



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 16/2812 (2013.01); *C07K 16/28* (2013.01); *A61K 2039/505* (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2017112967, 11.11.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 11.11.2014

Дата регистрации:
 17.12.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 16.09.2014 US 62/051,200

(43) Дата публикации заявки: 17.10.2018 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 17.12.2021 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 17.04.2017

(86) Заявка РСТ:
 US 2014/065048 (11.11.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2016/043788 (24.03.2016)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ВАН Чан И (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЮНАЙТЕД БАЙОФАРМА, ИНК. (TW)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: LU L and et.al., A bivalent
 recombinant protein inactivates HIV-1 by
 targeting the gp41 prehairpin fusion intermediate
 induced by CD4 D1D2 domains, I. Retrovirology,
 2012, N.9, V.104, pp.1-14. US 2009060914 A1,
 05.03.2009. US 20030211470 A1, 13.11.2003. US
 20110300069 A1, 08.12.2011. RU 2250770 C2,
 27.04.2005.

R U 2 7 6 2 3 1 5 C 2

**(54) ЛЕЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗЛЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ
 АНТИТЕЛАМИ К CD4, ОПОСРЕДУЮЩИМИ КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ВХОДА ВИЧ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу, направленному против молекулы CD4. Также раскрыты фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, способы лечения ВИЧ, способы ингибирования входа ВИЧ, ингибирования связывания gp120 с CD4+ клеткой,

способ активации покоящейся CD4+ Т-клетки, способ активации латентного резервуара ВИЧ в покоящейся Т-клетке с помощью указанного антитела или фармацевтической композиции. Изобретение позволяет эффективно лечить ВИЧ-инфекцию. 15 н. и 45 з.п. ф-лы, 46 ил., 27 табл., 16 пр.

R U
2 7 6 2 3 1 5
C 2

R U
2 7 6 2 3 1 5
C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11)

2 762 315⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C07K 16/2812 (2013.01); *C07K 16/28* (2013.01); *A61K 2039/505* (2013.01)

(21)(22) Application: 2017112967, 11.11.2014

(24) Effective date for property rights:
11.11.2014

Registration date:
17.12.2021

Priority:

(30) Convention priority:
16.09.2014 US 62/051,200

(43) Application published: 17.10.2018 Bull. № 29

(45) Date of publication: 17.12.2021 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 17.04.2017

(86) PCT application:
US 2014/065048 (11.11.2014)

(87) PCT publication:
WO 2016/043788 (24.03.2016)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):
VAN Chan I (US)

(73) Proprietor(s):
YUNAJTED BAJOFARMA, INK. (TW)

(54) TREATMENT AND FUNCTIONAL CURE OF HIV-INFECTION WITH MONOClonal ANTIBODIES
TO CD4 MEDIATING COMPETITIVE INHIBITION OF HIV ENTRY

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry, in particular to an antibody directed against CD4 molecule. A pharmaceutical composition containing the specified antibody, methods for HIV treatment, methods for the inhibition of HIV entry, inhibition of gp120 binding to CD4+ cell, a method for

activating a resting CD4+ T-cell, and a method for activating latent HIV reservoir in a resting T-cell using the specified antibody or a pharmaceutical composition are also disclosed.

EFFECT: invention allows for the effective treatment of HIV-infection.

60 cl, 46 dwg, 27 tbl, 16 ex

Настоящая заявка является международной заявкой РСТ, которая испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/051,200, поданной 16 сентября 2014 года, которая полностью включена в настоящую заявку посредством отсылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

5 Изобретение относится к моноклональным антителам, направленным против CD4, опосредующим конкурентное ингибирирование входа ВИЧ, их композициям и способам, в которых такие композиции применяются для лечения и функционального излечения ВИЧ-инфекции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) - заболевание иммунной системы человека, вызываемое вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) (веб-сайт: en.wikipedia.org/wiki/HIV/AIDS). Генетическое исследование указывает, что ВИЧ возник в западно-центральной Африке в конце девятнадцатого или начале двадцатого века. СПИД был впервые описан Центрами по контролю и профилактике заболеваний США 15 в 1981 году, а его возбудитель, ВИЧ, установлен в начале 1980-х. С начала эпидемии более 70 миллионов человек были инфицированы ВИЧ, и 35 миллионов человек скончались от СПИДа. Во всем мире 34,0 миллиона человек жили с ВИЧ на конец 2011 года (веб-сайт: www.who.int/gho/hiv/en/).

20 ВИЧ-инфекция постепенно уменьшает эффективность иммунной системы и делает лица восприимчивыми к оппортунистическим инфекциям и опухолям. ВИЧ передается при прямом контакте слизистой оболочки или тока крови с физиологической жидкостью, содержащей ВИЧ, такой как кровь, сперма, секрет влагалища, предсеменная жидкость и грудное молоко. Такая передача может включать анальный, вагинальный или оральный секс, переливание крови, зараженные иглы шприцов, обмен между матерью 25 и ребенком во время беременности, роды, кормление грудью или другой контакт с одной из вышеуказанных физиологических жидкостей.

25 В течение 30 лет ученые считали, что СПИД вызван "вирус-продуцирующими" CD4 Т-клетками, а не покоящимися Т-клетками. Однако таких "вирус-продуцирующих" инфицированных клеток было недостаточно, чтобы объяснить огромные массы Т-клеток, уничтожаемые у больных с развивающимся СПИДом. Грин и его коллеги сообщали, что 95 процентов неделяющихся (покоящихся) лимфоидных CD4 Т-клеток гибнут в результате пироптоза, вызванного abortивной вирусной инфекцией (Doitsh, G. et al. 2014). Эти клетки содержат цитозольную вирусную ДНК, но в отличие от Т-клеток, которые становятся воспроизводящими вирус единицами, такие "ВИЧ-35 инфицированные" покоящиеся Т-клетки саморазрушаются в результате интенсивно воспалительной формы апоптоза (пироптоза), которая включает высвобождение провоспалительных цитокинов. Клеточный белок, интерферон-гамма-индуктируемый белок 16 (IFI16), распознает вирусную ДНК и вызывает ряд реакций в Т-клетках, включая активацию фермента каспазы 1, которая опосредует пироптоз и вызывает 40 отек клеток, пермеабилизацию плазматической мембранны и выход цитоплазматического содержимого. Покоящиеся Т-клетки саморазрушаются в тщетной попытке уничтожить вирус. Этот процесс, в конечном счете, приводит к патогенезу ВИЧ, который вызывает прогрессию заболевания с развитием СПИДа.

45 Современные методы лечения ВИЧ-инфекции, задерживающие начало СПИДа, состоят из высокоактивной антиретровирусной терапии или ВААРТ, направленной на предотвращение вирусной репликации. Существующие оптимальные варианты ВААРТ состоят из комбинаций (или "коктейлей"), состоящих по меньшей мере из трех препаратов, которые относятся по меньшей мере к двум классам антиретровирусных

средств (кАРС). Стандартные схемы состоят из двух нуклеозидных (аналогов нуклеозидов) ингибиторов обратной транскриптазы (NARTI или НИОТ) и ингибитора протеазы или ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ).

В развитых странах врачи оценивают вирусную нагрузку, количество CD4 Т-клеток,

5 скорость снижения CD4-положительных клеток и готовность больного к терапии, решая, когда рекомендовать начать лечение ВААРТ. Традиционно, лечение рекомендовали бессимптомным больным, когда количество CD4 Т-клеток падает на 200-250 клеток на микролитр крови. Однако более ранее начало лечения (при уровне CD4 350 клеток/микролитр) может значительно снизить риск развития СПИДа и смерти.

10 Без лечения фактическое среднее время выживания после инфицирования ВИЧ, как оценивают, составляет 9-11 лет, в зависимости от подтипа ВИЧ; при этом средняя выживаемость после диагноза СПИДа варьирует от 6 до 19 месяцев. В областях, где широко доступно лечение ВААРТ, уровень смертности от этого заболевания снижен на 80%, что в свою очередь увеличивает среднюю продолжительность жизни у лиц с 15 недавно установленным диагнозом ВИЧ-инфекции до приблизительно 20 лет.

Стандартные цели ВААРТ включают улучшение качества жизни больного, уменьшение осложнений и уменьшение вирусемии ВИЧ ниже предела обнаружения.

Впрочем, существует несколько проблем, связанных с лечением ВААРТ. Во-первых, оно не излечивает больного от ВИЧ-инфекции, и при этом оно не предотвращает 20 возврата высоких уровней в крови главным образом "ВААРТ-резистентного" ВИЧ после прекращения лечения. Во-вторых, ВААРТ может иметь неприятные побочные действия, включающие недомогание, усталость, диарею, головную боль, тошноту и рвоту. В течение длительного периода ВИЧ-инфицированные больные могут страдать нейрокогнитивными нарушениями, остеопорозом, невропатией, онкологическими 25 заболеваниями, нефропатией и сердечно-сосудистым заболеванием. Несмотря на то, что современные антиретровирусные средства вызывают меньше побочных действий, чем более старые препараты, пожизненное применение все еще может иметь негативные последствия. Несоблюдение режима лечения может означать восстановление ВИЧ, устойчивость к лекарственному средству и прогрессию заболевания. В-третьих, более 30 чем у 50% больных, ВААРТ достигает намного меньших, чем оптимальные, результатов вследствие непереносимости терапии, предыдущей неэффективной антиретровирусной терапии и заражения резистентным к лекарственным средствам штаммом ВИЧ.

Исследователи все больше и больше исследуют проблему излечения ВИЧ-инфекции или, по меньшей мере, пытаются достичь длительной или постоянной ремиссии без 35 продолжения применения антиретровирусных средств.

Две лечебных стратегии, стерилизующего (т.е. полного устраниния) и функционального излечения, как показано в **Таблице 1**, в настоящее время исследуют для ВИЧ-инфекции. Способ стерилизующего излечения направлен на устранение всех инфицированных ВИЧ клеток, с полным удалением ВИЧ из организма, и определен 40 как способ, который уменьшает вирусную нагрузку менее чем до 1 копии на миллилитр крови. Функциональное изечение направлено на состояние ремиссии и длительный контроль ВИЧ, включая низкую вирусную нагрузку в отсутствие антиретровирусной терапии, и является способом, который состоит в уменьшении вирусной нагрузки менее 45 чем до 50 копий на миллилитр крови, постоянно или в течение длительного периода времени.

Единственный на сегодня пример "стерилизующего излечения" взят из описания случая человека с ВИЧ-инфекцией, называемого "Берлинским пациентом", который имел острый миелолейкоз и прошел пересадку костного мозга от донора с мутантной

или альтернативной формой гена CCR5. Через 45 месяцев без лечения, врачи не смогли обнаружить ВИЧ в его организме. Тем не менее, стратегия использования пересадки костного мозга от донора с мутацией CCR5 не является реалистичным лечением ВИЧ, принимая во внимание токсичность и сложность лечения. Один реальный пример

5 "функционального излечения" можно найти у элитных контроллеров. Элитные контроллеры - это лица, инфицированные ВИЧ, иммунная система которых способна самостоятельно контролировать вирус без антиретровирусных средств. У таких людей успешно сохраняется стабильное количество CD4 клеток (лейкцитов), они имеют низкую или не обнаруживаемую вирусную нагрузку и значительно меньшее количество

10 "латентного ВИЧ" в своих клетках.

