



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102215867 B

(45)授权公告日 2017.04.19

(21)申请号 200980143326.7

(22)申请日 2009.08.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102215867 A

(43)申请公布日 2011.10.12

(30)优先权数据

PCT/EP2009/052811 2009.03.10 EP

PCT/EP2009/052809 2009.03.10 EP

PCT/EP2009/052810 2009.03.10 EP

0817810.5 2008.09.29 GB

0817811.3 2008.09.29 GB

0817809.7 2008.09.29 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/061210 2009.08.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/034590 EN 2010.04.01

(73)专利权人 生物测试股份公司

地址 德国德赖艾希

(72)发明人 弗兰克·奥斯特罗斯

西尔克·艾格纳

克里斯托夫·尤尔克

安德里亚·瓦滕贝格-德曼特

阿纳托利·鲁德涅夫

迈克尔·索尔丹

克里斯托夫·布鲁切尔

本杰明·德尔肯 尚塔尔·祖伯

格雷戈尔·舒尔茨

尼古拉斯·蔡洛特

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

(56)对比文件

W0 2004/083247 A1,2004.09.30,摘要、权利要求1-2、实施例3-4、图3,4,9.

CN 101031305 A,2007.09.05,全文.

Michael R. Ehrenstein等.Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy.《J.Exp.Med.》.2004,第200卷(第3期),277-285.

Michael R. Ehrenstein等.Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy.《J.Exp.Med.》.2004,第200卷(第3期),277-285.

审查员 张蕾

权利要求书3页 说明书11页

序列表10页 附图7页

(54)发明名称

疾病治疗用组合物

(57)摘要

本发明提供包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤的药物组合物和试剂盒,以及利用所述药物组合物和试剂盒的治疗方法和医学用途。

1. 一种药物组合物,所述药物组合物包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

2. 一种试剂盒,所述试剂盒分开地包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述人源化抗-CD4抗体适于胃肠外施用。

4. 如权利要求3所述的药物组合物或试剂盒,其中所述人源化抗-CD4抗体适于肌肉内、静脉内或皮下施用。

5. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述甲氨蝶呤适于口服、肌肉内、静脉内或皮下施用。

6. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述人源化抗-CD4抗体具有V结构域,所述V结构域由以下多肽序列限定:

-H链V结构域:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTIS
RDDSKNTVYLLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)

-L链V结构域:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGT
DFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:2)。

7. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中将所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体用于静脉内施用,并且以0.5ml~500ml的剂量体积提供或以用于稀释至0.5ml~500ml的剂量体积的形式提供。

8. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体适于提供0.5ml~1.5ml的剂量体积或以0.5ml~1.5ml的剂量体积提供。

9. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体适于提供15ml~25ml的剂量体积或以15ml~25ml的剂量体积提供。

10. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体适于皮下或肌肉内施用,并且以0.1ml~3ml的剂量体积提供。

11. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体适于作为单剂量使用。

12. 如权利要求1或2所述的药物组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述人源化抗-CD4抗体适于作为多次剂量的一部分使用。

13. 如权利要求12所述的药物组合物或试剂盒,其中每周施用所述多次剂量中的每一剂量。

14. 能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤在制备在治疗患者中的风湿性疾病时同时、分开或依次使用的组合制剂中的应用,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

15. 能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体在制备用于治疗患者中的风

湿性疾病的药物中的应用,其中所述患者正在经受甲氨蝶呤治疗,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

16. 甲氨蝶呤在制备用于治疗患者中的风湿性疾病的药物中的应用,其中所述患者正在经受使用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体的治疗,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

17. 如权利要求14~16中任一项所述的应用,其中所述风湿性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型类风湿性关节炎和强直性脊柱炎。

18. 如权利要求17所述的应用,其中所述风湿性疾病是类风湿性关节炎。

19. 能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤在制备在治疗患者中的类风湿性关节炎时同时、分开或依次使用的组合制剂中的应用,所述患者对于使用疾病调节性抗风湿药(DMARD)进行治疗无响应,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

20. 如权利要求19所述的应用,其中所述DMARD是甲氨蝶呤。

21. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中胃肠外施用所述人源化抗-CD4抗体。

22. 如权利要求21所述的应用,其中肌肉内、静脉内或皮下施用所述人源化抗-CD4抗体。

23. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中以口服、肌肉内、静脉内或皮下施用所述甲氨蝶呤。

24. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中以0.2mg~10mg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

25. 如权利要求24所述的应用,其中以0.2mg~5mg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

26. 如权利要求25所述的应用,其中以0.5mg~3mg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

27. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中以2 μ g/kg~150 μ g/kg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

28. 如权利要求27所述的应用,其中以2 μ g/kg~75 μ g/kg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

29. 如权利要求28所述的应用,其中以5 μ g/kg~45 μ g/kg的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

30. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中以0.1mg/m²患者体表面积~5mg/m²患者体表面积的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

31. 如权利要求30所述的应用,其中以0.1mg/m²患者体表面积~2.5mg/m²患者体表面积的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

32. 如权利要求31所述的应用,其中以0.25mg/m²患者体表面积~1.5mg/m²患者体表面积的量对所述患者施用所述人源化抗-CD4抗体。

33. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中对患者施用单剂量的所述人源化抗-CD4抗体。

34. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中对患者施用多次剂量的所述人源化抗-CD4抗体。

35. 如权利要求34所述的应用,其中至多每周施用所述人源化抗-CD4抗体和/或甲氨蝶呤。

36. 如权利要求35所述的应用,其中每两周、每三周或每四周施用所述人源化抗-CD4抗体和/或甲氨蝶呤。

37. 如权利要求14~16和19中任一项所述的应用,其中所述组合制剂或药物还包含适于治疗所述疾病的额外治疗剂,所述额外治疗剂选自非甾体抗炎药、抗炎性甾体、金化合物、抗疟疾药、叶酸、环孢霉素、来氟米特、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、d-青霉胺、环磷酰胺、麦考酚酯、二甲胺四环素和苯丁酸氮芥。

38. 用于在医药中同时、分开或依次使用的作为组合制剂的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤,其中所述人源化抗-CD4抗体包含小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)。

39. 如权利要求14~16、19和38中任一项所述的应用,其中所述人源化抗-CD4抗体具有V结构域,所述V结构域由以下多肽序列限定:

-H链V结构域:

EEQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYVLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)

-L链V结构域:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)。

40. 权利要求1~13中任一项所述的、包含所述人源化抗-CD4抗体和甲氨蝶呤的药物组合物或试剂盒在制备用于治疗患者中的风湿性疾病的药物中的应用。

疾病治疗用组合物

[0001] 本发明涉及风湿性疾病的治理。本发明涉及一种高度有效的药物组合物,所述药物组合物包含诸如人源化单克隆抗体等能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和药物甲氨蝶呤。本发明的组合物和试剂盒对于治理类风湿性关节炎特别有效。本发明涉及包含上述试剂和甲氨蝶呤的药物组合物或试剂盒,以及使用上述组合物和试剂盒的应用和治理方法。

[0002] 风湿性疾病是一类影响结缔组织、特别是关节和相关结构的疾病,其特征在于炎症、变性或代谢紊乱。风湿性疾病的实例是类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型类风湿性关节炎和强直性脊柱炎。

