菌粉劑用於製備無菌可注射溶液的狀況中，較佳製備方法為真空乾燥及凍乾法，該等方法可將活性成份與任何其他所需成份由其經預先無菌過濾之溶液製成其粉劑。藉由使用諸如卵磷脂之包衣，藉由在分散液狀況中維持所需粒度及藉由使用界面活性劑，可使溶液維持適當流動性。藉由在組合物中包括延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)，可使可注射組合物吸收延長。

亦可將補充活性化合物併入該等組合物。在某些實施例中，將用於本發明之方法中之抗體或抗體部分與一或多種其他治療劑(包括AS抑制劑或拮抗劑)共同調配及/或共同投與。舉例而言，本發明之抗hTNF $\alpha$ 抗體或抗體部分可與一或多種結合與TNF $\alpha$ 相關病症關聯之其他靶點、一或多種細胞激素、可溶性TNF $\alpha$ 受體(參見例如PCT公開案第WO 94/06476號)及/或一或多種抑制hTNF $\alpha$ 產生或活性之化學劑(諸如如PCT公開案第WO 93/19751號中所述之亞環己基衍生物)或其任何組合的其他抗體(例如結合其他細胞激素或結合細胞表面分子的抗體)共同調配及/或共同投與。此外，一或多種本發明之抗體可與兩種或兩種以上上述治療劑組合使用。有利地，該等組合療法使用較低劑量之所投治療劑，從而防止與各種單一療法關聯之可能的副作用、併發症或患者的低反應程度。

在一實施例中，本發明包括包含有效量之TNF $\alpha$ 抑制劑及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中該有效量之TNF $\alpha$ 抑制劑可有效治療AS。在一實施例中，將用於本發明之方法中的抗體或抗體部分如PCT/IB03/04502及美國申請案第10/222140號中所述併入醫藥調配物，該等案以引用方式併入本文中。此調配

物包括50 mg/ml濃度之抗體D2E7，其中一預填充注射器含有40 mg抗體用於皮下注射。在另一實施例中，本發明之調配物包括D2E7。

本發明之抗體、抗體部分及其他TNF $\alpha$ 抑制劑可由此項技術中已知之多種方法投與，儘管對於多種治療性應用，較佳投藥途徑/方式為皮下注射。在另一實施例中，投藥係經由靜脈內注射或灌輸。熟習此項技術者應瞭解，投藥途徑及/或方式視所需結果而變化。在某些實施例中，活性化合物可配合保護該化合物防止快速釋放之載劑製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊化遞送系統。可使用可生物降解、生物相容聚合物，諸如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。多種製備該等調配物之方法已獲專利，或通常為熟習此項技術者所已知。參見例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Robinson, 編, Dekker, Inc., New York, 1978。

用於本發明之TNF $\alpha$ 抗體亦可以蛋白質晶體調配物形式投與，該等調配物包括囊封於聚合物載劑內以形成包衣顆粒之蛋白質晶體之組合。蛋白質晶體調配物之包衣顆粒可具有球狀形態且為直徑高達500微米的微球體，或其可具有一些其它形態且為微粒。增大濃度之蛋白質晶體可允許皮下遞送本發明之抗體。在一實施例中，本發明之TNF $\alpha$ 抗體經由蛋白質遞送系統遞送，其中將蛋白質晶體調配物或組合物中之一或多者投與患有TNF $\alpha$ 相關病症的受檢者。製備完整抗體晶體或抗體片段晶體之穩定調配物的組合物及方法亦描述於WO 02/072636中，該專利以引用方式併入本文中。在一實施例中，使用本發明之治療方法將描述於PCT/IB03/04502及美國申請案第10/222140號中之包

含結晶抗體片段的調配物用於治療類風濕性關節炎，該等案以引用方式併入本文中。

在某些實施例中，本發明之抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑可與例如惰性稀釋劑或可吸收食用載劑一起經口投與。該化合物(及其他成份，若需要)亦可密封於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓縮成錠劑，或直接併入受檢者之膳食中。對於經口治療投藥，該等化合物可聯合賦形劑且以可攝取之錠劑、口腔錠劑、口含錠、膠囊劑、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑及類似劑型之形式使用。為藉由非經腸投藥之外的方式投與本發明之化合物，可需要以防止其失活之物質塗覆該化合物，或將該化合物與該物質共同投與。

本發明之醫藥組合物可包括"治療有效量"或"預防有效量"之本發明之抗體或抗體部分。"治療有效量"係指在所需劑量及時期下有效達成所需治療結果的量。該抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑之治療有效量可根據諸如個體之疾病狀態、年齡、性別及體重以及該抗體、抗體部分、其他TNF $\alpha$ 抑制劑在個體內引起所需反應之能力之因素而變化。治療有效量亦為其中該抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑之治療有益效應超過任何毒性或有害效應的量。"預防有效量"係指在所需之劑量及時期下有效達成所需預防結果的量。通常，由於預防劑量係在疾病之前或在疾病早期用於受檢者，因此預防有效量會小於治療有效量。

給藥方案可加以調節以提供最佳所需反應(例如治療或預防反應)。舉例而言，可投與單次大丸劑，可在一段時間內投與若干分開之劑量，或按治療形勢之緊急性指示按比例減少或增加劑量。為便於投藥及劑量一致性，以劑量單位形式調配非經腸

組合物尤其有利。如本文中所示之劑量單位形式係指對於欲治療之哺乳動物受檢者適合作為單位劑量的物理上離散之單元；各單元含有與所需醫藥載劑聯合經計算以產生所需治療效應之預定量的活性化合物。本發明之劑量單位形式的規格由以下因素規定且直接視以下因素而定：(a)活性化合物之獨特特徵及欲達成之特定治療或預防效應；及(b)為達成個體中之治療敏感度而混合該活性化合物之技術中固有之限制。

在一實施例中，本發明提供治療TNF $\alpha$ 相關病症的單劑量方法，該方法包含向需要其之受檢者投與單劑量TNF $\alpha$ 抑制劑(諸如人類抗體)。在一實施例中，該TNF $\alpha$ 抑制劑為抗TNF $\alpha$ 抗體D2E7。TNF $\alpha$ 抑制劑之單劑量可為任何治療或預防有效量。在一實施例中，向受檢者投與20 mg、40 mg或80 mg單劑量之D2E7。單劑量可經由任何途徑(包括例如皮下投藥)投與。可使用雙週給藥方案治療其中TNF $\alpha$ 活性有害之病症，且該方案進一步描述於美國申請案第10/163657號中。亦可使用多可變劑量治療或預防方法治療其中TNF $\alpha$ 活性有害之病症，且該方法進一步描述於PCT申請案第PCT/US05/12007號中。

應注意劑量值可隨欲減輕之病狀的類型及嚴重程度而變化。應進一步瞭解，對於任何特定受檢者，應根據個體需要及投與或監督組合物之投藥之個人之專業判斷隨時間調節具體給藥方案，且本文中所述之劑量範圍僅為例示性的且不欲限制所主張組合物的範圍或實施。