Одним из основных препятствий к лечению является то, что существуют "латентные резервуары ВИЧ", которые находятся в неактивном состоянии в клетках иммунной системы, таких как клетки памяти, с длинной продолжительностью жизни во время

лечения антиретровирусными средствами, поскольку такое лечение может

15 воздействовать на активную вирусную инфекцию, блокируя репликацию, но не на латентный ВИЧ. Впрочем, если такое антиретровирусное лечение остановить, латентный ВИЧ может активироваться с возобновлением процесса ВИЧ-инфекции.

Существующие стратегии, направленные на такие "проблематичные" латентные резервуары ВИЧ, включают попытки уменьшить латентные резервуары посредством

20 активации экспрессии вируса в присутствии лечения ВААРТ, что приводит к уничтожению инфицированных клеток с сохранением только неинфицированных клеток. Одной из групп активаторов являются ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), как показано в **Таблице 2**. В настоящее время ингибиторы HDAC используются в качестве

стабилизаторов настроения, противоэпилептических средств и противоопухолевой

25 терапии. Главной проблемой остаются последствия длительного применения ингибиторов HDAC при усилении риска злокачественного развития и/или реактивации онкогенов. Данная стратегия целесообразна, если активная вирусная репликация полностью ингибирована комбинированной антиретровирусной терапией (кААРТ). До сих пор эти усилия не привели к длительной супрессии вируса или функциональному

30 излечению.

Два плана ограничения или уменьшения размера латентных резервуаров ВИЧ у людей с ВИЧ-инфекцией включают: (1) интенсификацию лечения путем добавления нового лекарственного АРТ средства в схему лечения больного, и (2) раннее лечение с началом АРТ непосредственно после инфицирования. Результаты нескольких

35 исследований показали, что количество инфицированных ВИЧ клеток значительно уменьшается при начале кААРТ во время ранней острой стадии, а не хронической поздней стадии ВИЧ-инфекции.

Подводя итог вышесказанному, мощные и безопасные средства были бы крайне желательными для применения в лечении ВИЧ отдельно или в дополнение к кААРТ, при

40 условии, что они могут: (1) блокировать вход ВИЧ как при бесклеточном, так и при межклеточном механизме передачи, что приводит к значительному уменьшению ВИЧ-инфекции в активированных или покоящихся CD4 Т-клетках, в том числе в долгоживущих Т-клетках памяти; (2) специфично реактивировать ВИЧ-инфицированные покоящиеся CD4 Т-клетки с высвобождением ВИЧ, что приводит к апоптозу в латентно 45 инфицированных клетках; и/или (3) ингибировать активацию/воспаление ВИЧ-инфицированных покоящихся CD4 Т-клеток при стимуляции антигеном/цитокином, когда такая активация может вызвать пироптоз и сильное истощение нормальных CD4-положительных Т-клеток, приводящее к СПИДу. Согласованные усилия в направлении

функционального или стерилизующего излечения ВИЧ-инфекции, приводящего к длительной или постоянной ремиссии при последующем отсутствии кАРТ, стоят во главе мировой программы общественного здравоохранения и активно исследуются во всем мире, и, по мере доступности, произведут революцию в лечении ВИЧ-инфекции.

5 ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ:

1. Briant, L., Reynes, J., Coudronniere, N., et al. "HIV Reactivation in resting peripheral blood mononuclear cells of infected Adults upon in vitro CD4 cross-linking by ligands of the CDR2-loop in extracellular domain 1". *J. AIDS.* 1999. 21:9-19.
2. Briant, L., Coudronniere, N., Robert-Hebmann, V., et al. "Binding of HIV virions or gp120-10 anti-gp120 immune complexes to HIV-1 infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection". *J. Immunol.*, 1996. 156:3994-4004.
3. Burkly, L.C., Olson, D., Shapiro, R., et al. "Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion". *J. Immunol.* 1992; 149: 1779-87.
4. Carr, F.J., Carter, G., Hamilton, A.A. & Adair, F.S. "Reducing immunogenicity of proteins - by modifying the amino acid sequence of the protein to eliminate potential epitopes for T-cells of a given species". PCT Publication WO 1998-052976.
5. Chiba, Y., "Leu3A Binding Peptides". US Patent 5,171,838 (1992).
6. Doitsh, G. Galloway, K., Geng, X., et al. "Cell Death by pyroptosis derives CD4 T-cell depletion in HIV infection". *Nature.* 2014. 505:509-514.
7. Global Health Observatory (GHO) HIV/AIDS. (веб-сайт: www.who.int/gho/hiv/en/)
8. HIV-Wikipedia, The free encyclopedia. (веб-сайт: en.wikipedia.org/wiki/HIV/AIDS)
9. Jacobson, J.M. Kuritzkes, D.R., Godofsky, E., et al. "Safety, Pharmacokinetics, and Antiretroviral Activity of Multiple Doses of Ibalizumab (formerly TNX-355), an Anti-CD4 Monoclonal Antibody, in Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Adults". *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. 53:450457.
10. Jameson, B.D., Rao, P.E., Kong, L.L. et al. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science.* 1988, 240, 1335-1339.
11. Jones, T.D., et al. "Deimmunization of Monoclonal Antibodies". *Methods Mol. Bio.* 2009. 525:405-423.
12. Kuritzkes, D.R., Jacobson, J.L., Powderly, W.G., et al. "Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type I". *J. Infect. Dis.* 2004. 189:286-291.
13. Lynn, S. and Wang, C.Y. "Designed deimmunized monoclonal antibodies for protection against HIV exposure and treatment of HIV infection". US Patent No. 7,501,494 (Issued March 10, 2009).
14. Pace, C.S., Fordyce, M.W., Franco, D., et al. "Anti-CD4 Monoclonal Antibody ibalizumab Exhibits Breadth and Potency Against HIV-1, with Natural Resistance Medicated by the loss of a V5 Glycan in Envelope". *J. AIDS.* 2013. 62:1-9.
15. Pace G, Fordyce M, Franco D. "Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits exceptional breadth and potency against HIV, which adopts a unique pathway to resistance". Abstract 585, 18th CROI 2011, Boston.
16. Sawyer, L.S.W., Wrin, M.T., Crawford-Miksza, L., et al. "Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 is determined in part by the cell in which the virus is propagated". *J. Virol.* 1994, 68(3), 1342-1349.
17. Sigal, A., Kim, J.T., Balazs, A.B., et al. "Cell-to-Cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy". *Nature.* 2011. 477:95-98.
18. Than, S., Oyaizu, N., Tetali, S., et al. "Upregulation of human immunodeficiency virus

(HIV) replication by CD4 cross-linking on peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected adults". J. Virol. 1997; 71(8):6230-6232.

19. Toma, T., Weinheimer, S.P., Stawiski, E., et al. "Loss of Asparagine-linked glycosylation sites in variable region 5 of human immunodeficiency virus type 1 envelope is associated with resistance to CD4 antibody ibalizumab". J. Virol. 2011. 85:3872-3880

5 20. Wang, C.Y. "Antibodies against a host cell antigen complex for pre and post exposure protection from infection by HIV". US Patent No. 5,912,176, 1999.

10 21. Wang, C.Y., Sawyer, L.S.W., Murthy, K.K., et al. "Postexposure immunoprophylaxis of primary isolates by an antibody to HIV receptor complex". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999, 96, 10367-10372.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание направлено на композиции и способы предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции. Один аспект настоящего описания относится к моноклональным антителам, направленным против CD4, их композициям и способам, в которых такие композиции применяются для предотвращения, лечения и функционального излечения ВИЧ-инфекции.

Один аспект настоящего описания относится к антителу, направленному против CD4, его композициям и способам, в которых такие композиции применяются для предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции. В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывается с CDR2 областью в домене 1 CD4. Раскрытое антитело проявляет мощное конкурентное ингибирирование входа ВИЧ посредством своего связывания с доменом 1 CD4 в бесклеточных и в межклеточных системах. Раскрытое антитело также ингибирует индуцированную антигенами пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов (IL2 и IFN-гамма) CD4- положительных Т-клеток, которые участвуют в патогенном цикле пироптоза. Раскрытое антитело также обладает способностью реактивировать покоящиеся CD4- положительные Т-клетки. Это свойство особенно полезно для реактивации латентных резервуаров ВИЧ в покоящихся Т-клетках, что делает такие клетки восприимчивыми к лечению антиретровирусными средствами. Такие высокоаффинные антитела к CD4 способны активировать покоящиеся ВИЧ-инфицированные клетки для высвобождения ВИЧ. Реактивация ВИЧ-инфицированных покоящихся CD4+ Т-клеток позволяет проводить комбинированное лечение, включающее антитело согласно настоящему изобретению с ВААРТ у ВИЧ-инфицированных больных, приводящее к функциональному излечению.

35 Настоящее описание направлено на способы лечения, предотвращения и функционального излечения ВИЧ-инфекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы содержат антитела, направленные против CD4. Настоящее описание также включает противовирусные средства, которые могут применяться в способах лечения, предотвращения и функционального излечения ВИЧ-инфекции.

40 В некоторых вариантах осуществления настояще изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, в качестве монотерапии, в 45 таком лечении могут снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у подвергаемых лечению субъектов без восстановления вирусной нагрузки, пока уровень антитела в сыворотке превышает 10 мкг/мл.

В другом варианте осуществления настояще изобретение относится к

фармацевтическим композициям, включающим гуманизированное моноклональное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которое при введении в количестве приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз 5 в две недели, для лечения наивных ВИЧ больных, приведет к функциональному излечению таких больных.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Сравнение конкурентного и неконкурентного механизмов ингибиования входа ВИЧ. **Фиг. 1а** является графиком, на котором показаны теоретические результаты, полученные в модели конкурентного ингибиования входа ВИЧ, где белок оболочки ВИЧ gp120 и ингибитор (например, лекарственное средство на основе антитела) конкурируют за связывание с одной частью являющейся их общей мишенью поверхностной молекулы (т.е., CDR2 домена 1 CD4). В данной модели может быть достигнуто 100% ингибиование связывания/входа ВИЧ, когда концентрация ингибитора 10 достигает определенного порога. Для сравнения, **Фиг. 1б** является графиком, на котором показаны теоретические результаты, полученные в модели неконкурентного ингибиования входа ВИЧ, где ВИЧ и ингибитор связываются с разными участками на одной молекуле-мишени (например, домене 2 CD4 для TMB-355). В данной модели неконкурентного ингибиирования связывание/вход ВИЧ могут быть снижены 15 ингибитором, однако полного ингибиования не удается достичь независимо от концентрации ингибитора. Устойчивость ВИЧ к лекарственному средству на основе антитела выражается как "плато" в % ингибиования независимо от концентрации лекарственного средства. 20

Фигура 2. Результаты ингибиования входа ВИЧ-1 из панели 118 различных ВИЧ-1 Env псевдовирусных штаммов, охватывающих 11 клад, при использовании TMB-355 (Pace, G., et al., 2011). Для каждого вируса черные линии указывают на максимальный процент ингибиования (МПИ) при обработке TMB-355 в концентрациях до 10 мкг/мл (ось Y слева); и серые линии указывают соответствующую IC₅₀ (ось Y справа). TMB-355 нейтрализовало 92% вирусных штаммов с≥50% ингибированием и только 31% 30 вирусных штаммов с≥95% ингибированием.