[0003] 类风湿性关节炎是引起关节和周围组织的慢性炎症的自体免疫疾病,还能够影响其它组织或身体器官。当正常时对自体组织具有耐受性的T细胞识别“自身”分子(即,由宿主细胞产生的分子)并与其反应时,发生该疾病。通过由抗原呈递细胞(APC)加工的自体抗原的呈递而使“自体反应性”T细胞激活,所述激活引起T细胞的克隆性扩增并迁移到特定组织,在所述特定组织中所述T细胞诱导炎症和组织破坏。

[0004] 目前可获得大量用于类风湿性关节炎的治理,包括划分为非甾体抗炎药(NSAID)的用于控制疼痛和炎症的一线药物,例如阿司匹林、布洛芬、萘普生等。关节炎的次级治理包括皮质类固醇(例如泼尼松和地塞米松),其是身体皮质酮激素的合成形式,缓慢地起抗风湿药(SAARD)或疾病调节性抗风湿药(disease-modifying anti-rheumatic drug, DMARD)的作用,所述抗风湿药(SAARD)或疾病调节性抗风湿药(DMARD)例如羟基氯喹、柳氮磺吡啶、甲氨蝶呤、青霉胺、环磷酰胺、金盐、硫唑嘌呤、来氟米特等。

[0005] 许多新诊断有RA的患者开始使用诸如甲氨蝶呤(MTX)等DMARD。MTX(4-氨基-N10-甲基蝶酰基谷氨酸)是叶酸的类似物,已知MTX阻碍一种叶酸形式的产生,该叶酸形式对于活跃生长中的细胞例如见于皮肤、血液、胃肠组织中的细胞和参与免疫系统的细胞等较重要。尚未完全清楚MTX如何降低RA的严重性,但是,据认为其在抗炎作用中起作用,并且对于其作用已经提出许多药理学机制,包括抑制嘌呤合成、促进腺苷释放、抑制促炎症细胞因子的产生和调节炎症(Swierkot等,2006)。还已知MTX抑制例如称为二氢叶酸还原酶(DHFR)的酶的活性,并且干预几种其它酶。

[0006] 用于治理RA的另一组药物称为生物响应调节剂(BRM),其包括单克隆抗体。其实例是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的拮抗剂,例如阿达木单抗、英利昔单抗和依那西普,其通过与TNF- α 受体结合而起作用或通过直接与TNF- α 蛋白自身结合而起作用。FDA已经批准几种TNF- α 抑制剂用于治理类风湿性关节炎,包括阿达木单抗(Humira®)、英利昔单抗(Remicade®)和依那西普(Enbrel®)。TNF- α 代表类风湿性关节炎中的关键介导体,并且主要由RA患者滑膜内的激活的巨噬细胞产生。TNF α 充当促炎症细胞因子,大量地存在于RA患者的滑膜组织中。其诱导趋化因子的产生和释放,所述趋化因子将白细胞从血液吸引到炎症组织中(Tracey等,2008)。除了介导滑膜炎症之外,TNF α 参与关节破坏和软骨降解。另外,其能够抑制CD4+CD25+调节性T细胞的抑制活性(Andersson等,2008)。

[0007] 在某些情况下用以上讨论的药物的组合治理RA患者。特别地,DMARD经常用作第一

治疗药物。但是,可能期望在未实现疾病控制的患者中将其与最近批准的治疗药物组合(如TNF- α 拮抗剂等生物试剂)使用。据报道与单独的MTX治疗相比,MTX与某些单克隆抗体(依那西普、英利昔单抗、阿达木单抗和anakinra)的组合产生更好的疗效(Swierkot等,2006)。但是,MTX发挥多种药理学作用,并且其临床效果可能归因于多种靶标(Wessels等,2008)。因此,不易于预测MTX如何影响作为单独试剂有效的药物的治疗活性以及由此影响效力。

[0008] 虽然目前存在各种可利用药物,但不是所有患者都对以上治疗响应良好,存在许多不利的副作用。例如,TNF- α 治疗下调免疫系统,使得受治疗患者更易受感染和疾病影响。因此,仍然存在对于开发备选治疗的需要。

[0009] 通常认同的是,CD4⁺T细胞在启动和维持自体免疫上起主要作用。因此,已经提出使用针对CD4⁺T细胞表面分子的mAb、特别是抗-CD4mAb,作为在治疗诸如类风湿性关节炎等疾病中的免疫抑制剂。

[0010] 进一步研究的一个实例是抗-CD4 B-F5抗体(小鼠IgG1抗人CD4),已经在不同的自体免疫疾病中对其进行了测试。类风湿性关节炎患者中,在使用B-F5每日给药的安慰剂对照的试验中观察到的结果未表现出显著的改善(Wendling等,J Rheumatol;25(8):1457-61,1998)。但是,在WO 2004/083247中,开发出与亲本小鼠B-F5具有相似CD4结合性质的人源化B-F5(下文中称为hB-F5或BT061)抗体。对于小鼠B-F5抗体的人源化形式对还接受非甾体抗炎药双氯芬酸的患者的作用的初步评价为有效的免疫抑制指示出有效的免疫抑制,该有效的免疫抑制由使用10天治疗时所述患者中的阳性临床效果所反映。

[0011] 该研究还由Wijdenes等在2005年6月的EULAR会议上提出的摘要和海报中描述。它们描述了每隔一天进行5次5mg hB-F5静脉内输注并伴随以150mg双氯酚酸对11名罹患类风湿性关节炎的患者进行治疗(Wijdenes等,摘要和海报,EULAR会议,2005年6月)。

[0012] 在WO 2004/083247中,注意到所述抗体能够激活CD4⁺T细胞的特定亚类,即CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Tregs)。这些细胞占外周CD4⁺T细胞的5%-10%,并且一旦经刺激,能够竞争性抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的响应,以及抑制B-细胞激活和克隆扩增。因此这些细胞代表免疫系统中控制的重要水平。特别是,CD4⁺CD25⁺Treg细胞参与维持外周中的免疫稳态,和调节自体免疫性和病原性免疫响应。

[0013] 经由激活CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的机制对类风湿性关节炎进行治疗代表了研究的重要途径,并且在国际专利申请第PCT/EP2009/052809号、第PCT/EP2009/052811号和第PCT/EP2009/052810号中讨论了对罹患类风湿性关节炎的患者在II期临床试验中使用hB-F5试剂。

[0014] 但是,不易于预测任一新型治疗是否能够成功地与当前的治疗组合从而给出有益的疗效。如上所述,特别对于MTX情况正是如此。

[0015] 几个研究已经报道了表明MTX对调节性T细胞具有负面效应的发现,因此可能防止将MTX用于与依赖于激活CD4⁺CD25⁺调节性T细胞作为其治疗机制的试剂一起进行组合治疗。Wascher等(1994)和Herman等(2005)报道了表明MTX可以减少可利用的T淋巴细胞的数量。Wascher等报道施用高剂量的MTX(静脉内给药12周)显著地减少了总的外周血淋巴细胞($P<0.01$),并且引起淋巴细胞亚类的明显重新分布,对B淋巴细胞($P<0.005$)和T淋巴细胞($P<0.05$)具有优先的减少效果。Herman等,2005报道了在反映对RA患者的低剂量治疗(7.5mg)的浓度时,MTX在体外对T淋巴细胞的凋亡诱导效应。

[0016] 另外,由Porter等,2006等进行的体外研究报道了MTX对调节性T细胞的活力的影响。在50nM的体外浓度(分析的最高浓度)时,Treg细胞的抑制活性显著减少94%~88% ($p < 0.05$)。这表明MTX的存在可以抑制Treg的抑制作用。