本發明亦係關於投與本發明之抗TNF抗體以治療AS的包裝醫藥組合物或套組。在本發明之一實施例中，該套組包含諸如抗體之TNF $\alpha$ 抑制劑、包含另一治療劑之第二醫藥組合物及治療AS之投藥說明書。該等說明書描述應如何(例如皮下)及何時(例如在第0週及第2

週)向受檢者投與不同劑量的TNF $\alpha$ 抑制劑及另一治療劑用於治療。

本發明之另一態樣係關於含有包含抗TNF $\alpha$ 抗體與醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物及一或多種各包含適用於治療TNF $\alpha$ 相關病症之藥物與醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物的套組。或者，該套組包含單一醫藥組合物，該組合物包含抗TNF $\alpha$ 抗體、一或多種適用於治療TNF $\alpha$ 相關病症之藥物及醫藥學上可接受之載劑。該等套組含有用於治療TNF $\alpha$ 相關病症之醫藥組合物的給藥說明書。

該包裝或套組或者可含有TNF $\alpha$ 抑制劑且其可在包裝內或經由所附關於使用或治療本文所述病症之資訊促銷用於使用。包裝藥物或套組進一步可包括與第一藥劑(如本文中所述)一起使用第二藥劑之說明書一起包裝或共同促銷之第二藥劑(如本文中所述)。

## B. 其他治療劑

本發明係關於判定TNF抑制劑單獨或與其他治療劑組合治療AS之功效。本文中所述方法及醫藥組合物中所使用之藥劑的組合對於治療靶向之病狀或疾病而言具有治療輔助效應或協同效應。本文中所述方法或醫藥組合物中所用藥劑之組合亦可降低當單獨投藥或不與特定醫藥組合物之其他藥劑一起投與時與該等藥劑中之至少一者所關聯的有害效應。舉例而言，一藥劑之副作用之毒性可由組合物之另一藥劑減弱，從而容許較高劑量，改善患者順應性及改善治療結果。該等組合物之輔助效應或協同效應、益處及優勢適用於結構類別或功能類別之治療劑類別，或適用於個別化合物本身。

亦可將補充活性化合物併入該等組合物。在某些實施例中，將本發明之抗體或抗體部分與一或多種適用於治療TNF $\alpha$ 相關病症之其他治療劑共同調配及/或共同投與。舉例而言，本發明之抗hTNF $\alpha$ 抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑可與一或多種結合其他靶點之其他抗體(例如結合其他細胞激素或結合細胞表面分子的抗體)、一或多種

細胞激素、可溶性TNF $\alpha$ 受體(參見例如PCT公開案第94/06476號)及/或一或多種抑制hTNF $\alpha$ 產生或活性之化學劑(諸如PCT公開案第WO 93/19751中所述的亞環己基衍生物)共同調配及/或共同投與。此外，本發明之一或多種抗體或其他TNF $\alpha$ 抑制劑可與兩種或兩種以上上述治療劑組合使用。有利地，該等組合療法使用較低劑量之所投與之治療劑，從而防止與各種單一療法相關之可能的毒性或併發症。

可在治療方法中與抗體、抗體部分或其他TNF $\alpha$ 抑制劑組合且可根據本發明之方法評估之治療劑的非限制性實例包括下列治療劑：非類固醇消炎藥(NSAID)；細胞激素抑制性消炎藥(CSAID)；CDP-571/BAY-10-3356(人源化抗TNF $\alpha$ 抗體；Celltech/Bayer)；cA2/英利昔單抗(嵌合抗TNF $\alpha$ 抗體；Centocor)；75 kDTNFR-IgG/依那西普(75 kD TNF受體-IgG融合蛋白；Immunex；參見例如Arthritis & Rheumatism (1994)，第37卷，S295；J. Invest. Med. (1996)第44卷，235A)；55 kDTNF-IgG (55 kD TNF受體-IgG融合蛋白；Hoffmann-LaRoche)；IDEC-CE9.1/SB 210396 (非耗盡型靈長動物化抗CD4抗體；IDEC / SmithKline；參見例如Arthritis & Rheumatism (1995)第38卷，S185)；DAB 486-IL-2及/或DAB 389-IL-2(IL-2融合蛋白；Seragen；參見例如Arthritis & Rheumatism (1993)第36卷，1223)；抗Tac(人源化抗IL-2R $\alpha$ ；Protein Design Labs/ Roche)；IL-4(抗炎性細胞激素；DNAX/Schering)；IL-10(SCH 52000；重組IL-10，抗炎性細胞激素；DNAX/Schering)；IL-4；IL-10及/或IL-4促效劑(例如促效劑抗體)；IL-1RA(IL-1受體拮抗體；Synergen/Amgen)；阿那白滯素(anakinra)(Kineret®/Amgen)；TNF-bp/s-TNF(可溶性TNF結合蛋白；參見例如Arthritis & Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S284；Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995)第268卷，第37-42頁)；R973401(磷酸二酯酶IV型抑制劑；參見例如

Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S282)；MK-966(COX-2抑制劑；參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S81)；伊洛前列素(Iloprost)(參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S82)；氨甲喋呤；撒利多胺(thalidomide)(參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S82)；及撒利多胺相關藥物(例如Celgen)；來氟米特(leflunomide)(抗炎症及細胞激素抑制劑；參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S131；Inflammation Research (1996)第45卷，第103-107頁)；抗凝血酸(tranexamic acid)(纖維溶酶原活化之抑制劑；參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S284)；T-614(細胞激素抑制劑；參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S282)；前列腺素E1(參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S282)；替尼達普(Tenidap)(非類固醇消炎藥；參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S280)；萘普生(非類固醇消炎藥；參見例如Neuro Report (1996)第7卷，第1209-1213頁)；美儂西康(Meloxicam)(非類固醇消炎藥)；布洛芬(Ibuprofen)(非類固醇消炎藥)；吡羅昔康(Piroxicam)(非類固醇消炎藥)；雙氯芬酸(非類固醇消炎藥)；吲哚美辛(Indomethacin)(非類固醇消炎藥)；柳氮磺胺吡啶(Sulfasalazine)(參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39期，第9期(增刊)，S281)；硫唑嘌呤(Azathioprine)(參見例如Arthritis及Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S281)；ICE抑制劑(酶白細胞介素-1 $\beta$ 轉換酶之抑制劑)；zap-70及/或lck抑制劑(酪胺酸激酶zap-70或lck之抑制劑)；VEGF抑制劑及/或VEGF-R抑制劑(血管內皮細胞生長因子或血管內皮細胞生長因子受體之抑制劑)；血管生成抑制劑)；皮質類固醇消炎藥(例如SB203580)；TNF-轉化酶抑制劑；抗IL-