Фигура 3. Ингибиование входа ВИЧ-1 из панели более чем 850 вирусов ВИЧ Env псевдотипа, собранных за 10-летний период, при использовании мАт B4. МАт B4 обеспечивает широту и активность при ингибиовании входа ВИЧ почти со 100% максимальным процентом ингибиования (МПИ) всех 850 вирусов Env псевдотипа с 35 IC₅₀, сгруппированной около двух концентраций, одна от 0,01-1 мкг/мл и вторая приблизительно 10 мкг/мл.

Фигура 4. Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fv-области мАт антитела dB4C7 (SEQ ID NO: 7), которое применяется в UB-421. Последовательности, представляющие соответствующие области CDR1, 2 и 3, 40 полученные из его исходного мышного антитела B4, подчеркнуты (**Таблица 4**, SEQ ID NO: 1-3). Вариабельные и константные области соответственно заштрихованы светло-серым и темно-серым цветами (SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно). Аминокислотный остаток Asn (N) в ак101 тяжелой цепи служит участком N-гликозилирования, что необычно для расположения его Fv-области и очень важно для 45 связывания антитела B4. Для содержащей замены последовательности Fc-области человеческого IgG₁, участок N-гликозилирования по аминокислотному остатку Asn (N) в ак298 был удален при замене аминокислоты на His (H), т.е. N298H. Эта мутация,

как было обнаружено, устраняла IgG-опосредованную комплементзависимую цитотоксичность (CdC) и истощение CD4-положительных Т-клеток в присутствии антитела B4.

Фигура 5. Полная аминокислотная последовательность легкой цепи Fv-области

5 антитела dB4C7 (SEQ ID NO: 8), которое используется в UB-421. Последовательности, представляющие соответствующие области CDR1, 2 и 3, полученные из его исходного мышиного антитела B4, подчеркнуты (Таблица 4, SEQ ID NO: 4-6). Вариабельные и константные области соответственно заштрихованы светло-серым и темно-серым цветами (SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно).

10 **Фигура 6.** Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи дополнительно улучшенного гуманизированного антитела (SEQ ID NO: 9) с более длительным полупериодом существования в результате аминокислотной замены в положениях тяжелой цепи Fc-области ак253, ак255 и ак257 с Met (M) на Tyr (Y), т.е. M253Y, Ser (S) на Thr (T), т.е. S255T и Thr (T) на Glu (E), т.е. T257E, соответственно.

15 **Фигура 7.** Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного мАт антитела dB4 (SEQ ID NO: 10), включающая вариабельные аминокислоты, обсуждаемые на Фигурах 4 и 6.

20 **Фигура 8.** График, на котором показана аффинность связывания (концентрация антитела) и связывающая способность (свободное и связанное антитело) мАт B4 с 25 поверхностным CD4 на клетках HPB-ALL после трех проходов антитела над клетками.

Фигура 9. График, на котором сравниваются аффинности связывания мАт B4 (---) и мАт dB4 (-) с захватывающей смесью растворимого CD4 (sCD4) и пептида p2704a, нанесенных на планшеты ELISA. Аффинности связывания определяли при использовании мАт B4 и мАт dB4 для конкурентного ингибиования связывания B4-биотина и dB4C7-Alexa, соответственно, с захватывающей смесью.

30 **Фигура 10.** График, на котором сравниваются аффинности связывания мАт B4 (---) и мАт dB4 (-) с CD4 на клетках HPB-ALL. Аффинности связывания определяли с помощью FACS при использовании мАт B4 и мАт dB4 для конкурентного ингибиования связывания B4-биотина и dB4C7-Alexa, соответственно, с поверхностью CD4 на клетках HPB-ALL.

Фигура 11. График, на котором сравниваются аффинности связывания мАт dB4 (--) и gp120MN (-) с CD4 на клетках HPB-ALL. Аффинности связывания определяли с помощью FACS при использовании мАт dB4 и gp120MN для конкурентного ингибиования связывания dB4C7-Alexa с поверхностью CD4 на клетках HPB-ALL.

35 **Фигура 12.** График, на котором показано температурно-зависимое связывание (MFI) мАт dB4C7 с МКПК CD4+ Т-клетками.

40 **Фигура 13.** График, на котором показаны средние проценты ($\pm SD$) незанятых рецепторов CD4 (-) и рецепторов CD4, занятых/связанных с мАт dB4 (---), из образцов крови шести неинфицированных лиц и в зависимости от концентрации мАт dB4. Незанятые рецепторы были обнаружены при связывании dB4C7-Alexa со свободными связывающими участками на поверхности CD4+ Т-клеток крови, тогда как занятые мАт dB4 рецепторы были обнаружены с помощью FITC-меченного антитела козы против huIgG.

45 **Фигура 14.** Гистограмма, на которой показано действие существующей антиретровирусной терапии (кАРТ) лекарственным средством тенофовир в отношении бесклеточной и межклеточной передачи ВИЧ (Sigal, A. et al., 2011). На оси Y представлен индекс передачи от мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных из различных источников инфекции, в присутствии или отсутствие

тенофовира (Sigal, A. et al., 2011).

Фигура 15. Гистограмма, на которой показана реактивация вируса в покоящихся МКПК (при измерении продукции p24 gag ВИЧ-1), индуцированная следующими стимулами: нестимулированные (столбец 1), РНА (столбец 2), лизат инактивированного ВИЧ (иВИЧ) (столбец 3), моноклональное антитело, направленное на CDR2 область домена 1 CD4 (столбец 4), моноклональное антитело, направленное на область CDR3 домена 1 CD4 (столбец 5), моноклональное антитело, направленное на домены 1/2 CD4 (столбец 6), иВИЧ в присутствии растворимого CD4 (столбец 7), моноклональное антитело, направленное на область CDR2 домена 1 CD4 в присутствии растворимого CD4 (столбец 8), моноклональное антитело, направленное на область CDR3 домена 1 CD4 в присутствии растворимого CD4 (столбец 9) и моноклональное антитело, направленное на домены 1/2 CD4 в присутствии растворимого CD4 (столбец 10), как показано в обозначениях к фигуре (адаптировано из Bryant L., et al., 1999).

Фигура 16. График, на котором показано конкурентное ингибирование связывания биотинилированного В4 с rsCD4 поликлональными антителами против ВИЧ RC при измерении с помощью ELISA.

Фигура 17. График, на котором показано титрование антитела мАт dB4 и поликлональных антител против ВИЧ RC с поверхностным CD4 на МКПК. Титрование антитела определяли как % связывания CD4 в зависимости от концентрации антитела в мкг/мл.

Фигуры 18а-18г. Анализ ингибирования мАт dB4 и поликлональными антителами против ВИЧ RC индуцированной суперантigenом SEB продукции цитокинов IL2 и IFN- γ пролиферирующими CD4+ и CD8+ Т-клетками при лечении наивных ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных субъектов. Показано ингибирование мАт dB4 и поликлональными антителами против ВИЧ RC продукции IL2 индуцированными суперантigenом пролиферирующими CD4+ Т-клетками для ВИЧ-отрицательных (Фиг. 18а) и ВИЧ-положительных (Фиг. 18б) субъектов. Также показано ингибирование мАт dB4 и поликлональными антителами против ВИЧ RC продукции IL2 индуцированными суперантigenом пролиферирующими CD8+ Т-клетками для ВИЧ-отрицательных (Фиг. 18в) и ВИЧ-положительных (Фиг. 18г) субъектов. Показано ингибирование мАт dB4 и поликлональными антителами против ВИЧ RC продукции IFN- γ индуцированными суперантigenом пролиферирующими CD4+ Т-клетками для ВИЧ-отрицательных (Фиг. 18д) и ВИЧ-положительных (Фиг. 18е) субъектов. Также показано ингибирование мАт dB4 и поликлональными антителами против ВИЧ RC продукции IFN- γ индуцированными суперантigenом пролиферирующими CD8+ Т-клетками для ВИЧ-отрицательных (Фиг. 18ж) и ВИЧ-положительных (Фиг. 18з) субъектов.

Фигуры 19а-19с. Графики, на которых показана защита обыкновенных шимпанзе от ВИЧ-инфекции при введении мАт В4 до воздействия (Фиг. 19а) и после воздействия (Фиг. 19б) первичного изолята DH12 ВИЧ-1 (ВИЧ-1_{DH12}), при измерении копий/мл РНК ВИЧ-1 в МКПК в динамике после инфицирования. Также показан график, на котором показаны результаты контрольного животного, которого подвергали воздействию ВИЧ-1_{DH12} без введения антитела (Фиг. 19с). Стрелки, направленные вниз, указывают начало исследования, когда вводили мАт В4, до или через один час после заражения ВИЧ-1_{DH12}.

Фигуры 20а и 20б. Графики, на которых показана вирусная нагрузка ВИЧ не получавших и получавших мАт В4 инфицированных ВИЧ-1 шимпанзе, при измерении

копий/мл РНК ВИЧ-1 в динамике. На **Фиг. 20а** сравнивается продолжительность вирусемии плазмы у шимпанзе X356, получавшего три инфузии мАт В4 (закрашенные кружки), с не получавшим лечение контрольным шимпанзе X084, который ранее получал одну дозу мАт В4 в предыдущем исследовании (незакрашенные кружки).

5 На **Фиг. 20б** сравнивается продолжительность вирусемии плазмы у шимпанзе X356, получавшего три инфузии мАт В4 (закрашенные кружки), с не получавшим лечение контрольным шимпанзе X259, который не получал предыдущую дозу мАт В4 в (незакрашенные кружки).

Фигура 21. График, на котором сравнивается аффинность связывания мАт dB4 с **10** CD4-положительными Т-клетками человека (---) и бабуина (-).

Фигуры 22а и 22б. Графики, на которых показано среднее Log_{10} изменение по РНК **15** ВИЧ-1 в зависимости от дня исследования для больных, получавших одно введение лекарственного средства на основе антитела, UB-421 (mAb dB4C7), в клиническом исследовании Фазы I с увеличением дозы (1, 5, 10 и 25 мг/кг). **Фиг. 22а** является графиком, на котором показано снижение вирусной нагрузки, продемонстрированное каждой из доз в течение исследования. **Фиг. 22б** является графиком, на котором показаны средний и максимальный индивидуальный нижний уровень для каждой из доз.

20 **Фигуры 23а-23с.** Графики, на которых показано теоретическое сравнение эффективности UB-421 (mAт dB4C7) и данные по эффективности, опубликованные ранее для TMB-355 (ранее известного как TNX-355; Kuritzkes, D.R., et al., 2004, Фигура 1). **Фиг. 23а** является графиком, на котором сравнивается снижение вирусной нагрузки, наблюдаемое после однократного введения 5 мг/кг UB-421 и 3 мг/кг TMB-355. **Фиг. 23б** является графиком, на котором сравнивается снижение вирусной нагрузки, наблюдаемое после однократного введения 10 мг/кг UB-421 или TMB-355. **Фиг. 23с** является графиком, **25** на котором сравнивается снижение вирусной нагрузки, наблюдаемое после однократного введения 25 мг/кг UB-421 или TMB-355.

Фигуры 24а и 24б. Графики, на которых показаны средние количества/ мм^3 МКПК **30** CD4 Т-клеток у субъектов, получающих введение UB-421 (mAт dB4C7) 10 мг/кг раз в неделю (**Фиг. 24а**) или 25 мг/кг раз в две недели (**Фиг. 24б**) в течение восьминедельного периода лечения. Стабильные количества CD4 Т-клеток обнаруживали у получавших UB-421 больных с использованием биотинилированного антитела, направленного против домена 2 CD4.