[0017] 另外,Yamaguchi等,2007报道了天然Treg细胞组成型地表达大量的叶酸盐受体4(FR4)。由于MTX是叶酸盐类似物,这表明MTX也可以被Tregs细胞吸收。所述吸收可能导致干扰该细胞群中的代谢。

[0018] 此外,已知许多抗体的治疗活性受位于Fc受体表达细胞上的Fc受体影响。某些受体甚至需要与位于Fc受体表达细胞上的Fc受体结合以具有活性。但是,已知MTX治疗在体内引起单核细胞上Fc γ R1表达的降低(Wijngaarden等,2004/2005)。还已经在用MTX和治疗性抗-TNF- α 抗体英利昔单抗进行治疗的患者中证明了MTX对位于单核细胞上的Fc受体表达的减少效果(Wijngaarden等,2008)。结果,通常认为MTX对Fc受体结合抗体的活性具有负面效应。因此,预期MTX会对抗体激活Tregs的能力具有负面效应。

[0019] 综上所述,预期MTX会对诸如hB-F5等经由CD4+CD25+调节性T细胞的激活而起作用的试剂的治疗能力具有负面影响。由此,可以看出不能预测组合治疗途径的结果。

[0020] 考虑上述现有技术,本发明的目的在于开发用于治疗类风湿性关节炎的其他的、经改善的药物组合物。

[0021] 因此,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。本发明还提供了一种试剂盒,所述试剂盒分开地包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。

[0022] 本发明人出人意料地发现,能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤的组合具有治疗效应,并且在减少抗体相关的副作用方面具有令人惊奇的优点。该组合在实现高水平的治疗效果的速度方面也具有令人惊奇的优点。

[0023] 因此,本发明还提供一种治疗患者中风湿性疾病的方法,所述方法包括步骤(a)施用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和步骤(b)施用甲氨蝶呤,其中所述步骤(a)和步骤(b)能够同时进行、分开进行或依次且以任何顺序进行。

[0024] 另外,本发明提供一种治疗正在经受甲氨蝶呤治疗的患者中的风湿性疾病的方法,所述方法包括施用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂的步骤。作为另一种选择,本发明提供一种治疗正在经受使用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂的治疗的患者中的风湿性疾病的方法,所述方法包括施用甲氨蝶呤的步骤。

[0025] 此外,本发明提供一种治疗对于使用疾病调节性抗风湿药(DMARD)进行治疗无响应的患者中的类风湿性关节炎的方法,所述方法包括步骤(a)施用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和步骤(b)施用甲氨蝶呤,其中所述步骤(a)和步骤(b)能够同时进行、分开进行或依次且以任何顺序进行。

[0026] 另外,本发明提供用于在医药中同时、分开或依次使用的作为组合制剂的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。一方面,本发明提供在治疗风湿性疾病中同时、分开或依次使用的作为组合制剂的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。在另一方面,本发明提供了用于治疗患者中的风湿性疾病的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂,其中所述患者正在经受甲氨蝶呤治疗。在再一方面,本发明提供一种用于治疗患者中的风湿性疾病的包含甲氨蝶呤的组合物,其中所述患者正在经受使用能够激活

CD4+CD25+调节性T细胞的试剂的治疗。

[0027] 在又一方面,本发明提供了在治疗对于使用疾病调节性抗风湿药(DMARD)进行治疗无响应的患者中的风湿性疾病中同时、分开或依次使用的作为组合制剂的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。

[0028] 参照以下附图,仅借助于实例对本发明进行说明,其中:

[0029] 图1显示了实施例1中使用取自两个供体(实验1和实验2)的CD4+CD25+调节性T细胞进行的体外增殖测试的结果。

[0030] 图2A和图2B显示了与Keystone等(2004)和(2009)公布的III期试验中报道的最有效剂量组中的患者相比,在实施例2所述的临床试验过程中实现至少ACR 20分数的患者的百分比的图。图2B中的图是经安慰剂校正的。

[0031] 图3A和图3B显示了与Keystone等(2004)和(2009)公布的III期试验中报道的最有效剂量组中的患者相比,在实施例2所述的临床试验过程中实现至少ACR 50分数的患者的百分比的图。图3B中的图是经安慰剂校正的。

[0032] 图4A和图4B显示了与Keystone等(2004)和(2009)公布的III期试验中报道的最有效剂量组中的患者相比,在实施例2所述的临床试验过程中实现至少ACR 70分数的患者的百分比的图。图4B中的图是经安慰剂校正的。

[0033] 图5显示了编码人源化B-F5的V_H区的质粒的片段的核苷酸序列(SEQ ID No:3)。编码V区的序列以下划线示出,并且相应的多肽序列(SEQ ID No:15)在核苷酸序列之下标出。

[0034] 图6显示了编码人源化B-F5的V_K区的质粒的片段的核苷酸序列(SEQ ID No:4)。编码V区的序列下划线示出,并且相应的多肽序列(SEQ ID No:2)在核苷酸序列之下标出。

[0035] 图7显示了在设计B-F5的人源化形式(即BT061)时,对小鼠B-F5V_K(SEQ ID No:6)、FK-001(SEQ ID No:7、8、9和10)、L4L(SEQ ID No:16)和L4M(SEQ ID No:2)的多肽序列进行的比对。

[0036] 图8显示了在设计B-F5的人源化形式时,对小鼠B-F5 V_H(SEQ ID No:5)、M26(SEQ ID No:11、12、13和14)、H37L(SEQ ID No:1)和H37V(SEQ ID No:15)的多肽序列进行的比对。

[0037] 如上所述,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。本发明还提供了一种试剂盒,所述试剂盒分开地包含能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤。

[0038] 所述能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和甲氨蝶呤可以为单一制剂形式或分开的制剂的形式。所述制剂可以由所述试剂和/或甲氨蝶呤组成。作为另一种选择,所述制剂可以包含所述试剂和/或甲氨蝶呤,并且还包含药物可接受成分,例如载剂或赋性剂。

[0039] 在本发明的一方面,所述试剂和/或甲氨蝶呤适合于胃肠外施用,优选肌肉内、静脉内或皮下施用。最优选的是,所述试剂和/或甲氨蝶呤适于皮下施用。

[0040] 在本发明该方面的一个实施方式中,所述试剂和/或甲氨蝶呤适合于静脉内施用,并且以0.5ml~500ml的剂量体积(dosage volume)提供或以用于稀释到0.5ml~500ml的剂量体积的形式提供。在另一个实施方式中,所述组合物适于皮下或肌肉内施用,并且以0.1ml~3ml的剂量体积提供。作为另一种选择,所述试剂和/或甲氨蝶呤适于提供0.5ml~1.5ml或者15ml~25ml的剂量体积。

[0041] 在另一方面,甲氨蝶呤适合于口服施用,并且可以为片剂形式。

[0042] 在本发明的其他方面,所述组合物或试剂盒可以适于作为单剂量使用,或适于作为多次剂量的一部分使用,特别是当每周一次、每两周一次、每四周一次、每六周一次或每八周一次施用所述剂量时。

[0043] 在该方面的一个实施方式中,本发明的试剂盒包含多个单独剂量的试剂和甲氨蝶呤。在另一方面,提供一种剂量包 (dosage pack),所述剂量包包含多个单独的经包装剂量的所述药物组合物。

[0044] 在一个具体实施方式中,所述试剂(可选地和甲氨蝶呤)适于皮下施用并且以易施用形式(ready for administration form)提供,所述易施用形式不需要稀释,因此它们可以容易地由非医务人员施用。