12 抗體；抗 IL-18 抗體；白細胞介素 -11(參見例如 Arthritis 及 Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S296)；白細胞介素-13(參見例如 Arthritis 及 Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S308)；白細胞介素-17抑制劑(參見例如 Arthritis 及 Rheumatism (1996)第39卷，第9期(增刊)，S120)；金；青黴胺 (penicillamine)；氯喹 (chloroquine)；羥氯喹 (hydroxychloroquine)；苯丁酸氮芥 (chlorambucil)；環孢素；環磷醯胺；全淋巴輻射；抗胸腺細胞球蛋白；抗CD4抗體；CD5-毒素；經口投與之肽及膠原蛋白；氯苯紮利二鈉；細胞激素調節劑(CRA)HP228及HP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.)；ICAM-1 反義硫代磷酸酯寡去氧核苷酸 (ISIS 2302； Isis Pharmaceuticals, Inc.)；可溶性補體受體 1(TP10； T Cell Sciences, Inc.)；強的松(prednisone)；肝蛋白(orgotein)；多磺酸葡糖胺聚糖；二甲胺四環素(minocycline)；抗IL2R抗體；海生性脂質及植物性脂質(魚及植物種子脂肪酸；參見例如DeLuca等人(1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777)；金諾芬 (auranofin)；苯基丁氮酮 (phenylbutazone)；甲氯芬那酸 (meclofenamic acid)；氟滅酸 (flufenamic acid)；靜脈內免疫球蛋白；齊留通(zileuton)；阿紮立平 (azaribine)；黴酚酸(mycophenolic acid)(RS-61443)；他克莫司(FK-506)；西羅莫司 (sirolimus)(雷帕黴素 (rapamycin))；氨普立糖 (amiprilose)(塞拉菲汀(therafectin))；克拉屈濱(cladribine)(2-氯去氧腺苷)；氨甲喋呤；抗病毒劑；及免疫調節劑。使用本發明之多可變劑量或單劑量治療方法，可將以上任何藥劑與本發明之TNF $\alpha$ 抗體組合投與以治療TNF $\alpha$ 相關病症。

在一實施例中，本發明包括判定與以下藥劑組合之TNF抑制劑用於治療其中TNF $\alpha$ 活性有害之TNF $\alpha$ 相關病症之功效的製品或治療方法：抗IL12抗體(ABT 874)；抗IL18抗體(ABT 325)；LCK之小分子抑



制劑；COT之小分子抑制劑；抗IL1抗體；MK2之小分子抑制劑；抗CD19抗體；CXCR3之小分子抑制劑；CCR5之小分子抑制劑；CCR11抗E/L選擇素抗體之小分子抑制劑；P2X7之小分子抑制劑；IRAK-4之小分子抑制劑；糖皮質激素受體之小分子促效劑；抗C5a受體抗體；C5a受體之小分子抑制劑；抗CD32抗體；及作為治療蛋白之CD32。

在又一實施例中，本發明包括判定與抗生素或抗感染劑組合之TNF抑制劑之功效的製品或治療方法。抗感染劑包括此項技術中已知可治療病毒、真菌、寄生蟲或細菌感染之彼等藥劑。如本文中所使用之術語"抗生素"係指抑制微生物生長或殺死微生物之化學物質。該術語涵蓋微生物所產生之抗生素以及此項技術中已知之合成抗生素(例如類似物)。抗生素包括但不限於克拉黴素 (clarithromycin) (Biaxin®)、環丙沙星 (ciprofloxacin)(Cipro®) 及甲硝噻唑 (metronidazole)(Flagyl®)。

在另一實施例中，本發明包括判定與用於治療克隆氏病或克隆氏相關病症之藥物組合之TNF抑制劑之功效的製品或治療方法。可用於治療克隆氏病之治療劑的實例包括美沙拉嗪(mesalamine)、強的松、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英利昔單抗、布地縮松(budesonide)、柳氮磺胺吡啶、甲潑尼龍琥珀酸鈉、苯乙哌啶/硫酸阿拖平、鹽酸洛哌丁胺(loperamide hydrochloride)、氨甲喋呤、奧美拉唑(omeprazole)、葉酸、環丙沙星/右旋糖-水、酒石酸二氫氫可酮(hydrocodone bitartrate)/apap、鹽酸四環素、乙酸氟輕鬆(flucinonide)、甲硝噻唑、硫柳汞/硼酸、硫酸莨菪鹼(hyoscyamine sulfate)、消膽胺(cholestyramine)/蔗糖、鹽酸環丙沙星、鹽酸度冷丁(meperidine hydrochloride)、鹽酸咪達唑侖(midazolam hydrochloride)、氧可酮(oxycodone hcl)/乙醯胺苯酚(acetaminophen)、鹽酸異丙嗪(promethazine hydrochloride)、磷酸鈉、磺胺甲噁唑

(sulfamethoxazole)/ 甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim)、塞內昔布 (celecoxib)、聚卡波菲 (polycarbophil)、萘磺酸丙氧吩 (propoxyphene napsylate)、氫化可的松 (hydrocortisone)、多維生素 (multivitamins)、巴柳氮二鈉 (balsalazide disodium)、磷酸可待因 (codeine phosphate)/apap、鹽酸考來維侖 (colesevelam hcl)、鈷胺素 (cyanocobalamin)、葉酸、左氧氟沙星 (levofloxacin)、細胞黏附因子  $\alpha 4$  整合素 (natalizumab)、甲潑尼龍、干擾素- $\gamma$  及沙格司亭 (sargramostim) (GM-CSF)。在一實施例中，以每週 2.5 mg 至 30 mg 之劑量投與氨甲喋呤以治療克隆氏病。

可與局部皮質類固醇、維生素D類似物及局部或經口類視色素或其組合組合投與TNF $\alpha$ 抗體以治療牛皮癬。此外，該TNF $\alpha$ 抗體可與以下藥劑之一組合投與以治療牛皮癬：KDR之小分子抑制劑 (ABT-123)、Tie-2之小分子抑制劑、鈣泊三醇、丙酸氯氟美松 (clobetasol propionate)、曲安奈德 (triamcinolone acetonide)、鹵倍他索丙酸酯 (halobetasol propionate)、他紮羅汀 (tazarotene)、氨甲喋呤、乙酸氟輕鬆、增強型倍他米松二丙酸酯、乙酸膚輕鬆 (fluocinolone acetonide)、阿曲汀 (acitretin)、焦油洗髮精 (tar shampoo)、戊酸倍他米松 (betamethasone valerate)、莫美他松糠酸酯 (mometasone furoate)、酮康唑 (ketoconazole)、普莫卡因 (pramoxine)/膚輕鬆、戊酸氫化可的松 (hydrocortisone valerate)、氟氫縮松 (flurandrenolide)、尿素、倍他米松、丙酸氯氟美松 / 潤膚劑、氟替卡松丙酸酯 (fluticasone propionate)、阿奇黴素 (azithromycin)、氫化可的松、增濕配方、葉酸、地索奈德 (desonide)、煤焦油、二乙酸雙氟拉松 (diflorasone diacetate)、依那西普、葉酸酯、乳酸、甲氧沙林 (methoxsalen)、hc/次五倍子酸鋇 / znox/resor、乙酸甲潑尼松龍 (methylprednisolone acetate)、強的松、防曬劑、水楊酸、哈西縮松 (halcinonide)、蔥三酚