35 **Фигуры 25а-25д.** Графики, на которых показана клиническая эффективность лечения UB-421, при измерении снижения вирусной нагрузки (верхние панели), и фармакокинетика UB-421, при измерении концентрации в сыворотке в мкг/мл (нижние панели), в течение клинического исследования Фазы IIa. Соответствующие данные представлены для следующих репрезентативных больных: больной 1-1-01, получавший еженедельные введения 10 мг/кг UB-421 (**Фиг. 25а**); больной 1-1-02, получавший еженедельные введения 10 мг/кг UB-421 (**Фиг. 25б**); больной 1-2-03, получавший введения **40** раз в две недели 25 мг/кг UB-421 (**Фиг. 25с**); и больной 1-2-06, получавший введения раз в две недели 25 мг/кг UB-421 (**Фиг. 25д**). Продолжительность связывания UB-421 на МКПК CD4+ клетках, указывающее на полное покрытие клеток, заштрихована серым.

45 **Фигуры 26а и 26б.** Графики, на которых показано теоретическое сравнение снижения вирусной нагрузки, наблюданного в клиническом исследовании Фазы IIa с использованием UB-421, и снижения вирусной нагрузки, наблюданного в подобных исследованиях с TMB-355 (ибализумаб, ранее TNX-355), выполненных другими исследователями (Jacobson, J.L., et al., 2009; Toma, J., et al., 2011; и Pace, C.S., et al., 2013). На **Фигуре 26а** обобщенно представлены изменения вирусной нагрузки, наблюдаемые

у субъектов, получавших 10 мг/кг и 25 мг/кг UB-421, тогда как на **Фигуре 26б** обобщенно представлены изменения вирусной нагрузки, наблюдаемые у субъектов, получавших такие же уровни дозы ТМВ-355.

Фигура 27. Схема, на которой показан способ лечения в группах больных ВИЧ с

- 5 применением монотерапии UB-421 в качестве замены терапии ВААРТ при лечении наивных больных ВИЧ и стабилизированных лечением ВААРТ больных ВИЧ.

Фигура 28. Схема, на которой показан способ лечения в группах больных ВИЧ с применением UB-421 в сочетании с терапией ВААРТ для функционального излечения ВИЧ-инфекции при лечении наивных больных ВИЧ; стабилизированных лечением

- 10 ВААРТ больных ВИЧ; и больных ВИЧ, у которых лечение ВААРТ было неэффективным.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание направлено на композиции и способы предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции. Один из аспектов настоящего

- 15 описания относится к антителам, направленным против CD4, их лекарственным формам и способам, в которых такие лекарственные формы применяются для предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции.

Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, служат исключительно в организационных целях и не должны быть истолкованы как ограничение описанных 20 объектов. Все ссылки или части ссылок, цитируемые в настоящей заявке, прямо включены в настоящее описание посредством отсылки в полном объеме и в любых отношениях.

CD4

CD4 (клластер дифференцировки 4) является гликопротеином (UniProtKB/Swiss-Prot:

- 25 P01730.1), обнаруженным на поверхности иммунных клеток, таких как Т-хелперные клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки (веб-сайт: en.wikipedia.org/wiki/CD4). CD4 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов и имеет четыре иммуноглобулиновых домена (D1-D4), которые расположены на внешней поверхности клетки. Домены CD4, D1 и D3, напоминают вариабельные домены (IgV)

- 30 иммуноглобулина; тогда как D2 и D4 напоминают константные домены (IgC) иммуноглобулина. CD4 использует свой домен D1 для взаимодействия с β2-доменом молекул МНС II класса. Т-клетки, экспрессирующие молекулы CD4 на своей поверхности, таким образом, являются специфичными в отношении антигенов, презентируемых МНС II. Короткий цитоплазматический/внутриклеточный хвост CD4 содержит 35 специальную аминокислотную последовательность, которая позволяет ему взаимодействовать с молекулой lck.

Первый внеклеточный домен CD4 обладает гомологией с иммуноглобулином в трех определяющих комплементарность областях (CDR-областях), подобно таким областям из цепей иммуноглобулина. Домен 1 и домен 2 внеклеточной области молекулы CD4, 40 как обнаружили, вносят вклад в связывающие участки для молекул МНС II класса; однако один домен 1, как обнаружили, участвовал в связывании ВИЧ и образовании синцитиев. В частности, связывающий участок для гликопротеина оболочки ВИЧ, gp120, как обнаружили, был локализован в CDR2-подобной петле домена 1.

ВИЧ-1 использует CD4 для входа в Т-клетки организма-хозяина и достигает этого 45 посредством своего белка вирусной оболочки, известного как gp120. Связывание с CD4 вызывает изменение конформации gp120, позволяющее ВИЧ-1 связываться с рецепторами хемокинов CCR5 или CXCR4, экспрессированными на клетке-хозяине. После структурного изменения в другом вирусном белке (gp41), ВИЧ вводит слитый

пептид в клетку-хозяина, что позволяет наружной мембране вируса слиться с клеточной мембраной. ВИЧ-инфекция приводит к постепенному снижению количества Т-клеток, экспрессирующих CD4.

Антитело

5 Один из аспектов настоящего описания относится к антителу, направленному против CD4, его композициям и способам, в которых такие композиции применяются для предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции.

10 Антитело согласно настоящему описанию широко охватывает интактные молекулы антител, которые включают интактные поликлональные, моноклональные, моноспецифические, полиспецифические, химерные, деиммунизированные, гуманизированные, человеческие, приматизированные, одноцепочечные, однодоменные, синтетические и рекомбинантные антитела и фрагменты антител, которые обладают нужной активностью или функцией.

15 Антитело согласно настоящему описанию распознает домен 1 CD4. В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывается с областью CDR2 в домене 1 CD4.

20 Антитело согласно настоящему описанию может быть получено любым стандартным способом. В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело получают при иммунизации животного (например, мыши, собаки, морской свинки, свиньи, козы, лошади и т.д.) рекомбинантным белком CD4, фрагментами рекомбинантного белка CD4 или клетками, экспрессирующими CD4 на поверхности. В альтернативе антитело может быть синтезировано химически.

25 В некоторых вариантах осуществления антитело получают при иммунизации животного пептидом, содержащим аминокислотную последовательность домена 1 CD4. Например, поликлональные антитела могут быть получены при иммунизации животного пептидом или комбинацией пептидов, содержащих аминокислотную последовательность области CDR2 домена 1 CD4. В некоторых вариантах осуществления пептид содержит ак39-66 CD4, который также известен как рецепторный комплекс ВИЧ ("ВИЧ RC"), поскольку ВИЧ связывается с этой частью CD4. В определенном варианте 30 осуществления пептид RC ВИЧ сделан циклическим посредством дисульфидной связи.

35 В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела получены при иммунизации животного циклическим пептидом RC ВИЧ. Термин "поликлональные антитела против ВИЧ RC" при использовании в настоящем описании относится к иммунным сывороткам, направленным против циклического пептида, содержащего ак39-66 области CDR2 домена 1 CD4.

40 В других вариантах осуществления антитело получают при иммунизации животного CD4-положительными клетками. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело было получено при иммунизации мышей BALB/c интактными, неинфицированными CD4+ человеческими клетками HPB-ALL, линией острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза. Это антитело более подробно обсуждается в патентах США 5,912,176 и 6,090,388 (Wang) и в статье Wang et al., 1999, которые полностью включены посредством отсылки.

45 В других вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в Списке последовательностей. Настоящее описание охватывает гомологи и функциональные аналоги антитела, содержащего аминокислотные последовательности, содержащиеся в Списке последовательностей.

Функциональный аналог раскрытоого антитела включает варианты

последовательностей и гомологи, которые сохраняют по существу такие же функциональные свойства (распознавание при связывании, аффинность связывания и т.д.), как у исходного антитела. Например, вариант антитела, который является функциональным аналогом или гомологом, может иметь консервативную замену в

5 аминокислотном положении; изменение общего заряда; ковалентное присоединение к другой молекуле; или небольшие добавления, вставки, делеции или консервативные замены и/или их любую комбинацию. Таким образом, варианты антител, функциональные аналоги и гомологи антител будут распознавать и связываться с CD4 и могут применяться для лечения ВИЧ у субъектов.

10 В одном варианте осуществления функциональный аналог или гомолог антитела обычно обладает по меньшей мере приблизительно 50% идентичностью последовательности с антителом, содержащим аминокислотную последовательность, раскрытую в Списке последовательностей. В вариациях данного варианта осуществления функциональный аналог или гомолог антитела обладает по меньшей мере

15 приблизительно 50%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 99% идентичностью с антителом, содержащим аминокислотную последовательность, раскрытую в Списке последовательностей.

Консервативные замены являются такими заменами, когда один аминокислотный
20 остаток заменяют другим аминокислотным остатком с подобными химическими свойствами. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; положительно заряженные (основные) аминокислоты включают
25 аргинин, лизин и гистидин; и отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

В другом варианте осуществления функциональный аналог антитела может быть модифицирован добавлениями или делециями аминокислот на N-конце, C-конце и/или вставками в середину последовательности. В различных вариантах осуществления
30 изобретения добавления или делеции присутствуют на N-конце или C-конце пептида. Добавления или делеции могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков. Такие добавления или делеции могут составлять аминокислотные последовательности, которые не присутствуют в последовательностях, содержащихся в Списке последовательностей, не изменяют общих
35 функциональных свойств антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему описанию мечено или помечено химическим соединением. Например, антитело может быть помечено биотином, спайсерными плечами, зондами (например, FITC, PE, TRITC, DyLight Fluors, Alexa, GFP, R-фикаэритрином, квантовыми точками и т.д.), конъюгатами
40 ферментов и их комбинациями. В определенном варианте осуществления антитело помечено биотином или флуоресцентным зондом.

В определенных вариантах осуществления антитело может быть модифицировано посредством процесса, известного как деиммунизация. Термин "деиммунизация" при использовании в настоящем описании обычно относится к процессу изменения частей
45 антитела таким образом, чтобы его можно было вводить животному без развития у животного иммунного ответа. В частности, деиммунизация включает процесс обнаружения и удаления частей аминокислотной последовательности антитела, которые могут быть иммуногенными (например, Т-клеточные эпитопы) у конкретного

животного, которому вводят антитело. Этот процесс может быть выполнен посредством комбинированного применения методов иммунологии и молекулярной биологии. Этот процесс был описан ранее (например, Jones, T.D., et al. 2009). В случае деиммунизации антител мутации для удаления Т-клеточных эпитопов обычно можно вводить без значительного уменьшения аффинности связывания антитела.

Термин "гуманизированное" при использовании в настоящем описании относится к антителу, которое первоначально было продуцировано не относящимся к человеку видом, белковая последовательность которого была изменена (деиммунизирована) таким способом, который позволяет устраниТЬ иммуногенность антитела при его введении человеку. В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело деиммунизировано для применения у человека путем замены константных областей человеческими константными областями и/или путем экспрессии генов, кодирующих эти антитела, в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело имеет аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные в **Таблице 4**.

Термин "мАт B4" или "B4", или "мышиное B4" при использовании в настоящем описании относится к мышенному моноклональному антителу, имеющему аминокислотные последовательности областей CDR1, 2, 3 тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 1-6, соответственно (**Таблица 4**). Это мышиное моноклональное антитело, как было показано, распознает CD4 и может ингибировать вход ВИЧ. Структурные и функциональные свойства данного антитела обсуждаются более подробно в Примерах, которые следуют ниже.