[0045] 适于在本发明中使用的试剂是能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂。所述试剂可以是多肽、蛋白质或抗体。当所述试剂是抗体时,其可以是单克隆抗体。优选的是,所述抗体是单克隆抗-CD4抗体。所述抗体还可以优选IgG1抗体,并且可以是未经修饰的IgG1抗体。

[0046] 最适于在本发明中使用的抗体是能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的人源化抗-CD4抗体、或者其片段或衍生物。能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的抗体的实例在Becker等,(European Journal of Immunology (2007),第37卷:第1217-1223页)中讨论,并描述于WO 2004/083247中。

[0047] 通常本发明中使用的抗体包含一个或多个能够与CD4结合的可变域。所述抗体可以包含人类恒定区(Fc)。该恒定区可以从来自任一类免疫球蛋白(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和任一同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的恒定域中选择。优选的恒定区选自IgG的恒定域,特别是IgG1的恒定域。

[0048] 本发明还包括所述抗体的任何片段。所述片段优选包含所述抗体的抗原结合区或V区,并且具体而言是Fab、Fab'、F(ab)'₂、Fv和scFv片段。

[0049] 在本发明的特别优选的方面,所述抗体是源自小鼠单克隆抗-CD4抗体B-F5的人源化抗-CD4抗体或者其片段或衍生物。所述抗体可以是包含含有小鼠单克隆抗体B-F5的互补决定区(CDR)的序列的人源化抗-CD4抗体,所述序列中可选地具有不显著影响抗体特异性和/或其亲和性的变异。

[0050] 抗体的实例在WO 2004/083247中提供,在WO 2004/083247中公开了小鼠B-F5抗体的几个人源化形式的制备。特别地,WO 2004/083247公开了制备具有V结构域的人源化抗体BT061(hB-F5),所述V结构域由以下多肽序列限定:

[0051] -H链V结构域:

[0052] EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA

[0053] PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYVYLMNSLKTEDTAV

[0054] YYCSAS YYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)

[0055] -L链V结构域:

[0056] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYIYWYQQ

[0057] KPGQPPKLLIYLAILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:2) .

[0058] 该抗体的衍生物也适于在本发明中使用。衍生物包括具有由与SEQ ID NO:1或SEQ

ID NO:2具有至少80%、优选至少90%、最优选至少95%序列同一性的多肽序列所限定的V结构域的衍生物。

[0059] 特别优选的抗体是包含小鼠B-F5 mAb的互补决定区(CDR)并且保持hB-F5激活CD4+CD25+调节性T细胞的能力的抗体。在V_H和V_K结构域内CDR的位置示于图7和图8。所述抗体在CDR序列中可以可选地具有不显著影响结合特异性和/或结合亲和性的变异。

[0060] 通常而言,本发明中使用的抗体还包含人类恒定区(Fc)。该恒定区可以选自上述恒定域。

[0061] 本发明还包括hB-F5抗体的包含其V区的任何片段或其衍生物。所述片段特别包含Fab、Fab'、F(ab)'₂、Fv和scFv片段。

[0062] 为了制备所述hB-F5抗体,可以将编码BT061抗体的H链或L链的V结构域的多核苷酸与编码人类H链或L链的恒定区的多核苷酸融合。出于表达以此方式获得的完整H链和L链的目的,还可以添加对允许分泌所述蛋白的信号肽进行编码的序列。

[0063] 在表达载体内将上述多核苷酸与合适的控制序列连接,所述控制序列允许在所选宿主细胞中调节该多核苷酸的转录和翻译。可以通过公知的重组DNA和遗传工程技术获得这些重组DNA构建体,并将其引入宿主细胞。

[0064] 有用的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。合适的真核细胞中,举例而言,可以举出植物细胞、诸如酵母菌等酵母细胞、诸如果蝇或夜蛾(Spodoptera)等昆虫细胞和诸如HeLa、CHO、3T3、C127、BHK、COS等哺乳动物细胞。

[0065] 本发明中利用的BT061(hB-F5)抗体可以通过以下方式获得:在适于所述抗体表达的条件下,培养含有包含编码所述抗体的核酸序列的表达载体的宿主细胞,和从所述宿主细胞培养物回收所述抗体。

[0066] 本发明的另一方面是如下方法,所述方法包括制备包含所述试剂和甲氨蝶呤的试剂盒或药物组合物。

[0067] 如上所述,本发明还提供治疗罹患风湿性疾病或易受风湿性疾病影响的患者的医学用途和方法。特别地,在一个方面,本发明提供了一种治疗患者中风湿性疾病的方法,所述方法包括步骤(a)施用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和步骤(b)施用甲氨蝶呤,其中所述步骤(a)和步骤(b)可以同时、分开进行或依次且以任何顺序进行。在该方面的一个实施方式中,步骤(a)和步骤(b)在同一天进行。在该方面的另一实施方式中,步骤(a)和步骤(b)在同一周内进行。

[0068] 在另一个方面,本发明提供了治疗正在经受甲氨蝶呤治疗的患者中的风湿性疾病的方法,所述方法包括施用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂的步骤,并且本发明提供了治疗正在经受使用能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂的治疗的患者中的风湿性疾病的方法,所述方法包括施用甲氨蝶呤的步骤。

[0069] 风湿性疾病被定义为影响结缔组织、特别是关节和相关结构的疾病,特别是其特征在于炎症、变性或代谢紊乱。在本发明的优选方面,所述风湿性疾病是类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型类风湿性关节炎或强直性脊柱炎。

[0070] 优选对类风湿性关节炎的治疗。关于类风湿性关节炎可以使用ACR评分评估治疗的临床功效。

[0071] ACR评分是由美国风湿病学院(ACR)提供的对受治疗患者所表现出的类风湿性关

节炎进行评估的方法,并且通过对核心的参数组进行测定而完成(Felson等,Arthritis&Rheumatism,1995,38(6),727-735)。该系统将值ACR 20定义为触痛关节和肿胀关节计数方面的至少20%改善,以及5个其余ACR核心组量度中的3个方面的至少20%的改善:患者和医师全面评估、疼痛、残疾和诸如C-反应性蛋白(CRP)或红细胞沉降速率(ESR)等急性期反应物。类似地,ACR 50和ACR 70分数分别定义了至少50%和至少70%的改善。

[0072] 在本发明另一方面,可以对对于使用疾病调节性抗风湿药(DMARD)进行治疗无响应的患者施用所述治疗。无响应者是对使用DMARD的治疗显示不足的响应的患者。特别地,如果他/她具有持续的临床活性类风湿性关节炎,例如如果药物在患者中未实现ACR20、或未实现对关节的结构损伤的进展进行抑制、或如果在治疗期间对药物的起始响应随着时间的流逝而丧失,则所述患者显示出不足的响应。

[0073] DMARD的实例例如为羟基氯喹、柳氮磺吡啶,甲氨蝶呤、青霉胺、环磷酰胺、金盐、硫唑嘌呤、来氟米特等。

[0074] 如上所述,可以以任何合适的方式对患者施用所述试剂和甲氨蝶呤。特别地,可以将其在胃肠外施用,例如通过静脉内、肌肉内或皮下注射施用。对于所述试剂的施用,特别优选静脉内或皮下施用。另外,可以口服施用甲氨蝶呤。

[0075] 所述试剂和/或甲氨蝶呤的剂量体积可以根据施用方法而变化。当通过静脉内输注施用所述剂量时,剂量体积可以是0.1ml或0.5ml~至多500ml,优选是15ml~25ml,通常是约20ml。当通过皮下或肌肉内注射施用所述剂量时,剂量体积可以是0.1ml~3ml,优选是0.5ml~1.5ml,通常是约1ml。