(anthralin)、特戊酸氯可龍(clocortolone pivalate)、煤萃取物、煤焦油/水楊酸、煤焦油/水楊酸/硫、去羥米松(desoximetasone)、安定(diazepam)、潤膚劑、吡美莫司潤膚劑(pimecrolimus emollient)、乙酸氟輕鬆/潤膚劑、礦物油/蓖麻油/na lact、礦物油/花生油、石油/十四烷酸異丙酯、補骨脂素(psoralen)、水楊酸、肥皂/三溴柳苯胺(tribromsalan)、硫柳汞/硼酸、塞內昔布、英利昔單抗、阿來塞普(alefacept)、依法珠單抗(efalizumab)、他克莫司(tacrolimus)、吡美莫司、PUVA、UVB及其他光電療法，及柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)。

在一實施例中，使用多可變劑量方法與用於治療腸病之上述藥劑中之一者組合投與本發明之TNF $\alpha$ 抗體以治療AS。在另一實施例中，在本發明之單劑量治療方法中，可與TNF $\alpha$ 抗體組合使用上述額外藥劑。在又一實施例中，以雙週給藥方案投與TNF $\alpha$ 抗體。

使用多可變劑量治療方案，可將單獨或與其組合之上述治療劑中之任一者與TNF $\alpha$ 抗體組合投與患有其中TNF $\alpha$ 有害之TNF $\alpha$ 相關病症的受檢者。在一實施例中，除TNF $\alpha$ 抗體外，可將單獨或與其組合之上述治療劑中之任一者投與患有腸病之受檢者，以治療另一TNF $\alpha$ 相關病症，諸如類風濕性關節炎。應瞭解，其他治療劑不僅可用於如上所述之組合療法中，而且亦可用於其中需要有益效應之本文中所述之其他適應症中。

本發明進一步由以下實例說明，該實例不應視為以任何方式限制本發明。

## 實例

實例1：阿達木單抗抑制活性關節黏連脊椎炎(AS)中之軟骨退化及滑膜炎之生物標記

以下研究之目標係為在阿達木單抗治療輕度至重度AS之受控試驗中分析軟骨及骨破壞之潛在生物標記，例如骨再吸收標記、膠原蛋

白降解標記及滑膜炎標記。該研究亦在AS研究群體中設法分析TNF抑制劑(亦即阿達木單抗)對骨再吸收標記、膠原蛋白降解標記及滑膜炎標記與CRP(AS之已知標記)之相關性的影響。

## 方法

對至少一種NSAID或DMARD具有不充分反應之患有活性AS的患者適合參與該研究。該研究設計描述於圖1中。在最初24週雙盲期間，使患者隨機化以每隔一週(eow)皮下(sc)接受40 mg安慰劑或阿達木單抗，隨後為80週開放標記期。在基線及以阿達木單抗或安慰劑治療後在第12及24週分析三種生物標記。具體而言，分析骨再吸收標記、血清I型膠原蛋白N-端肽(NTX)、膠原蛋白降解生物標記、尿II型膠原蛋白C-端肽(尿CTX-II)及滑膜炎生物標記、血清基質金屬蛋白酶3(MMPS)。因而，初級功效參數包括AS評估(ASAS)工作組標準、Bath AS疾病活性指數(BASDAI)及CRP。藉由ELISA，在基線及第12及24週量測各患者之尿II型膠原蛋白C-端肽(尿CTX-II)、血清I型膠原蛋白N-端肽(NTX)及血清MMP3的濃度。測定各治療組的距基線之濃度差以及該等生物標記變化與其他AS結果之間的相關性。

患者包含標準包括以下條件：患者 $\geq 18$ 歲；活性AS，藉由滿足以下3項標準中之至少2項而定義：(1)BASDAI得分 $\geq 4$ ；(2)全背痛之視覺類比量表(VAS)得分 $\geq 4$ ；及(3)晨起僵硬 $\geq 1$ 小時；及對至少一種NSAID反應不足。

患者除外標準包括以下條件：先前接受之抗TNF治療；全脊柱關節僵硬(竹節樣脊柱)之放射性證明；在基線4週內使用上述DMARD(除氨甲喋呤、柳氮磺胺吡啶或羥氯喹外)；基線4週內關節內關節注射皮質類固醇；及基線6週內使用其他生物劑或調查性療法。

## 結果

總共82位患者參與：44位安慰劑患者對38位阿達木單抗患者。

82位全體患者中，80位(98%)患者完成24週之時期。未完成24週之時期的兩位患者來自於安慰劑組。治療組之間的基線特徵類似。基線人口分佈展示於下表1中。

表1基線人口分佈

	安慰劑(N=44)	阿達木單抗40 mg eow(N=38)
年齡(歲)	40.0	41.9
種族(%高加索)	42(95.5)	37(97.4)
性別(%男性)	36(81.8)	29(76.3)
體重(kg)	78.2	76.1
AS持續時間(年)	12.1	14.5
CRP(mg/dL)	2.3	1.8
NTX(nm/bce)	9.77	10.5
尿CTX-II濃度(ng/ml)	388.2	324.8
MMP-3(ng/ml)	57.1	25.3

該研究之全部患者中，CRP含量主要與基線之尿CTX-II、MMP3及NTX含量相關。CRP與尿CTX-II含量之間的相關性比CRP與MMP3及NTX含量之間的相關性高。基線之生物標記及CRP相關性展示於下表2中。

表2基線之生物標記及CRP相關性

在基線之全部患者	r=相關值(N, p-值)		
	尿CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.71(80, <0.001)	0.45(81, <0.001)	0.37(80, 0.001)
尿CTX-II	-	0.27(79, 0.015)	0.49(78, <0.001)

r=相關值

N=患者

在第12及24週，在阿達木單抗對安慰劑患者中存在尿CTX-II及MMP3濃度的顯著降低(展示於下表3中)，但NTX無顯著差異。

表3尿CTX-II及MMP3之顯著降低

生物標記	出診	阿達木單抗之變化(%)	安慰劑之變化(%)
尿CTX-II	12週	-76.8(-9.6)	43.8(22.2)
	24週	-64.7(3.2)	47.4(29.8)
MMP3	12週	-3.9(-12.3)	12.4(18.9)
	24週	-3.2(-8.6)	12.5(20.1)

如圖2中所示，在第12週及24週，與安慰劑相比，阿達木單抗患者之尿CTX-II含量經歷顯著減少。如圖3中所示，在第12週及24週，與安慰劑患者相比，阿達木單抗患者之MMP3含量亦經歷統計學上顯著之減少。在第12週及第24週，與安慰劑患者相比，阿達木單抗患者之CRP含量顯著減少(參見圖4)。