Термин "мАт dB4" или "dB4" при использовании в настоящем описании относится к человеческому деиммунизированному антителу, полученному из мАт B4. Человеческое деиммунизированное мАт dB4 имеет аминокислотные последовательности областей CDR1, 2, 3 тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 1-6, соответственно (**Таблица 4**). В некоторых вариантах осуществления легкая цепь мАт dB4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, как показано на **Фигуре 5**. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь мАт dB4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, как показано на **Фигуре 4**. В различных вариантах осуществления тяжелая цепь мАт dB4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, как показано на **Фигуре 6**. МАт B4 может быть деиммунизировано любым подходящим методом, известным в уровне техники. В одном варианте осуществления мАт B4 деиммунизировано для применения человеком согласно способу, описанному в патентах США 7,501,494 и 7,872,110, которые полностью включены посредством отсылки. В конкретном варианте осуществления человеческое деиммунизированное мАт dB4 получают путем удаления и замены константных областей мышнного антитела (С_H и С_κ) мАт B4 и с константными областями человеческого IgG1. МАт dB4 охватывает dB4, продуцируемое любым подходящим клеточным клоном. В определенном варианте осуществления мАт dB4 продуцировано клоном 7.

Термин "мАт dB4C7" или "dB4C7" при использовании в настоящем описании относится к мАт dB4, экспрессированному клоном 7, содержащим рекомбинантные гены B4DIVHv1/VK1CHO#7, который был описан ранее в патентах США 7,501,494 и 7,872,110, которые полностью включены посредством отсылки. Клон C7, как было показано, продуцировал высокие количества антитела мАт dB4. В частности, мАт B4C7 является человеческим деиммунизированным антителом, легкая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (**Фигура 5**), а тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (**Фигура 4**). Кроме того, остаток

Asn (N) в положении 298 в мАт dB4C7 заменен His (H) для удаления участка N-гликозилирования с устранием, таким образом, IgG-опосредованной комплементзависимой цитотоксичности (CdC) для предотвращения истощения CD4-положительных Т-клеток в присутствии антитела B4.

⁵ Термин "UB-421" при использовании в настоящем описании относится к мАт dB4C7, которое применяется в подходящей форме, вводимой людям.

Антитело согласно настоящему описанию также может быть описано своими интересующими и уникальными функциональными свойствами.

Например, раскрытое антитело производит мощное конкурентное ингибиование ¹⁰ входа ВИЧ посредством своего связывания с доменом 1 CD4. В частности, раскрытое антитело имеет почти 100% максимальный процент ингибиции (МПИ) во всех протестированных вириусах псевдотипа Env, со значениями IC₅₀, сгруппированными вблизи двух концентраций; одно от 0,01 до 1 мкг/мл и второе около 10 мкг/мл.

¹⁵ Связывающая активность раскрытоого антитела приблизительно в два log выше (т.е. в 100× более сильное связывание), чем аффинность связывания с CD4, демонстрируемая белком оболочки ВИЧ gp120. Кроме того, средняя Kd раскрытоого антитела согласно оценке составляла $5,6 \times 10^{-11}$ М (диапазон: $3,1-8,1 \times 10^{-11}$ М), и Bmax согласно оценке составляло $1,2 \times 10^6$ Ат на клетку (диапазон: $0,93-1,4 \times 10^6$).

²⁰ Свойство конкурентного ингибиции раскрытоого антитела было показано как в бесклеточных, так и в межклеточных системах. Раскрытое антитело связывается с рецепторами CD4 с по меньшей мере в 50 раз более высокой аффинностью, чем в случае белка оболочки ВИЧ-1 gp120 MN. Кроме того, раскрытое антитело связывается с CD4 с более высокой аффинностью и специфичностью по сравнению с другими ²⁵ коммерческими антителами, такими как Leu3a.

Раскрытое антитело также может ингибировать индуцированную антигеном пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов (IL2 и IFN-гамма) CD4-положительных Т-клеток, которые участвуют в патогенном цикле пироптоза. Такие высокоаффинные моноклональные антитела к CD4 ингибирывают индуцированную антигеном, таким как ³⁰ суперантigen SEB (стафилококковый энтеротоксин B, SEB), активацию CD4-положительных Т-клеток и продукцию цитокинов (например, IL2 и IFN-γ). Такая индуцированная антигеном активация, приводящая к продукции цитокинов в неактивных CD4+ Т-клетках с abortивной ВИЧ-инфекцией, приведет к пироптозу указанных ³⁵ неактивных CD4+ Т-клеток и соседних нормальных покоящихся CD4-положительных клеток, что приведет к последующему массовому истощению CD4+ Т-клеток и, таким образом, СПИДу.

Раскрытое антитело также обладает способностью реактивировать покоящиеся CD4-положительные Т-клетки. Это свойство особенно полезно для реактивации латентных резервуаров ВИЧ в покоящихся Т-клетках, чтобы сделать эти клетки восприимчивыми к лечению антиретровирусными средствами. Такие высокоаффинные антитела к CD4 способны активировать покоящиеся ВИЧ-инфицированные клетки для высвобождения ВИЧ. Реактивация ВИЧ-инфицированных покоящихся CD4+ Т-клеток позволяет проводить комбинированную терапию, включающую антитело настоящего изобретения с ВААРТ, у ВИЧ-инфицированных больных, обеспечивающую ⁴⁵ функциональное излечение.

Дополнительные структурные и функциональные свойства раскрытых антител представлены в Примерах, которые следуют ниже.

Изготовление лекарственных форм

Настоящее описание также направлено на фармацевтические композиции, которые могут применяться для предотвращения, лечения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы содержат антитела, направленные против CD4. В определенных вариантах осуществления

настоящее описание относится к фармацевтическим композициям, включающим высокоаффинные моноклональные антитела к CD4, которые направлены на участки в или около области CDR2 домена 1 CD4. Связывающая активность (EC_{50}) таких антител приблизительно в два log выше (т.е. в 100x более сильное связывание), чем аффинность связывания к CD4, демонстрируемая белком оболочки ВИЧ gp120 (EC_{50} для gp120=97 нМ).

Фармацевтические композиции раскрытых белков антител могут быть приготовлены при смешивании белка антитела с дополнительными фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, изотонические вещества и т.п. Носитель может быть жидкостью, 15 полутордым веществом, например, пастами или твердыми носителями. Примеры носителей включают воду, растворы хлорида натрия или другие буферы (такие как фосфатный, цитратный буферы), масло, спирт, белки (такие как сывороточный альбумин, желатин), углеводы (такие как моносахарины, дисахарины и другие углеводы, включающие глюкозу, сахарозу, трегалозу, маннозу, маннит, сорбит или декстрины), гель, липиды, липосомы, смолы, пористые матрицы, связующие вещества, наполнители, покрытия, стабилизаторы, консерванты, антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин, хелатообразователи, такие как ЭДТА; образующие соль 20 противоионы, такие как натрий; неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ) или их комбинации.

Лекарственная форма может содержать больше одного действующего вещества. Например, лекарственная форма может содержать одно или более антител и/или одно или более дополнительных полезных соединений для предотвращения и лечения ВИЧ-инфекций. Действующие вещества могут быть объединены с носителем любым удобным и практическим образом, например, путем смешивания, растворения, сус펜сирования, эмульгирования, инкапсулирования, абсорбции и т.п., и могут быть изготовлены в виде таких лекарственных форм, как таблетки, капсулы, порошок (включая лиофилизованный порошок), сироп, супензии, которые подходят для инъекций, приема внутрь, инфузии и т.п. Также могут быть изготовлены препараты с 25 пролонгированным высвобождением.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит мАт dB4C7 для применения человеком. Фармацевтическая композиция, содержащая мАт dB4C7, может быть приготовлена в подходящем буфере, в том числе, без ограничения, цитратном, фосфатном, Трис, бис-Трис и т.д., при pH 6,0-7,0, и может также содержать вспомогательные вещества, такие как сахара (от 50 мМ до 500 мМ 30 сахарозы, трегалозы, маннита или их смесей), поверхностью-активные вещества (например, 0,025-0,5% Tween 20 или Tween 80) и/или другие реагенты. В определенном варианте осуществления лекарственная форма содержит мАт dB4C7 в 20 мМ глицина и 0,05% (об/об) Tween (полисорбата 20) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), pH 6,5. В другом определенном варианте осуществления лекарственные формы с высокой 35 концентрацией мАт dB4 также были подготовлены для применения в определенных областях, включая подкожные инъекции, которые содержали 10 мМ гистидина.

Может быть изготовлена лекарственная форма, содержащая различные количества антитела. Как правило, лекарственные формы для введения субъекту содержат от

приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы могут содержать от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл; от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл; от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл; или от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл антитела. В определенных вариантах осуществления лекарственные формы содержат приблизительно 1,0 мг/мл, приблизительно 5,0 мг/мл, приблизительно 10,0 мг/мл или приблизительно 25,0 мг/мл антитела.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим человеческие, гуманизированные или химерные моноклональные антитела против CD4, направленно взаимодействующие с областью CDR2 домена 1 CD4, с вышеописанными связывающими свойствами, которые демонстрируют конкурентное ингибирирование входа ВИЧ, а также активацию CD4+ Т-клеток, в качестве иммунотерапии у больных с ВИЧ-инфекцией.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к

фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые служат в качестве монотерапии, которая может снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов при уровне антитела в сыворотке выше 10 мкг/мл.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые служат в качестве монотерапии, которая может снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов при уровне антитела в сыворотке выше 10 мкг/мл, и поддерживают стабильное количество Т-клеток CD4 в течение 12-недельного периода лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, в качестве монотерапии, в таком лечении могут снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов в течение 12-недельного периода лечения.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в лечении наивных больных ВИЧ приведут к функциональному излечению больных.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели больным со стабилизированной вирусной нагрузкой на фоне применения ВААРТ приведут к функциональному излечению больных.

Противовирусные средства

Настоящее описание также включает противовирусные средства, которые могут применяться в способах лечения, предотвращения и функционального излечения ВИЧ-инфекции.

Противовирусные средства включают любое средство (химическое или

- 5 биологическое), которое является эффективным при ингибиции формирования и/или репликации ВИЧ у млекопитающего. Примеры противовирусных средств включают, без ограничения перечисленными, ингибиторы входа/слияния (например, маравирок, энфувиртид); нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НтРТИ) (например, зидовудин,
- 10 абакавир, ламивудин, эмтрицитабин и тенофовир); ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ) (например, невирапин, эфавиренз, этривирин и рилпивирин); ингибиторы интегразы, также известные как ингибиторы ядерного переноса цепи интегразой или INSTI (например, ралтегравир, долутегравир); ингибиторы протеаз (например, саквинавир, саквинавира мезилат, фосампренавир, типранавир,
- 15 лопинавир, индинавир, нелфинавир, амренавир, ритонавир, дарунавир, атазанавир, бевиримат, вивекон); ингибиторы созревания вируса; средства, воздействующие на экспрессию генов ВИЧ; средства, воздействующие на ключевые гены клетки-хозяина и продукты генов, участвующие в репликации ВИЧ; и другие средства против ВИЧ; иРНК средства; антисмысловую РНК; векторы, экспрессирующие иРНК средства или
- 20 антисмысловую РНК; ПНК и противовирусные антитела; и их комбинации.