[0076] 施用频率不受特别限制,条件是不影响治疗的效力。治疗可以包括单剂量或多次剂量。优选的是至少在以下基础上施用多次剂量:每周、每2周、每4周、每6周、每12周、每24周、每日历月、每6个日历月或每年。因此,所述多次剂量可以被至少1周、至少2周、至少1个月、至少3个月、至少6个月或被至少1年分隔开(意味着每周、每2周、或每月或每6个月或每年进行给药)。特别优选的是至少每2周~3周施用所述剂量。

[0077] 治疗长度不受特别限制,并且如通常在治疗自体免疫疾病中那样,治疗无限期地进行,或直到症状减少至对于患者而言可管理的水平。通常对受试对象施用所述治疗至少1个月。

[0078] 应该理解,所述试剂和甲氨蝶呤以治疗有效量、即以对于缓解、预防或治疗风湿性疾病有效的量施用。

[0079] 特别地,当所述疾病是类风湿性关节炎时,优选的是以可有效提供ACR50响应、更优选ACR70响应的量施用所述试剂和甲氨蝶呤。

[0080] 在本发明的一个方面,以0.2mg~10mg的剂量、更优选以0.2mg~6.25mg的剂量、最优选以0.2mg~3mg的剂量对受试对象施用所述试剂。当静脉内施用所述剂量时,这些剂量特别优选。

[0081] 当所述试剂是人源化抗体BT061时,如下表1中所示,发明人令人惊奇地发现静脉内输注结束后3小时健康志愿者血浆中循环的抗体的有效C_{max}值比预期低得多。这认为是反映了更快的经靶标介导的清除。

剂量(mg)	血浆水平 (μg/ml)		
	理论 c _{max}	有效 c _{max} (输注结束后)	输注结束后 3 小时的浓度
2.5	0.71	0.06 - 0.14	0
5	1.43	0.32 - 0.44	0.09 - 0.16
10	2.86	0.8 - 2.0	0.46 - 1.4
20	5.71	2.3 - 4.1	1.7 - 3.3
40	11.43	5.9 - 6.5	4.4 - 6.1
60	17.14	8.9 - 15.1	7.7 - 11.08

[0083] 表1——静脉内施用后BT061的预期血浆水平和有效血浆水平。指出了每个剂量组的3个不同志愿者中所测定的血浆水平的范围。

[0084] 因此,在本发明的优选实施方式中,在静脉内施用0.2mg~10mg的所述试剂,并且施用后3小时患者血浆中所述试剂的最大浓度小于2.5μg/ml。优选的是,在静脉内施用0.2mg~5mg的所述试剂,并且施用后3小时患者血浆中所述试剂的最大浓度小于0.3μg/ml。更优选的是,在静脉内施用0.5mg~3mg的所述试剂,并且施用后3小时患者血浆中所述试剂的最大浓度小于0.1μg/ml。这些值在所述试剂的任一次施用后和/或在所述试剂的第一次和/或第二次施用后获得。

[0085] 还可以基于受试对象的体表面积 (BSA) 计算所述剂量。可以根据任何已知方法计算体表面积 (BSA)。BSA计算方法的实例是:Mosteller公式 ($BSA (m^2) = ([高度 (cm) \times 重量 (kg)] / 3600)^{1/2}$ (Mosteller RD., N Engl J Med 1987年10月22日;317 (17):1098); DuBois和DuBois公式 $BSA (m^2) = 0.20247 \times 高度 (m)^{0.725} \times 重量 (kg)^{0.425}$ (DuBois D; DuBois EF., Arch Int Med 1916 17:863-71); Haycock公式 $BSA (m^2) = 0.024265 \times 高度 (cm)^{0.3964} \times 重量 (kg)^{0.5378}$ (Haycock G.B.等, The Journal of Pediatrics 1978 93:1:62-66); Gehan和George公式 $BSA (m^2) = 0.0235 \times 高度 (cm)^{0.42246} \times 重量 (kg)^{0.51456}$ (Gehan EA和George SL, Cancer Chemother Rep 1970 54:225-35); 以及Boyd公式: $BSA (m^2) = 0.0003207 \times 高度 (cm)^{0.3} \times Weight (克)^{(0.7285 - (0.0188 \times \log (克)))}$ 。

[0086] 因此,可以以0.1mg/m²患者体表面积~5mg/m²患者体表面积、最优选0.1mg/m²~2.5mg/m²、最优选0.25mg/m²~1.5mg/m²的剂量对受试对象施用所述试剂。作为另一种选择,可以基于受试对象的体重计算所述剂量,使得在本发明的另一方面,以2μg/kg~150μg/kg、优选2μg/kg~75μg/kg、最优选5μg/kg~45μg/kg的剂量施用所述试剂。同上,特别优选当静脉内施用所述试剂时利用这些剂量。

[0087] 如上所述,在本发明的一个方面皮下施用所述试剂和/或甲氨蝶呤。通常,如本领域已知,为了达到等效的治疗效果,皮下剂量需要大于静脉内剂量。本发明人在单一疗法实验中使用抗体BT061的类风湿性关节炎患者内2mg静脉内施用后达到的治疗效果近似等效于50mg皮下施用后达到的效果。这些结果示于表2。

[0088]

第7周	ACR20 (%)	ACR50 (%)	ACR70 (%)
2mg静脉内	50	25	12.5
50mg皮下	50	25	12.5

[0089] 表2——在用总共6周治疗时间每周一次BT061给药 (2mg静脉内或50mg皮下) 治疗

后的第7周时显示出ACR改善的类风湿性关节炎患者的百分比。结果表明来自8名个体(2名接受安慰剂,6名接受BT061)的盲数据。

[0090] 因此,在本发明的另一优选方面,以20mg~80mg、更优选30mg~70mg的剂量在皮下或肌肉内对患者施用所述试剂。作为另一种选择,可以以 $8\text{mg}/\text{m}^2 \sim 50\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $0.2\text{mg}/\text{m}^2 \sim 1.5\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用所述试剂。在本发明该方面中,特别优选至多约每2周一次进行施用。应该注意在该段落中描述的本发明的方面可以与本申请提出的本发明的其它方面和优选特征组合。

[0091] 根据本发明,所述药物组合物或试剂盒还包含甲氨蝶呤(MTX)。MTX治疗RA是本领域公知的,并且设想在本发明中以前述的剂量施用MTX。特别地,在本发明中MTX通常的施用剂量为5mg~30mg,优选7.5mg~30mg,最优选10mg~25mg。在某些情况下,剂量取决于使用MTX对患者进行的预治疗或患者对该药的耐受力。

[0092] 在另一方面,本发明的方法包括施用适于治疗风湿性疾病的额外治疗剂的另一步骤。额外治疗剂包括一种或多种以下试剂:非甾体抗炎药、抗炎性甾体、金化合物、抗疟疾药、叶酸、环孢霉素、来氟米特、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、d-青霉胺、环磷酰胺、麦考酚酯(mycophenolate)、二甲胺四环素和苯丁酸氮芥。这些额外治疗剂可以与能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和MTX分开、同时或依次施用。