在阿達木單抗組中，CRP、尿CTX-II及MMP-3含量自基線至第12週的變化在統計學上顯著相關。注意到基線CRP與1)尿CTX-II( $r=0.71$ )、2)MMP3( $r=0.45$ )及3)NTX( $r=0.37$ ) ( $p\leq 0.001$ )之間顯著相關，以及尿CTX-II與NTX( $r=0.49$ ;  $p<0.0001$ )之間顯著相關。尿CTX-II及MMP3在十二週的變化明顯與CRP之變化相關( $r$ 分別等於0.40及0.43)( $p\leq 0.005$ )。此外，尿CTX-II在12週的變化明顯與MMP3之變化相關( $r=0.41$ ,  $p<0.0001$ )。在阿達木單抗組中，相關性分析證實CRP含量增加與尿CTX-II與MMP-3含量之減少相關聯。第12週CRP與生物標記自基線之變化之間的相關性展示於下表2中。

表4.第12週CRP與生物標記自基線之變化之間的相關性\*

安慰劑	R=相關值(N, p-值)		
	尿CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.21(42, 0.172)	0.34(44, 0.023)	0.08(43, 0.629)
尿CTX-II	--	0.45(42, 0.003)	0.27(41, 0.089)
阿達木單抗	尿CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.41(38, 0.010)	0.37(37, 0.024)	0.08(37, 0.620)
尿CTX-II	--	0.15(37, 0.375)	0.10(37, 0.540)

總而言之，在患有輕度至重度AS之患者中，阿達木單抗顯著抑制反映滑膜炎及軟骨基質退化之生物標記。阿達木單抗誘發對反映滑膜炎(MMP3)及軟骨基質退化(尿CTX-II)之生物標記的抑制，暗示阿達木單抗可減緩與AS關聯的結構損壞。此外，尿CTX-II及MMP3之變化明顯與CRP之變化相關聯。

均等案

熟習此項技術者只需使用常規實驗即可認識到或能夠確認本文中所述之本發明之具體實施例之多個均等案。該等均等案意欲由以下申請專利範圍涵蓋。本申請案中通篇所引用之所有文獻、專利及已公開之專利申請案的內容均以引用之方式併入本文中。

**【符號說明】**

(無)

## 【序列表】

## (1) SEQ ID NO: 1之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 107 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

## (v) 片段類型: 內部

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

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

## (2) SEQ ID NO: 2之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 121 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

## (v) 片段類型: 內部

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg



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

## (2) SEQ ID NO: 3之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 9 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

## (v) 片段類型: 內部

## (ix) 特徵:

- (A) 名稱/關鍵詞: 修飾位點
- (B) 位置: 9
- (D) 其他資訊: /註釋= "Xaa 為 Thr 或 Ala"

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

Gln	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Pro	Tyr	Xaa
1			5					

## (2) SEQ ID NO: 4之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 12 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(ix) 特徵:

(A) 名稱/關鍵詞: 修飾位點

(B) 位置: 12

(D) 其他資訊: /註釋= "Xaa 為 Tyr 或 Asn"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

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

(2) SEQ ID NO: 5之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 7 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
1                   5

(2) SEQ ID NO: 6之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 17 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
1                   5                   10                   15

Gly

(2) SEQ ID NO: 7之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 11 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
 1                                   5                                   10

## (2) SEQ ID NO: 8之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 5 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

Asp Tyr Ala Met His  
 1                                   5

## (2) SEQ ID NO: 9之資訊

## (i) 序列特徵:

- (A) 長度: 107 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
 1                                   5                                   10                                   15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
                                   20                                   25                                   30

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

## (2) SEQ ID NO: 10之資訊

## (i)序列特徵:

- (A) 長度 : 121 胺基酸  
 (B) 類型: 胺基酸  
 (D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: 肽

## (v) 片段類型: 內部

## (xi) 序列描述 : SEQ ID NO:10:

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

(2) SEQ ID NO: 11之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala  
1 5

(2) SEQ ID NO: 12之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala  
1 5

(2) SEQ ID NO: 13之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 14之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 15之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 16之資訊

(i)序列特徵:

(A) 長度 : 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 17之資訊

(i)序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

(ii)分子類型: 肽

(v)片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 18之資訊

(i)序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

(ii)分子類型: 肽

(v)片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn  
1 5

(2) SEQ ID NO: 19之資訊

(i)序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型: 胺基酸
- (D) 拓撲學: 線性

(ii)分子類型: 肽

(v)片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 20之資訊

(i)序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸

- (B) 類型:胺基酸
- (D) 拓撲學:線性

(ii) 分子類型:肽

(v) 片段類型:內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn  
1 5

(2) SEQ ID NO: 21之資訊

(i) 序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型:胺基酸
- (D) 拓撲學:線性

(ii) 分子類型:肽

(v) 片段類型:內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser  
1 5

(2) SEQ ID NO: 22之資訊

(i) 序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型:胺基酸
- (D) 拓撲學:線性

(ii) 分子類型:肽

(v) 片段類型:內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 23之資訊

(i) 序列特徵:

- (A) 長度 : 9 胺基酸
- (B) 類型:胺基酸
- (D) 拓撲學:線性



(i) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO: 23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 24之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(i) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO: 24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 25之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(i) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO: 25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr  
1 5

(2) SEQ ID NO: 26之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 9 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(i) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:26:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala  
1 5

(2) SEQ ID NO: 27之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度 : 12 長度

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:27:

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

(2) SEQ ID NO: 28之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度 : 12 長度

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO:28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys  
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 29之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度 : 12 長度

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

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

(2) SEQ ID NO: 30之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

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

(2) SEQ ID NO: 31之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 32之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr  
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 33之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 34之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 35之資訊

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓撲學: 線性

(ii) 分子類型: 肽

(v) 片段類型: 內部

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:35:

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

## (2) SEQ ID NO: 36之資訊

## (i) 序列特徵:

(A) 長度: 321 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 股型: 雙股

(D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: cDNA

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO:36:

```
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC    60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA    120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT    180
CGGTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT    240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG    300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A                                            321
```

## (2) SEQ ID NO: 37之資訊

## (i) 序列特徵:

(A) 長度: 363 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 股型: 雙股

(D) 拓撲學: 線性

## (ii) 分子類型: cDNA

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO:37:

```
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC    60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT    120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT    180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAT    240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG    300
TACCTTAGCA CCGCGTCTC CCTTFACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG    360
AGT                                                                363
```

## 申請專利範圍

1. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(ankylosing spondylitis；AS)的患者之之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量及/或滑膜炎生物標記之治療後含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之已知標準含量或該膠原蛋白降解生物標記之基線含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於AS關聯之滑膜炎生物標記之已知標準含量或該滑膜炎生物標記之基線含量。

2. 如請求項1之用途，其中該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。
3. 如請求項2之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
4. 如請求項1之用途，其中該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。
5. 如請求項4之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
6. 如請求項1之用途，其中該治療進一步包含：

測定由投予抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中C-反應性蛋白(C-reactive protein；CRP)之治療後含量；及

將該醫藥品投予患有AS之患者，其條件為該樣品中CRP之治療後含量低於與AS關聯之CRP之已知標準含量。

7. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治

療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量及/或滑膜炎生物標記之治療後含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於該與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之治療前含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於該滑膜炎生物標記之治療前含量。