Противовирусные средства могут применяться индивидуально или в комбинации.

Применение противовирусных средств в комбинации известно как антиретровирусная терапия (АРТ), комбинированная антиретровирусная терапия (кАРТ) или высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ). Антиретровирусные (ARV)

- 25 средства широко классифицируются по фазе жизненного цикла ретровируса, которую ингибирует лекарственное средство. Типичные комбинации включают 2 НИОТ в качестве "каркаса" в сочетании с 1 ННИОТ, PI или INSTI в качестве "основы". В некоторых вариантах осуществления используются такие комбинации противовирусных средств, как Комбивир, Тризивир, Калетра, Эпзиком, Трувада, Атриплла, Комплера, Стрибильд, Триумек.

Способы лечения, предотвращения и функционального излечения

Настоящее описание также направлено на способы лечения, предотвращения и функционального излечения ВИЧ-инфекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы содержат антитела, направленные против CD4.

- 35 В другом аспекте антитело, раскрытое в настоящей заявке, необязательно представленное в фармацевтически приемлемом носителе, может применяться для лечения, предотвращения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции у субъекта, а также предотвращения передачи ВИЧ.

Термин "лечение" ВИЧ-инфекции относится к эффективному ингибированию ВИЧ-

- 40 инфекции с целью задержки начала, замедления прогрессии, снижения вирусной нагрузки и/или уменьшения тяжести симптомов, вызванных ВИЧ-инфекцией. Лечение включает предшествующий и прошедший контакт с ВИЧ.

Термин "предотвращение" ВИЧ-инфекции означает, что начало ВИЧ-инфекции отсрочено, и/или возникновение или вероятность возникновения ВИЧ-инфекции

- 45 уменьшены или устраниены. Термин "предотвращение" передачи ВИЧ означает, что возникновение или вероятность возникновения ВИЧ, передающегося от одного лица другому (например, от ВИЧ-положительной женщины ребенку во время беременности, родов или родоразрешения, или кормления грудью), уменьшены или устраниены.

Термин "субъект" относится к любому субъекту-примату, в том числе человеку, макаку-резусу, бабуину и шимпанзе.

Для лечения и/или предотвращения ВИЧ-инфекции терапевтическое количество антитела, раскрытое в настоящей заявке, вводят нуждающемуся субъекту.

5 Термин "терапевтически эффективное количество" означает дозировку, требуемую для ингибирования ВИЧ-инфекции, чтобы лечить и/или предотвращать ВИЧ-инфекцию. Дозировка антитела зависит от статуса заболевания и других клинических факторов, таких как вес и состояние субъекта, реакция субъекта на терапию, тип лекарственных форм и путь введения. Точная дозировка, являющаяся терапевтически эффективной и
10 неопасной, может быть определена специалистами.

Как правило, подходящая доза антитела для введения взрослым людям находится в диапазоне приблизительно 3-50 мг/кг массы тела субъекта с типичным используемым начальным диапазоном, находящимся в диапазоне приблизительно 5-25 мг/кг массы тела субъекта. Подходящие дозировки также включают приблизительно 5,0 мг/кг,
15 приблизительно 10,0 мг/кг или приблизительно 25,0 мг/кг массы тела больного.

20 Терапевтические композиции, содержащие человеческое моноклональное антитело согласно настоящему изобретению, обычно вводят внутривенно, например, при инъекции стандартной дозы. Стандартная доза обычно относится к терапевтической композиции настоящего изобретения, которая также относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичной вводимой дозы для субъекта, причем каждая единица содержит установленное количество активного материала, вычисленное так, чтобы оказывать требуемое терапевтическое воздействие, в сочетании с необходимым разбавителем; т.е. носителем или растворителем.

25 Композиции вводят способом, совместимым с вводимой лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, которое будут вводить, зависит от субъекта, проходящего лечение, способности организма субъекта утилизировать действующее вещество и от степени требуемого терапевтического эффекта. Точные количества действующего вещества, которые потребуется вводить, зависят от решения практикующего специалиста и являются специфическими для каждого лица. Впрочем,
30 подходящие диапазоны вводимых доз для системного введения раскрыты в настоящем описании и зависят от пути введения. Подходящие схемы введения также отличаются, но характеризуются начальным введением, которое сопровождается повторными дозами с интервалами длительностью один или более часов до последующей инъекции или другого введения. В альтернативе предусмотрена непрерывная внутривенная
35 инфузия, достаточная, чтобы поддерживать концентрации в крови в диапазонах, установленных для методов терапии *in vivo*.

Способ лечения, предотвращения и/или функционального излечения ВИЧ-инфекции у субъекта включает введение субъекту эффективного количества лекарственной формы, содержащей антитело. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму
40 предоставляют субъекту в однократном введении. В других вариантах осуществления лекарственную форму предоставляют субъекту в многократных введениях. В случае предоставления лекарственной формы в многократных введениях, лекарственная форма может быть введена один раз в день, один раз в неделю, каждые две недели (раз в две недели) или один раз в месяц. В определенном варианте осуществления, когда схема
45 лечения соответствует введению один раз в неделю, лекарственную форму вводят субъекту в дозировке приблизительно 5,0 мг/кг массы тела субъекта. В другом варианте осуществления, когда схема лечения соответствует введению раз в две недели, лекарственную форму вводят субъекту в дозировке приблизительно 25,0 мг/кг массы

тела субъекта.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы, содержащие моноклональное антитело, демонстрировали высокий профиль безопасности и хорошо переносились при многократном еженедельном введении субъектам доз 5 мг/кг или 25 мг/кг в течение в общей сложности 8 недель. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело можно вводить субъектам в течение нескольких часов после заражения ВИЧ в дозе 5 мг/кг, чтобы обеспечить стерилизующее излечение от ВИЧ-инфекции. В других вариантах осуществления моноклональное антитело может быть введено субъекту в течение нескольких дней после заражения ВИЧ в дозе 5 мг/кг, чтобы обеспечить функциональное излечение от ВИЧ-инфекции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены больным ВИЧ в/в или п/к путем в качестве иммунотерапии для снижения вирусной нагрузки. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим человеческие, гуманизированные или химерные, моноклональные антитела против CD4, направленно взаимодействующие с областью CDR2 домена 1 CD4, с вышеописанными связывающими свойствами, которые демонстрируют конкурентное ингибирирование входа ВИЧ, а также активацию CD4+ Т-клеток, в качестве иммунотерапии у больных с ВИЧ-инфекцией.

В других определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены больным ВИЧ в/в или п/к путем в качестве иммунотерапии для снижения вирусной нагрузки в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые служат в качестве монотерапии, которая может снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов при уровне антитела в сыворотке выше 10 мкг/мл.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые служат в качестве монотерапии, которая может снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов при уровне антитела в сыворотке выше 10 мкг/мл и поддерживать стабильное количество CD4 Т-клеток в течение 12-недельного периода лечения.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в качестве монотерапии, в таком лечении могут снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов в течение 12-недельного периода лечения.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к

фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в качестве монотерапии, в 5 таком лечении могут снижать вирусную нагрузку до неподдающегося обнаружению уровня у проходящих лечение субъектов без восстановления вирусной нагрузки, пока уровень антитела в сыворотке превышает 10 мкг/мл.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное 10 антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которое при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в лечении наивных больных ВИЧ приведет к функциональному излечению больных.

15 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которое при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две 20 недели больным со стабилизированной вирусной нагрузкой на фоне применения ВААРТ приведет к функциональному излечению больных.

25 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем больным, у которых лечение ВААРТ было неэффективным, во вспомогательной терапии с ВААРТ в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, что приведет к последующему снижению вирусной нагрузки.

30 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем в качестве основного компонента в замещающей ВААРТ терапии, при этом каждый курс лечения начинается с лечения антителами против CD4 в течение 2-4 месяцев в качестве перерыва в лечении для больных, испытывающих 35 стабилизированную необнаруживаемую вирусную нагрузку на фоне применения ВААРТ, с последующим лечением ВААРТ в течение одного - четырех или более курсов, что приводит к функциональному излечению.

40 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем в качестве основного компонента в замещающей ВААРТ терапии, при этом каждый курс лечения начинается с лечения антителами против CD4 в течение 2-4 месяцев для лечения наивных больных ВИЧ, с последующими 2-4 месяцами лечения ВААРТ в течение одного - четырех или более курсов, что приводит к 45 функциональному излечению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут

быть введены в/в или п/к путем в качестве основного компонента в замещающей ВААРТ терапии, при этом каждый курс лечения начинается с лечения антителами против CD4 в течение 2-4 месяцев в качестве перерыва в лечении для пациентов, испытывающих стабилизированную необнаруживаемую вирусную нагрузку на фоне применения ВААРТ, 5 с последующим лечением ВААРТ в течение одного - четырех или более курсов в дозе приблизительно 5 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, что приводит к функциональному излечению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное 10 антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем в качестве основного компонента в замещающей ВААРТ терапии, при этом каждый курс лечения начинается с лечения антителами против CD4 в течение 2-4 месяцев для лечения наивных больных ВИЧ, с последующими 2-4 месяцами лечения ВААРТ в течение одного - четырех или более курсов в дозе приблизительно 5 15 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, что приводит к функциональному излечению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное 20 антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которое при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в лечении наивных больных ВИЧ приводит к функциональному излечению больных.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное 25 антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, которое при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели больным со стабилизированной вирусной нагрузкой на фоне применения ВААРТ 30 приводит к функциональному излечению больных.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем больным, у которых лечение ВААРТ было 35 неэффективным, во вспомогательной терапии с ВААРТ в дозе приблизительно 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели, что приводит к последующему снижению вирусной нагрузки.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное 40 антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, в режиме чередования, начиная с периода лечения в течение 2-4 месяцев и перерыва в лечении на 1-2 месяца в каждом курсе, в течение одного - четырех или более курсов, для лечения наивных больных ВИЧ, в качестве вспомогательной 45 терапии в режиме интенсивного лечения ВААРТ, что приводит к функциональному излечению больных.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное

антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем, в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, в режиме чередования, начиная с периода лечения в течение 2-4 месяцев и перерыва в лечении на 1-2 месяца в каждом курсе, в течение одного - четырех или более курсов, в дозе приблизительно 5 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в лечении наивных больных ВИЧ в качестве вспомогательной терапии в режиме интенсивного лечения ВААРТ, что приводит к функциональному излечению больных.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к

10 фармацевтическим композициям, включающим моноклональное гуманизированное антитело против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены в/в или п/к путем, в качестве основного компонента во вспомогательной терапии с ВААРТ, в режиме чередования, начиная с периода лечения в течение 2-4 месяцев и перерыва в лечении на 1-2 месяца в каждом курсе, в течение одного - четырех или более курсов, в дозе приблизительно 5 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели больным, испытывающим стабилизированную необнаруживаемую вирусную нагрузку на фоне применения ВААРТ, в качестве вспомогательной терапии в режиме интенсивного лечения ВААРТ, что приводит к функциональному излечению больных.

20 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены больным ВИЧ в/в или п/к путем в качестве иммунотерапии для снижения вирусной нагрузки.

25 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим моноклональные человеческие, гуманизированные или химерные антитела против CD4 с вышеописанными связывающими свойствами, которые могут быть введены больным ВИЧ в/в или п/к путем в качестве иммунотерапии для снижения вирусной нагрузки в дозе приблизительно 30 5 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели.