[0093] 如上所述,本发明人令人惊奇地发现本发明的药物组合物和试剂盒能够治疗风湿性疾病。特别地,如以下实施例2所述,对类风湿性关节炎进行的治疗对疾病产生显著的改善。因此,当所述疾病是类风湿性关节炎时在本发明的另一方面中,根据美国风湿病学院评分系统,所述治疗为所述患者中的疾病提供至少ACR20、优选至少ACR50、最优选至少ACR70的改善。换言之,根据患者的美国风湿病学院(ACR)评分,所述治疗提供至少ACR20、优选至少ACR50、最优选至少ACR70的疾病参数的改善。

[0094] 最优选的是,所述治疗在开始治疗后6~8周为患者提供至少ACR70的响应。

[0095] 从实施例2和相关附图还可以看出,本发明的治疗具有改善许多患者中的类风湿性关节炎的能力。因此,本发明的治疗方法能够通过至少20%的患者提供至少ACR20的疾病状况的改善而治疗类风湿性关节炎。另外,本发明的治疗方法能够通过至少10%的患者提供至少ACR50、更优选ACR70的疾病状况的改善而治疗类风湿性关节炎。

[0096] 现在用以下实施例进一步描述本发明。

[0097] 实施例1.使用新分离的CD4+CD25+调节性T细胞的利用抗体BT061的体外增殖测试

[0098] 方法

[0099] 人类CD4+CD25+调节性T细胞的分离

[0100] 50ml EDTA血样获自健康的对照供体。外周血单核细胞(PBMC)、调节性T细胞(Tregs)和作为T响应细胞的T辅助细胞(Tresps)分离自前述外周血样(Haas等,2007)。

[0101] 体外增殖测试

[0102] 将新分离的Tregs与 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的板结合抗体(BT061)、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的可溶性BT061或培养基一起预温育48小时。

[0103] 将获自两个供体(实验1和实验2)的新分离的Treg(2.5×10^4 ,供体A)与 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的可溶性BT061或板结合BT061一起预温育48小时。为了实现同种异体刺激(allogeneic stimulation),接着在 2×10^5 T细胞耗竭和经照射(30戈瑞)的PBMC(供体A)存

在下,将 2.5×10^4 个经预温育的Tregs转移到来自第二供体(供体B)的作为响应细胞的 1×10^5 个T细胞(Tresps)。刺激4天后,每孔添加 $1\mu\text{Ci}$ [^3H] 胸腺嘧啶核苷,并再经16小时后测定增殖。

[0104] 结果

[0105] 在图1中将Treg介导的Tresp增殖的抑制的百分比显示为在不存在Tregs时与PBMC一起温育的Tresps增殖的抑制百分比。显示获自两个供体(实验体1和实验体2)的Tregs的结果。短划线条形图(dashed bar)表示使用与可溶性抗体一起预温育的Treg细胞获得的结果,而填充条形图(filled bar)表示使用与板结合抗体一起预温育的Treg细胞获得的结果。作为对照,显示出培养基处理的Treg的抑制活性(空白条形图,openbar)。条形图上的数字表示Tresp增殖的抑制百分比。

[0106] 如图1所示,和与单独培养基一起温育的Treg相比,与板结合抗体或可溶性抗体一起预温育的Treg细胞能够减少同种异体刺激的Tresp的平均增殖性响应。另外,与使用可溶性抗体获得的抑制相比,使用板结合抗体获得的抑制更强。

[0107] 生理条件下,预期在体内作为IgG1抗体的BT061与位于Fc受体表达细胞上的Fc受体结合。该相互作用会引起将均匀分布的BT061(与CD4结合)募集至靶细胞和Fc受体表达细胞的局部相互作用位点中,使得BT061交联并且由此使CD4交联。据预期BT061与Fc受体表达细胞的相互作用赋予Treg靶细胞与使用板结合抗体所观察到的相似的信号,这是因为两种机制均将几种靶分子(CD4)募集至细胞表面的临近区域。

[0108] 实施例2. 罹患类风湿性关节炎的患者中的临床试验

[0109] 在罹患RA的患者中证明了本发明的药物组合物和试剂盒对RA提供有效治疗的能力。

[0110] 其中研究与MTX组合的BT061的组合试验包括在罹患中度RA到严重RA的患者中进行的随机安慰剂控制的双盲II期研究。所有患者在开始试验之前摄取稳定剂量的MTX至少3个月,在试验进程中经口服施用或肌肉内施用 $15\text{mg}/\text{周} \sim 20\text{mg}/\text{周}$ 的所有患者中继续这些剂量。

[0111] 将患者分为3组。组I中的患者(14位患者)接受 0.5mg 静脉内剂量的BT061和 $15\text{mg} \sim 20\text{mg}$ 剂量的MTX。组II中的患者(42位患者)接受 2.0mg 静脉内剂量的BT061和 $15\text{mg} \sim 20\text{mg}$ 剂量的MTX。组III中的患者(14位患者)接受 $15\text{mg} \sim 20\text{mg}$ 剂量的MTX。每周一次对患者给药,持续8周。

[0112] 对于静脉内施用,根据医学上接受的步骤将所述试剂输注到前臂静脉中。

[0113] 在给药期间的每周和给药完成后的数周,通过评估ACR参数(美国风湿病学院ACR主页)、特别是研究触痛关节和肿胀关节的数量以及跟踪C-反应性蛋白(CRP)的水平或红细胞沉降速率(ESR),对治疗功效进行评价。此外,在试验之前对这些参数进行评估以提供第0天时的“基线”值。

[0114] 试验的结果示于图2~图4,图2~图4中将获自接受 2mg 剂量的BT061+MTX的第II剂量组的数据与两个已公布III期试验中获得的最有效剂量组相比,所述两个已公布III期试验涉及Keystone等(2004-DE019测试)的抗TNF α 抗体Humira(阿达木单抗)和Keystone等(2009-Go-Forward测试)的Simponi(戈利木单抗)。对于所有研究显示最有效的剂量组。

[0115] 应该注意,出于比较目的包括的现有技术结果是其中已经对药物组合物的剂量进行过优化的III期试验。

[0116] 具体而言,图2显示实现ACR20评分的来自2mg剂量组的患者的百分比,而图3和图4分别显示实现ACR50和ACR70评分的来自2mg剂量组的患者的百分比。

[0117] 从图中可以看出,在使用治疗性抗TNF- α 抗体的临床试验中,由ACR分数的改善所测定的峰值治疗活性通常需要数月。通常,显示ACR20响应的患者百分比是最大的,并且于3个月后达到稳定水平。对于ACR50在4个月后达到稳定水平,并且对于ACR70在6个月后达到稳定水平。

[0118] 但是,本发明的组合治疗的结果显示许多差异。具体而言,在显示经安慰剂校正结果的图中可以看出,治疗效果的启动被延迟;实现ACR20分的患者百分比直到第8周才上升到高于5%。然而,在启动后治疗效果迅速增加,从而使得在第9周实现ACR50的患者百分比与使用TNF- α 抗体(Humira和Simponi)的III期试验中所达到的相当。在第7~9周达到ACR20、ACR50和ACR70的患者百分比迅速增加,从而使得在第9周ACR20、ACR50和ACR70患者的百分比分别为约25%、18%和17%。应该注意,在使用Humira和Simponi的试验中,ACR70患者的该百分比直到开始治疗后24~26周才达到。

[0119] 另外,本发明人注意到使用BT061和MTX的组合所见的不利副作用的数量低于单独使用BT061进行的试验中所见的不利副作用的数量,因此MTX具有减少激活CD4+CD25+调节性T细胞的治疗性抗体的副作用的能力。