8. 如請求項7之用途，其中該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。
9. 如請求項8之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
10. 如請求項7之用途，其中該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。
11. 如請求項10之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
12. 如請求項1或7之用途，其中該生物標記之含量係使用ELISA測定。
13. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由以該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分治療後之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之治療後含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II之治療後含量低於由該患有AS之患者獲得之CTX-II之治療前含量。

14. 如請求項13之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
15. 如請求項13之用途，其中該CTX-II之含量係使用ELISA測定。
16. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治

療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II的治療後含量低於與AS關聯之CTX-II的已知標準含量或CTX-II之基線含量。

17. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患有AS之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之含量及/或基質金屬蛋白酶3(MMP3)之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II的治療後含量低於與AS關聯之CTX-II之已知標準含量或CTX-II之基線含量，及/或該樣品中MMP3之治療後含量低於與AS關聯之MMP3之已知標準含量或MMP3之基線含量。

18. 一種抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供減少患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之含量及/或滑膜炎生物標記之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之已知標準含量或該膠原蛋白降解生物標記之基線含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於AS關聯之滑膜炎生物標記之已知標準含量或該滑膜炎生物標記之基線含



量。

19. 如請求項16或17之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
20. 如請求項16或17之用途，其中該CTX-II之含量係使用ELISA測定。
21. 如請求項17之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
22. 如請求項1至11及13至18中任一項之用途，其中該抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分。
23. 如請求項22之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-8}$  M或小於該數值之 $K_d$ 及 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於該數值之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離，且在標準活體外L929檢定中以 $1 \times 10^{-7}$  M或小於該數值之 $IC_{50}$ 中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性。
24. 如請求項22之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分具有以下特徵：
  - a)以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於該數值之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離；
  - b)具有輕鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列或修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列，該修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列係在位置1、4、5、7或8經單一丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9經1至5個保守胺基酸取代；
  - c)具有重鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列或修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列，該修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列係在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11經單一丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12經1至5個保守胺基酸取代。
25. 如請求項22之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分

包含具有輕鏈CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)，該輕鏈CDR3域包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列或在位置1、4、5、7或8經單一丙胺酸取代之修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列，及具有重鏈CDR3域重鏈可變區(HCVR)，該重鏈CDR3域包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11經單一丙胺酸取代之修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列。

26. 如請求項25之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分包含包括SEQ ID NO：1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)及包括SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)。
27. 如請求項26之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為阿達木單抗(adalimumab)。
28. 如請求項22之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為高麗木單抗(golimumab)。
29. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：  
測定由投予該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之含量及/或滑膜炎生物標記之含量；及  
將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之已知標準含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於與AS關聯之滑膜炎生物標記之已知標準含量。
30. 如請求項29之用途，其中該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。
31. 如請求項30之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
32. 如請求項29之用途，其中該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶

3(MMP3)。

33. 如請求項32之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
34. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之含量及/或滑膜炎生物標記之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之基線含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於與AS關聯之滑膜炎生物標記之基線含量。
35. 如請求項34之用途，其中該膠原蛋白降解生物標記為II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)。
36. 如請求項35之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
37. 如請求項34之用途，其中該滑膜炎生物標記為基質金屬蛋白酶3(MMP3)。
38. 如請求項37之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
39. 如請求項29或34之用途，其中該生物標記之含量係使用ELISA測定。
40. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由以該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分治療後之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II之治療後含量低於CTX-II之基線含量。

41. 如請求項40之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
42. 如請求項40之用途，其中該CTX-II之含量係使用ELISA測定。
43. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供治療患有關節黏連脊椎炎(AS)的患者之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II的治療後含量低於與AS關聯之CTX-II的已知標準含量。
44. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供減少患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患者獲得的樣品中膠原蛋白降解生物標記之含量及/或滑膜炎生物標記之含量；及

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中膠原蛋白降解生物標記之治療後含量低於與AS關聯之膠原蛋白降解生物標記之已知標準含量，及/或該樣品中滑膜炎生物標記之治療後含量低於與AS關聯之滑膜炎生物標記之已知標準含量。
45. 一種人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製備供減少患者中與關節黏連脊椎炎(AS)關聯之結構損壞之醫藥品，該治療包含：

測定由投予該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分後之患有AS之患者獲得的樣品中II型膠原蛋白C-端肽(CTX-II)之含量及基質金屬蛋白酶3(MMP3)之含量；及

將該樣品中CTX-II的含量及MMP3之含量與CTX-II之基線含量

及MMP3之基線含量比較，

將該醫藥品投予該患有AS之患者，其條件為該樣品中CTX-II之治療後含量低於與AS關聯之CTX-II之基線含量，及/或該樣品中MMP3之治療後含量低於與AS關聯之MMP3之基線含量。

46. 如請求項43或45之用途，其中該CTX-II為尿CTX-II。
47. 如請求項43或45之用途，其中該CTX-II之含量係使用ELISA測定。
48. 如請求項45之用途，其中該MMP3為血清MMP3。
49. 如請求項29至38及40至45中任一項之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-8}$  M或小於該數值之 $K_d$ 及 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於該數值之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離，且在標準活體外L929檢定中以 $1 \times 10^{-7}$  M或小於該數值之 $IC_{50}$ 中和人類TNF $\alpha$ 細胞毒性。
50. 如請求項29至38及40至45中任一項之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分具有以下特徵：
  - a)以由表面電漿共振所測定之 $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ 或小於該數值之 $K_{off}$ 速率常數與人類TNF $\alpha$ 解離；
  - b)具有輕鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列或修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列，該修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列係在位置1、4、5、7或8經單一丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9經1至5個保守胺基酸取代；
  - c)具有重鏈CDR3域，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列或修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列，該修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列係在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11經單一丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12經1至5個保

守胺基酸取代。

51. 如請求項29至38及40至45中任一項之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分包含具有輕鏈CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)，該輕鏈CDR3域包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列或在位置1、4、5、7或8經單一丙胺酸取代之修飾自SEQ ID NO：3之胺基酸序列，及具有重鏈CDR3域重鏈可變區(HCVR)，該重鏈CDR3域包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列或在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11經單一丙胺酸取代之修飾自SEQ ID NO：4之胺基酸序列。
52. 如請求項51之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分包含包括SEQ ID NO：1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)及包括SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)。
53. 如請求項52之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為阿達木單抗(adalimumab)。
54. 如請求項29至38及40至45中任一項之用途，其中該人類抗TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部分為高麗木單抗(golimumab)。