Определенные варианты осуществления

Настоящее описание охватывает следующие определенные варианты осуществления:

(1) Способ лечения субъекта, подвергнутого ВИЧ-инфекции, включающий: а) введение фармакологически эффективного количества моноклонального антитела к CD4, 35 включающего: CDR1 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 6; б) оценку уровня РНК ВИЧ на миллилитр крови субъекта после этапа 40 (а).

(2) Способ по п. (1), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 7.

(3) Способ по п. (1), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9.

45 (4) Способ по п. (1), где последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(5) Способ по п. (1), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 7, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(6) Способ по п. (1), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(7) Способ по п. (1), где этап введения (а) выполняют в течение 24 часов после контакта с ВИЧ-инфекцией.

⁵ (8) Способ по п. (1), где этап введения (а) выполняют в течение 48 дней после контакта с ВИЧ-инфекцией.

(9) Способ по п. (1), где фармакологически эффективное количество моноклонального антитела вводят при уровне в сыворотке приблизительно 10 мкг/мл или больше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в течение 12-недельного периода.

¹⁰ (10) Способ по п. (1), где значение уровня РНК ВИЧ на миллилитр меньше 1 копии/мл считается уничтожением вируса.

(11) Способ по п. (1), где значение уровня РНК ВИЧ на миллилитр от 1 до меньше чем 50 копий/мл считается функциональным излечением от вируса.

(12) Способ лечения больного, имеющего ВИЧ, включающий: а) введение

¹⁵ фармакологически эффективного количества композиции, включающей: моноклональное антитело к CD4, включающее: CDR1 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 5 и ²⁰ CDR3 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 6; и применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ); и б) оценку уровня РНК ВИЧ на миллилитр крови субъекта после этапа (а).

(13) Способ по п. (12), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 7.

²⁵ (14) Способ по п. (12), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9.

(15) Способ по п. (12), где последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(16) Способ по п. (12), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ

³⁰ ID NO: 7, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(17) Способ по п. (12), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(18) Способ по п. (12), где фармакологически эффективное количество антитела вводят в дозе 10 мг/кг или выше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели.

³⁵ (19) Способ по п. (12), где антитело вводят в режиме чередования в качестве вспомогательной терапии в режиме лечения ВААРТ.

(20) Способ по п. (19), где антитело вводят в течение периода продолжительностью приблизительно 2-4 месяца в качестве вспомогательной терапии в режиме лечения ВААРТ, с последующим перерывом в лечении антителами на 1-2 месяца в режиме ⁴⁰ лечения ВААРТ в каждом курсе.

(21) Способ по п. (20), где режим чередования продолжается в течение одного - четырех курсов.

⁴⁵ (22) Способ лечения больного, имеющего ВИЧ, включающий: а), уменьшение латентных резервуаров ВИЧ у больного, инфицированного ВИЧ, путем активации экспрессии вируса ВИЧ и апоптоза латентно инфицированных клеток у больного; и б) введение больному фармакологически эффективного количества ВААРТ.

(23) Способ по п. (22), где активацию экспрессии вируса ВИЧ и апоптоз латентно инфицированных клеток у больного выполняют посредством введения больному

фармакологически эффективного количества моноклонального антитела к CD4, включающего: CDR1 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи мышиного антитела B4 SEQ ID NO: 6.

(24) Способ по п. (22), где активацию экспрессии вируса ВИЧ и апоптоз латентно инфицированных клеток у больного выполняют посредством введения больному ингибитора гистондеацетилазы (HDAC).

(25) Способ лечения субъекта, подвергнутого ВИЧ-инфекции, включающий: а) введение фармакологически эффективного количества моноклонального антитела, обладающего высокой аффинностью к области CDR2-подобного домена CD4; и б) оценку уровня РНК ВИЧ на миллилитр крови субъекта после этапа (а).

(26) Способ по п. (25), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ

ID NO: 7.

(27) Способ по п. (25), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9.

(28) Способ по п. (25), где последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(29) Способ по п. (25), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 7, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(30) Способ по п. (25), где последовательность тяжелой цепи антитела включает SEQ ID NO: 9, и последовательность легкой цепи антитела включает SEQ ID NO: 8.

(31) Способ по п. (25), где этап введения (а) выполняют в течение 24 часов после контакта с ВИЧ-инфекцией.

(32) Способ по п. (25), где этап введения (а) выполняют в течение 48 дней после контакта с ВИЧ-инфекцией.

(33) Способ по п. (25), где фармакологически эффективное количество моноклонального антитела вводят при уровне в сыворотке приблизительно 10 мкг/мл или больше в схеме введения раз в неделю или раз в две недели в течение 12-недельного периода.

(34) Способ по п. (25), где значение уровня РНК ВИЧ на миллилитр меньше 1 копии/мл считается уничтожением вируса.

(35) Способ по п. (25), где значение уровня РНК ВИЧ на миллилитр от 1 до меньше чем 50 копий/мл считается функциональным излечением от вируса.

Дополнительные определенные варианты осуществления

(1) Способ лечения субъекта, подвергнутого воздействию ВИЧ, включающий: введение субъекту фармакологически эффективного количества антитела, направленного против домена 1 CD4.

(2) Способ согласно (1), где антитело специфично связывается с областью CDR2 в домене 1 CD4.

(3) Способ согласно (2), где антитело является моноклональным антителом, поликлональным антителом или их комбинацией.

(4) Способ согласно (2), где антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

(5) Способ согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает: аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2 и CDR3 SEQ ID NO: 3; и аминокислотную последовательность

легкой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 4, CDR2 SEQ ID NO: 5 и CDR3 SEQ ID NO: 6.

(6) Способ согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

5 легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

(7) Способ согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и

легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

(8) Способ согласно (7), где тяжелая цепь включает аминокислотную

10 последовательность SEQ ID NO: 7.

(9) Способ согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту перед контактом с ВИЧ.

(10) Способ согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту после контакта с ВИЧ.

15 (11) Способ согласно (10), где гуманизированное антитело вводят в течение 48 часов после контакта с ВИЧ.

(12) Способ согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.

(13) Способ согласно (12), где гуманизированное антитело вводят субъекту

20 многократно.

(14) Способ согласно (13), где гуманизированное антитело вводят субъекту с недельным или двухнедельным интервалом.

(15) Способ согласно (13), дополнительно включающий этап введения противовирусного средства субъекту.

25 (16) Способ согласно (15), где противовирусным средством является высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ).

(17) Способ согласно (16), где ВААРТ включает нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы в сочетании с ингибитором протеазы или ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы.

30 (18) Способ согласно (16), где гуманизированное антитело вводят одновременно с ВААРТ.

(19) Способ согласно (16), где гуманизированное антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает: (i) введение гуманизированного антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с недельным или двухнедельным

35 интервалом, с последующим двухмесячным перерывом в лечении; и (ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно, в течение шестимесячного периода в (i).

(20) Способ согласно (19), где субъект проходит лечение в течение двух курсов.

(21) Способ лечения субъекта с ВИЧ-инфекцией, включающий назначение субъекту схемы лечения, включающей: (а) фармакологически эффективное количество антитела,

40 направленного против домена 1 CD4; и (б) высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ).

(22) Способ согласно (21), где антитело специфично связывается с областью CDR2 в домене 1 CD4.

(23) Способ согласно (22), где антитело является моноклональным антителом, 45 поликлональным антителом или их комбинацией.

(24) Способ согласно (22), где антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

(25) Способ согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает:

аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2 и CDR3 SEQ ID NO: 3; и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 4, CDR2 SEQ ID NO: 5 и CDR3 SEQ ID NO: 6.

⁵ (26) Способ согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

¹⁰ (27) Способ согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

(28) Способ согласно (27), где гуманизированное антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.

¹⁵ (29) Способ согласно (21), где схему лечения назначают субъекту в течение курса, где курс включает: (i) введение гуманизированного антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с недельным или двухнедельным интервалом, с последующим двухмесячным перерывом в лечении; и (ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно, в течение шестимесячного периода в (i).

(30) Способ согласно (29), где субъект проходит два курса лечения.

Другие определенные варианты осуществления

²⁰ (1) Композиция для лечения субъекта, подвергнутого контакту с ВИЧ, включающая: фармакологически эффективное количество антитела, направленного против домена 1 CD4.

(2) Композиция согласно (1), где антитело специфично связывается с областью CDR2 в домене 1 CD4.

²⁵ (3) Композиция согласно (2), где антитело является моноклональным антителом, поликлональным антителом или их комбинацией.

(4) Композиция согласно (2), где антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

³⁰ (5) Композиция согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает:

аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2 и CDR3 SEQ ID NO: 3; и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 4, CDR2 SEQ ID NO: 5 и CDR3 SEQ ID NO: 6.

³⁵ (6) Композиция согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

⁴⁰ (7) Композиция согласно (4), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

(8) Композиция согласно (7), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

⁴⁵ (9) Композиция согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту до контакта с ВИЧ.

(10) Композиция согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту после контакта с ВИЧ.

(11) Композиция согласно (10), где гуманизированное антитело вводят в течение 48 часов после контакта с ВИЧ.

(12) Композиция согласно (8), где гуманизированное антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.

5 (13) Композиция согласно (12), где гуманизированное антитело вводят субъекту многократно.

(14) Композиция согласно (13), где гуманизированное антитело вводят субъекту с недельным или двухнедельным интервалом.

10 (15) Композиция согласно (13), где субъект проходит лечение (или ему вводят) противовирусным средством.

(16) Композиция согласно (15), где противовирусным средством является высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ).

15 (17) Композиция согласно (16), где ВААРТ включает нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы в сочетании с ингибитором протеазы или ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы.

(18) Композиция согласно (16), где гуманизированное антитело вводят одновременно с ВААРТ.

20 (19) Композиция согласно (16), где гуманизированное антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает: (i) введение гуманизированного антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с недельным или двухнедельным интервалом, с последующим двухмесячным перерывом в лечении; и (ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно, в течение шестимесячного периода в (i).

(20) Композиция согласно (18), где субъект проходит лечение в течение двух курсов.

25 (21) Композиция для лечения субъекта с ВИЧ-инфекцией, включающая: (a) фармакологически эффективное количество антитела, направленного против домена 1 CD4; и (b) высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ).

(22) Композиция согласно (21), где антитело специфично связывается с областью CDR2 в домене 1 CD4.

30 (23) Композиция согласно (22), где антитело является моноклональным антителом, поликлональным антителом или их комбинацией.

(24) Композиция согласно (22), где антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

35 (25) Композиция согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает: аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2 и CDR3 SEQ ID NO: 3; и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую: CDR1 SEQ ID NO: 4, CDR2 SEQ ID NO: 5 и CDR3 SEQ ID NO: 6.

40 (26) Композиция согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

45 (27) Композиция согласно (24), где гуманизированное моноклональное антитело включает: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

(28) Композиция согласно (27), где гуманизированное антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.

(29) Композиция согласно (21), где схему лечения назначают субъекту в течение

курса, где курс включает: (i) введение гуманизированного антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с недельным или двухнедельным интервалом, с последующим двухмесячным перерывом в лечении; и (ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно, в течение шестимесячного периода в (i).

⁵ (30) Композиция согласно (18), где субъект проходит два курса лечения.

Если не объяснено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, согласно которому их обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Термины в единственном числе "a," "an" и "the" (в оригинальном тексте описания)

¹⁰ включают множественные ссылки, если из контекста прямо не следует иное.