[0120] 这些结果证明,在治疗风湿性疾病中本发明的能够激活CD4+CD25+调节性T细胞的试剂和MTX的组合具有功效和令人惊奇的优点。

序列表

<110> 生物测试股份公司

<120> 疾病治疗用药物组合物

<130> 322248.WO/JND/CJS

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 hB-F5H37L 的 H 链的 V 结构域

<400> 1

[0001]

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
20 25 30

Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 hB-F5L4M 的 K 链的 V 结构域

<400> 2

[0002] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 3

<211> 550

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化抗体 hB-F5 的 H 链的 V 结构域的质粒的一部分

<400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcatcttcc tgcccggtct gggcctccca 60

tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120

cactttgctg ttctctttg tctccagtg tctgtcaga ggaacagctt gtggagtctg 180

ggggaggctt ggtgaaacct ggaggttctc tgaggctctc ctgtgcagcc tcgggtttca 240

[0003]

gtttcagtga ctgccgatg tactgggttc gccaggctcc agggaagggg ctggagtgga 300

ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360

gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctatctgcag atgaacagct 420

tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgcctc ctattatagg tacgacgtgg 480

gggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540

gccaagcttg

550

<210> 4

<211> 498

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化抗体 hB-F5 的 K 链的 V 结构域的质粒的一部分

<400> 4

ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat 60

```

ttcaattata tctgagacag cgtgtataag ttatgtata atcattgtcc attcctgact    120

acagggtcct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actccctggc tgtgtctctg    180

ggcgagaggg ccaccatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctacagt    240

tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgtcatc ttacctgca    300

tccatcctag aatctggggt cctgaccga ttcagtggca gcgggtctgg gacagatttc    360

acttcacca tcagcagcct gcaggtgaa gatgtggcag ttattactg tcagcacagt    420

agggaaattc cgtggacgtt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg tgagtagaat    480

ttaaatttta agcttctt                                                    498

```

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

[0004] <213> 小家鼠

<400> 5

Gln Glu Tyr Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Asn

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys

20 25 30

Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

[0005] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Gly
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

[0006] <210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 9
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0007]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr
20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

[0008]

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 hB-F5H37V 的 H 链的 V 结构域

<400> 15

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
20 25 30

Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu

	50	55	60	
	Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
	65	70	75	80
	Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
		85	90	95
	Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala			
	100	105	110	
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
[0009]	<210>	16		
	<211>	111		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	人源化抗体 hB-F5L4L 的 K 链的 V 结构域		
	<400>	16		
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
	1	5	10	15
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
		20	25	30
	Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
	35	40	45	
	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp			
	50	55	60	

	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
	65	70 75 80
[0010]	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
	85	90 95
	Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100	105 110