圖式

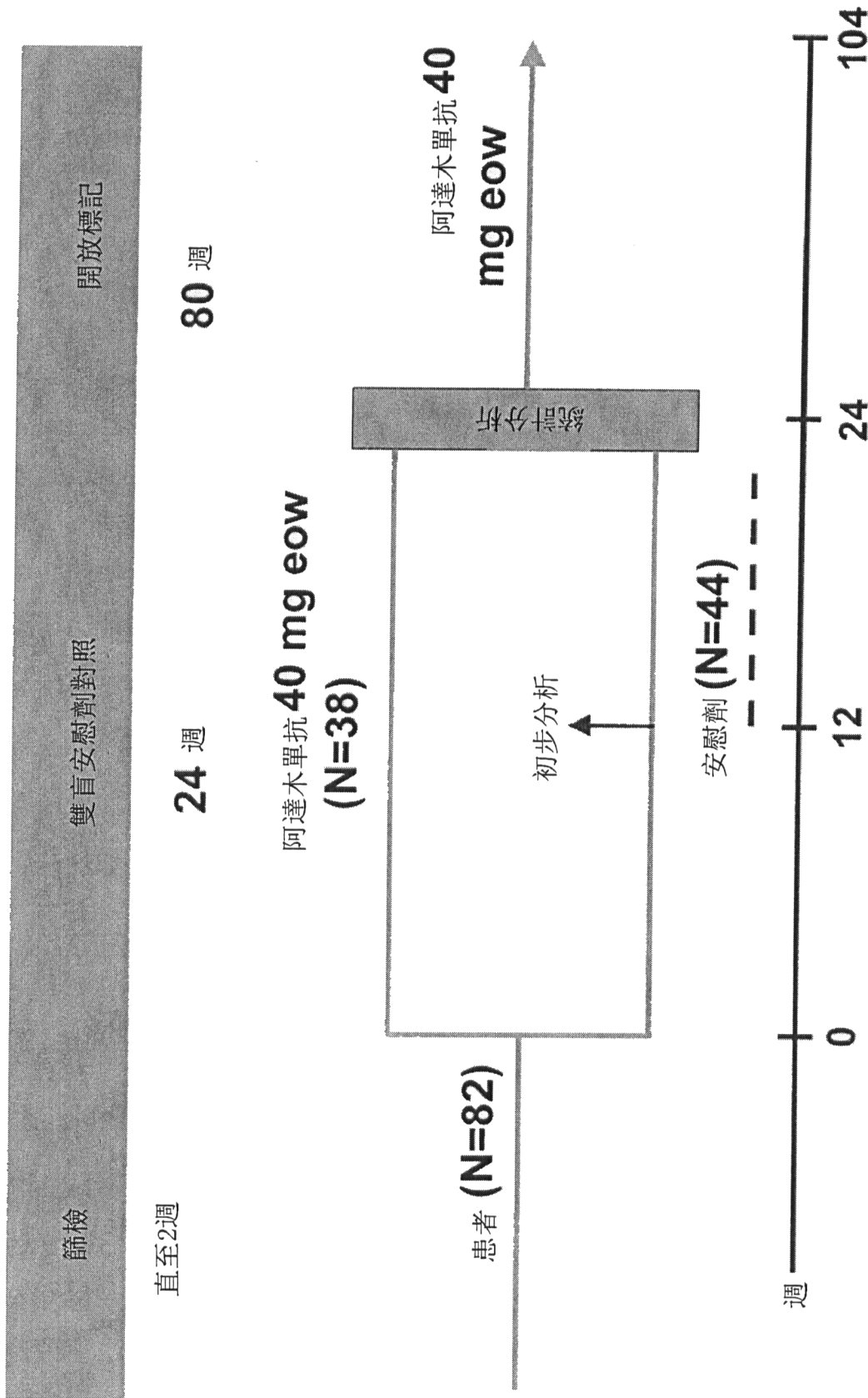
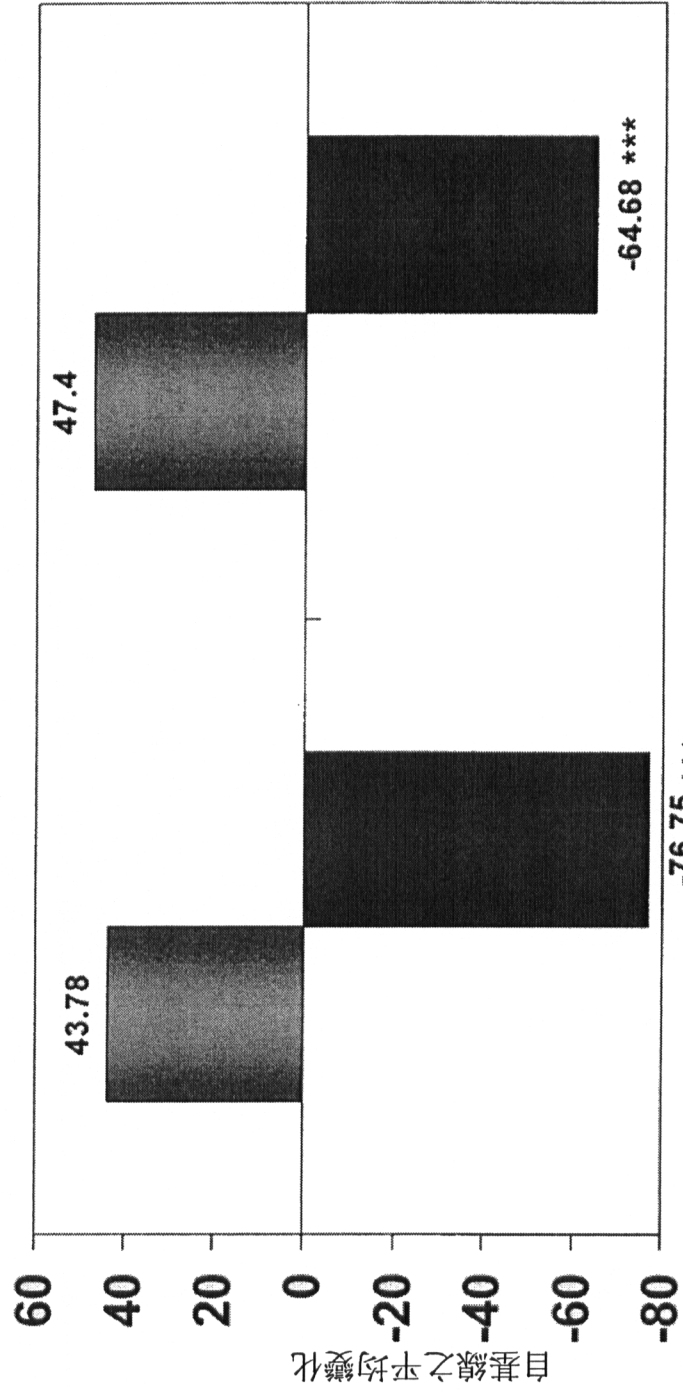


圖1

----- 在第12、16、20週之早期逃避選擇

第12及24週之CTX-II濃度變化†

■ 安慰劑      ■ 阿達木單抗



週 12

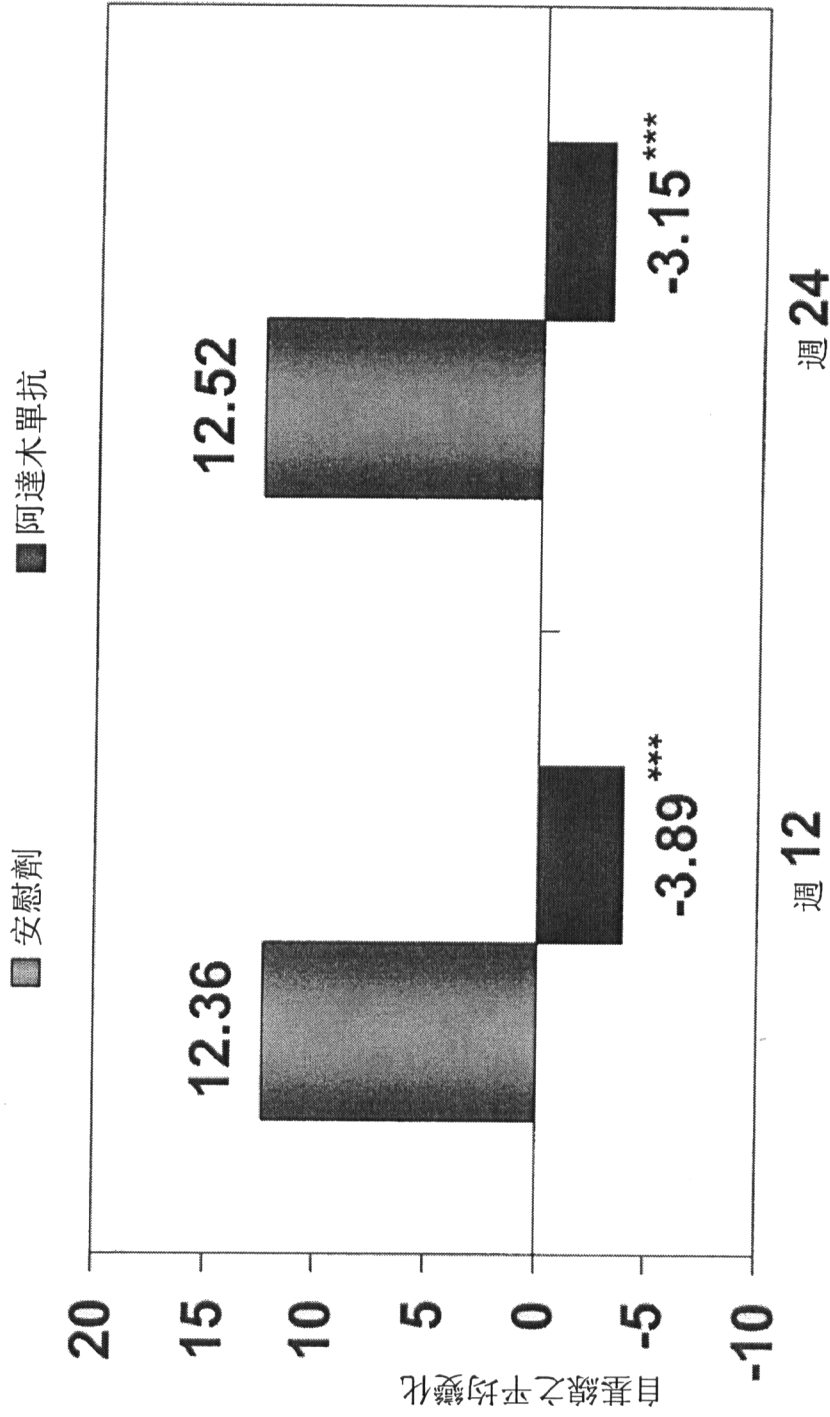
週 24

† LOCF調整平均值 \*\*\*p=0.001水準時統計學上有效，阿達木單抗對安慰劑

圖2

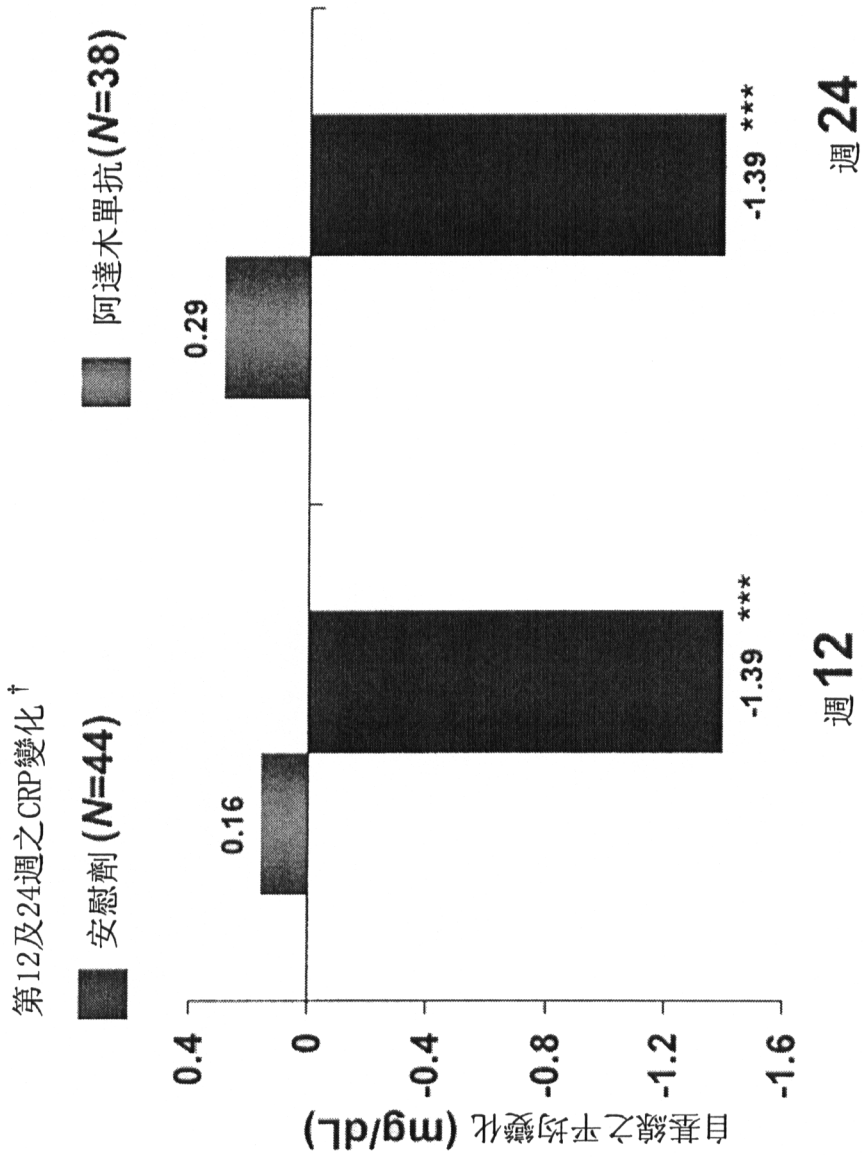


第12及24週之MMP3濃度變化†



† LOCF調整平均值 \*\*\*p=0.001水準時統計學上有效, 阿達木單抗對安慰劑

圖3



<sup>†</sup> LOCF調整平均值 \*\*\*p=0.001水準時統計學上有效。療法與ANCOVA之間的差之p值

圖4