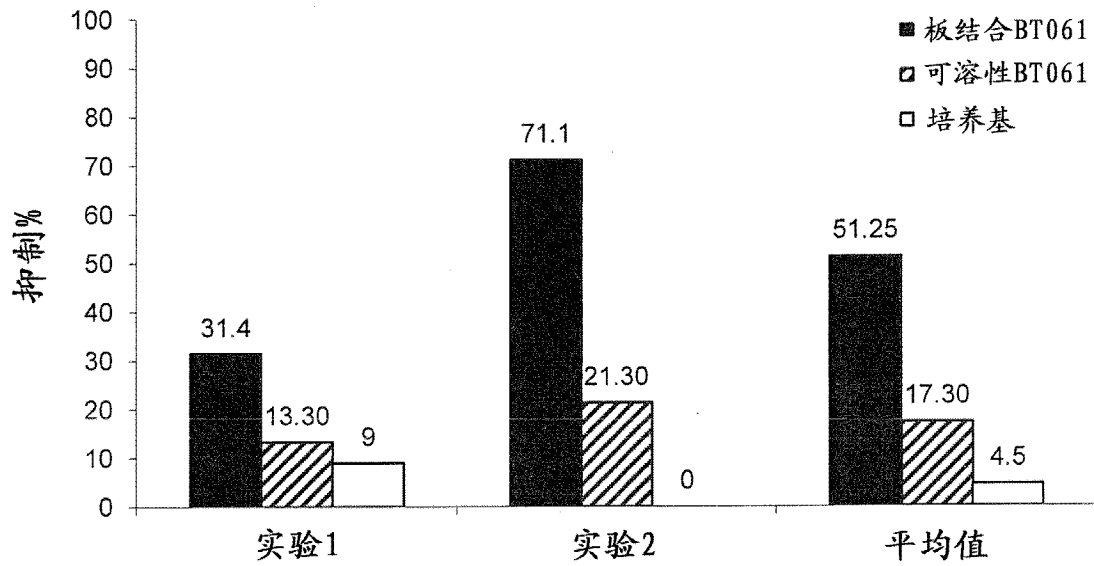


图1

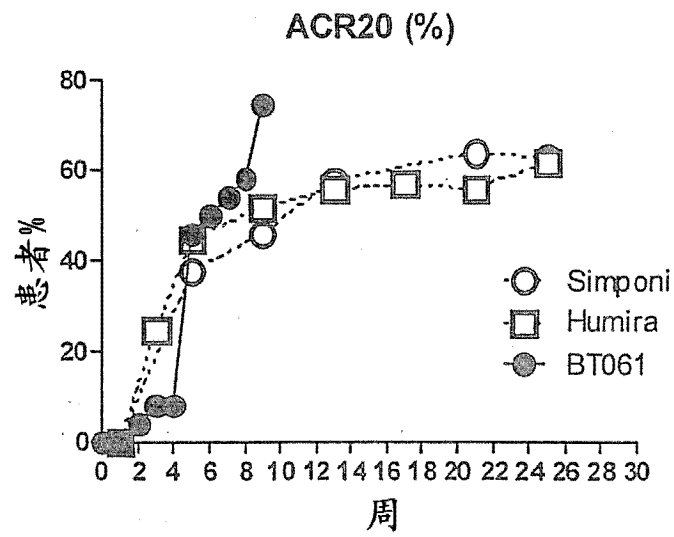


图2A

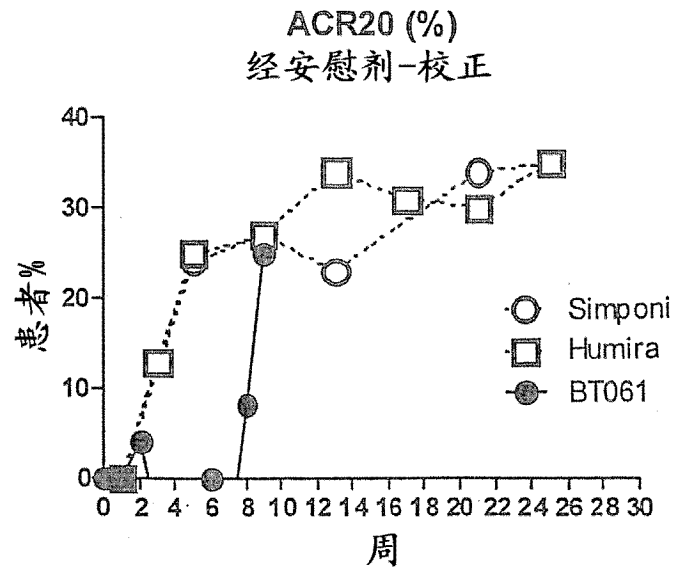


图2B

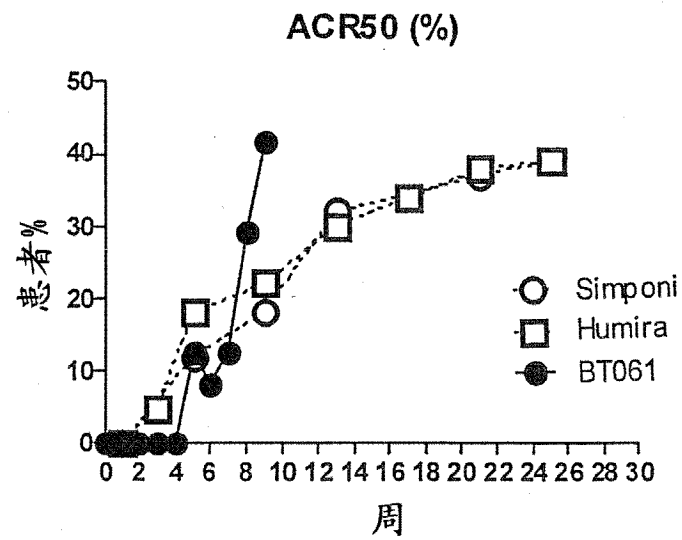


图3A

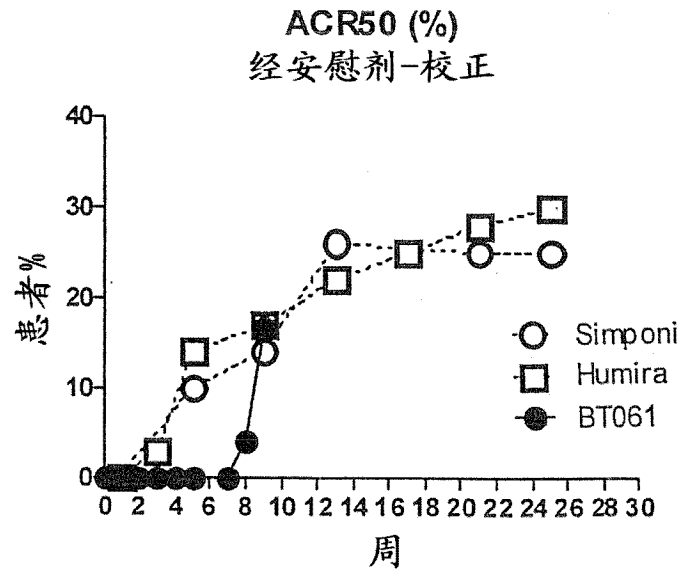


图3B

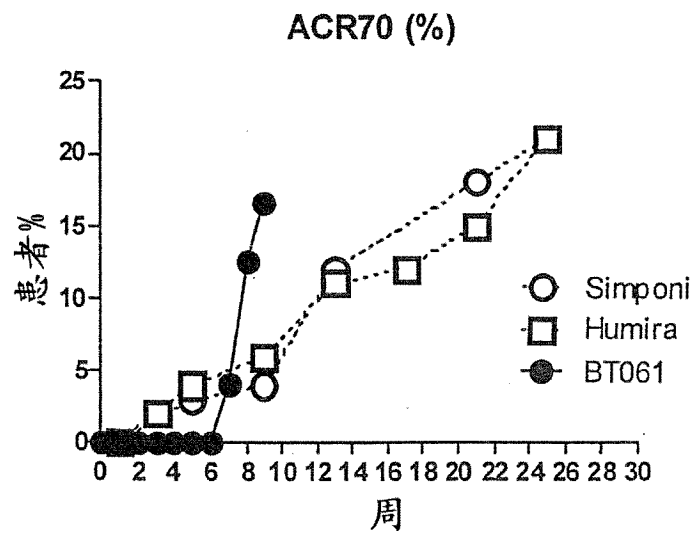


图4A

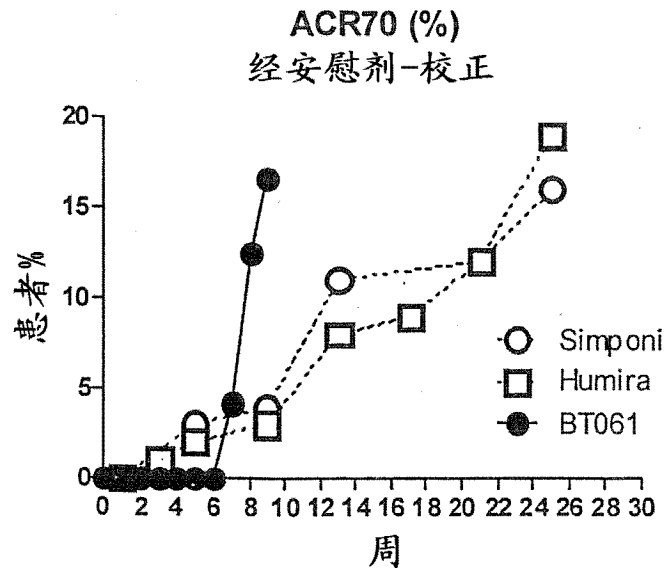


图4B

GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT CCT GCC CGT GCT GGG CCT

CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG

GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT
E E Q L

GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA
V E S G G G L V K P G G S L R L S C A

GCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG
A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G

AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT
K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N

TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T

GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT
V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C S

GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT
A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T

CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG
L V T V S S

图5

	FR1	CDR1	FR2
	1	2	3
	12345678901234567890123	456777778901234	567890123456789
		ABCD	
mB-F5	DIVLTQSPSSLVSLGQRATISC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQIPGQPPKLLIY
hB-F5L4M	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQKPGQPPKLLIY
hB-F5L4L	-----	-----	-----
FK-001	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC		WYQQKPGQPPKLLIY

	CDR2	FR3
	5	6
	0123456	78901234567890123456789012345678
mB-F5	LASILES	GVPCRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC
hB-F5L4M	LASILES	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
hB-F5L4L	-----	-----
FK-001		GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC

	CDR3	FR4
	9	10
	901234567	8901234567
mB-F5	QHSRELPWT	FGGGTKLEIK
hB-F5L4M	QHSRELPWT	FGQGTKVEIK
hB-F5L4L	-----	-----
FK-001		FGQGTKVEIK

图7

	FR1			CDR1	FR2																																								
	1	2	3		4																																								
	123456789012345678901234567890			12345	67890123456789																																								
mB-F5	Q	E	Y	L	V	E	T	G	G	G	L	V	R	P	G	N	S	L	K	L	S	C	V	T	S	G	F	S	F	S	DCRMY	W	L	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G
hB-F5H37V	E	E	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	S	DCRMY	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G
hB-F5H37L	-----L-----																																												
M26	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	

	CDR2			FR3																																														
	5	6	7	8																																														
	0122223456789012345			67890123456789012222345678901234																																														
	ABC			ABC																																														
mB-F5	V	I	S	V	K	S	E	N	Y	G	A	N	Y	A	E	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	S	K	S	S	V	Y	L	Q	M	S	R	L	R	E	E	D	T	A	T	Y	Y	C	S	A
hB-F5H37V	V	I	S	V	K	S	E	N	Y	G	A	N	Y	A	E	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	S	K	N	T	V	Y	L	Q	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	A
hB-F5H37L	-----																																																	
M26	R																																																	

	CDR3			FR4																				
	10		11																					
	56789000000012			34567890123																				
	ABCDE																							
mB-F5	S	Y	Y	R	Y	D	V	G	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
hB-F5H37V	S	Y	Y	R	Y	D	V	G	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
hB-F5H37L	-----																							
M26	W																							

图8