Аналогичным образом, предполагается, что слово "или" включает "и", если из контекста прямо не следует иное. Следовательно "включающий А или В" означает включающий А или В, или А и В. Также следует понимать, что все размеры аминокислот и все значения молекулярного веса или молекулярной массы, приведенные для полипептидов, являются

¹⁵ приблизительными, и представлены для описания. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут применяться при практическом осуществлении или тестировании раскрытоого способа, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и

²⁰ другие источники, указанные в настоящем документе, полностью включены посредством отсылки. В случае противоречий настоящее описание, включая объяснения терминов, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не должны быть ограничением.

²⁵ Следующие иллюстративные объяснения фигур и соответствующих примеров представлены для облегчения понимания некоторых терминов, часто используемых в настоящем описании, в особенности в примерах. Объяснения представлены для удобства и не являются ограничением изобретения.

ПРИМЕР 1

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА мАт В4

Моноклональное антитело В4 (мАт В4) является моноклональным антителом, которое распознает комплексный рецепторный участок ВИЧ на поверхности Т-клеток (CD4). МАт В4 может влиять и препятствовать взаимодействию CD4 с корецепторами ВИЧ. МАт В4 избирательно нейтрализовало первичные изоляты ВИЧ-1.

Информация ниже обобщенно характеризует открытие и предварительные исследования свойств мышного мАт В4, включая данные, подобранные из двух патентов США (патенты США 5,912,176 и 6,090,388 за авторством Wang) и статьи Wang et al., 1999, которые полностью включены посредством отсылки.

1. Мышиное моноклональное антитело, полученное в результате иммунизации HPB-ALL

МАт В4 получали при иммунизации мышей BALB/c интактными, неинфицированными человеческими CD4+ HPB-ALL клетками, линией клеток Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза.

Был получен новый класс антител против CD4, представленных мАт В4, обладающих специфичностью к CD4 на поверхности клеток и с широкой нейтрализующей активностью против первичных изолятов ВИЧ-1.

45 2. Исследование участка распознавания мАт В4

МАт В4, как было установлено, избирательно распознавало мембранный CD4 на поверхности клеток в сравнении с рекомбинантным растворимым CD4 (rsCD4).

Связывание мАт В4 с мембранным CD4 до воздействия ВИЧ, как было

показано, блокировало последующее прикрепление gp120 и целого вируса к CD4. Однако мембраносвязанный CD4, который был связан с gp120 до воздействия антитела, все еще может связывать мАт B4. Таким образом, мАт B4 может воздействовать на связывание gp120 с мембраносвязанным CD4, но при этом gp120 не влияет на связывание мАт B4 с CD4.

Участок распознавания мАт B4 отличается от участка распознавания других хорошо изученных моноклональных антител против CD4, в том числе мАт Leu3a и OKT4A, которые распознают домен 1 CD4 (Chiba, Y. 1992; Jameson, B.D., et al., 1988), и мАт 5A8, которое распознает домен 2 CD4 (Burkly, et al., 1992).

3. Нейтрализующая активность мАт B4 *in vitro*

Мышиное мАт B4 не является, по общему определению, нейтрализующим антителом. Напротив, мАт B4 ингибитирует вход вируса в клетку, закрывая рецептор клетки-хозяина, а не прикрепляясь к вирусу. Действие мАт B4 на ВИЧ-инфекцию можно легко наблюдать в анализах нейтрализации вируса, применяемых в данной области (например,

15 микроанализе нейтрализации образования бляшек MT-2 (Sawyer et al., 1994)).

Нейтрализующую активность мышиного мАт B4 оценивал наш сотрудник, д-р Карл Хэнсон (Dr. Carl Hanson, California Department of Health Services), а также ее независимо оценивали в лабораториях д-ра Джона Масколы (Dr. John Mascola, Henry Jackson Foundation, WRAIR), д-ра Дэвида Монтефьори (Dr. David Montefiori, Duke University) и 20 д-ра Малcolm Martin (NIAID). Следующие особенности нейтрализации ВИЧ, тщательно исследованные с 1995 до 2010 года, связаны с мАт B4:

1. МКПК-выращенные первичные изоляты более чувствительны к нейтрализации при воздействии мАт B4, чем адаптированные к линии Т-клеток изоляты ВИЧ-1_{ШВ} и ВИЧ-1_{MN}.

25 2. МАт B4 нейтрализует инфекцию, вызываемую первичными изолятами с использованием корецепторов CCR5/CXCR4 (двойного) и CCR5.

3. МАт B4 обладает низкой активностью против адаптированных к линии Т-клеток изолятов ВИЧ-1 с использованием корецептора CXCR4.

4. МАт B4 нейтрализует широкий диапазон синцитий-индуцирующих (SI) и синцитий-30 неиндуцирующих (NSI) первичных изолятов, представляющих субтипы ВИЧ-1 A-G, до 90% конечных показателей и до 3 log инфекционности.

5. МАт B4 нейтрализует ВИЧ-2, SIV и SHIV, имеющие двойную корецепторную оболочку ВИЧ-1.

6. В системе культуры ткани миндалин, мАт B4 уменьшает инфекционность первичного изолята ВИЧ-1 VL135 (HIV-1VL135) на два log. Всего лишь 12,5 мкг/мл мАт B4 полностью нейтрализует >100 TID₅₀ (50% инфекционная доза для культуры ткани миндалин) моноцитотропного изолята JR-CSF в присутствии активного человеческого комплемента, что является условием, при котором многие 40 противовирусные антитела демонстрируют антителозависимое улучшение.

7. МАт B4 проявляет нейтрализующую активность в отношении HIV-1VL135 при добавлении в течение до 48 часов после заражения, со значительным противовирусным действием при добавлении в течение до 72 часов после.

a. оно одинаково эффективно в случае преинкубирования с клетками или вирусом.

45 b. оно действует посредством блокирования распространения очагов инфекции в новые клетки, а не посредством механизма, действующего после входа вируса в клетку.

c. в этих анализах мАт B4 не способствовало развитию цитотоксичности.

ПРИМЕР 2

АНАЛИЗЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ И УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1

Следующие анализы нейтрализации и устойчивости вируса выполняли в лабораториях д-ра Карла Хэнсона и Monogram Biosciences, Inc. для множества изолятов ВИЧ различных клад в течение 1998-2011 годов. Подробные описания анализов описаны ниже.

1. Анализы нейтрализации ВИЧ-1.

Образцы крови или антител собирали, как указано в каждом из исследований.

Образцы сыворотки или антител оценивали на мультикладной группе изолятов ВИЧ-1 при использовании микроанализа образования бляшек MT-2 или анализа митоген (РНА)-стимулированных МКПК.

1.1. Микроанализ образования бляшек MT-2

Микроанализ образования бляшек MT-2 был ограничен синцитий-индуцирующими изолятами ВИЧ. Анализ выполняли в 96-луночных микропланшетах, в которых можно было подсчитать до 25 маленьких бляшек на лунку при флуоресцентном окрашивании синцитиев на микробляшках. В этом анализе инфицированные клетки MT-2 формировали

монослой при центрифугировании через расплавленную агарозу, которая образует гель во время центрифугирования. Данный анализ, как было установлено, является чувствительным и имеет динамический диапазон, охватывающий множество порядков величины. Данный анализ, как было также установлено, является исключительно эффективным при обработке большого количества образцов. Применение

компьютерного статистического анализа, возможного из-за большого количества повторных лунок, как установили, обеспечивает степень контроля качества и стандартизации, которую сложно достичь при использовании других форматов.

1.2 Анализ МКПК

Анализ МКПК является стандартным анализом снижения антигена, в котором экспрессию антигена p24 в МКПК количественно определяют с помощью ELISA с захватом антигена после выращивания инфицированных клеток в 96-луночных микротитровальных планшетах. Преимуществом данного анализа является его применимость для всех штаммов и изолятов ВИЧ.

1.3 Вирусный материал.

Образцы ВИЧ-1 для исследования нейтрализации *ex vivo* и *in vivo*, перечислены в Таблицах 3, 5 и 6, а также на Фигурах 1а, 1б, 3, 22 и 23. Первичные вирусы ВИЧ-1 субтипов G и H были: (а) выделены у мужчин гомосексуалистов, участвующих в исследовании состояния здоровья мужчин Сан-Франциско департамента здравоохранения Калифорнии, лаборатории вирусных заболеваний и риккетсиозов (VRDL); (б) получены от сети Всемирной организации здравоохранения по выделению и исследованию ВИЧ, (с) предоставлены исследовательской программой ВИЧ министерства обороны США и (д) переданы в дар от Национального института аллергии и инфекционных заболеваний по программе исследования СПИДа и референсных реагентов. DH-12, изолят больного, перевитый в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) шимпанзе, также был предоставлен Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний по программе исследования СПИДа и референсных реагентов.

1.4. Нейтрализующая активность B4 или dB4

Нейтрализующую активность B4 или dB4 определяли как концентрацию антитела, которая обеспечила указанный процент снижения (50-95%) вируса по сравнению с контролем, содержащими антитело. Концентрации антитела для конечных показателей 50% и 90% были получены при интерполяции между разведениями антител.

2. Анализ входа ВИЧ PhenoSense

Анализ входа ВИЧ PhenoSense для определения устойчивости к лекарственному

средству выполняли в Monogram Biosciences, Inc. (South San Francisco, California).

Рекомбинантный вирус, полученный из пулов векторов, использовали для заражения клеток в присутствии различных концентраций лекарственного средства или антитела (например, B4 или dB4). Определяли количество лекарственного средства, требуемое для ингибиции вирусной репликации тестируемого вектора на 50% (IC₅₀) или 90% (IC₉₀).

2.1 Создание рекомбинантных вирусов, используемых в анализе ВИЧ PhenoSense

Рекомбинантные вирусы, используемые в анализе ВИЧ PhenoSense, были получены из образцов, собранных у больных, прошедших скрининг в лонгитюдных исследованиях ВИЧ-инфекции и идентифицированных как ВИЧ-положительные. В случае лиц с впервые обнаруживаемой ВИЧ-инфекцией, клинические анализы и образцы плазмы забирали для лабораторного исследования, включая вирусную нагрузку ВИЧ и количество CD4 клеток. В случае лиц, которые первоначально были серонегативными, но стали серопозитивными приблизительно через 1 год последующего наблюдения, ВИЧ-инфекцию подтверждали с помощью двух иммуноферментных анализов с подтверждением на вестерн-блоттинге.

Образцы участников, которые имели субтипы A, BF, C, D, E, EA, F, G или J во время сероконверсии (на основе предыдущего субтиповирования ВИЧ при использовании множественного гибридизационного анализа), забирали для конструирования рекомбинантных вирусов, как показано в Таблице 3. Области ВИЧ env *pol* амплифицировали из исследуемого образца и клонировали амплифицированные ДНК в тестируемый вектор. В процессе GeneSeq ВИЧ пулы векторов секвенировали для определения генотипа ВИЧ. В процессе анализа ВИЧ PhenoSense рекомбинантный вирус, полученный из пулов векторов, использовали для заражения клеток в присутствии различных концентраций лекарственного средства.

ПРИМЕР 3

НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АКТИВНОСТИ мАт В4 В АНАЛИЗЕ MONOGRAM BIOSCIENCE PHENOSENSE ПРОТИВ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ ВСЕХ КЛАД

Было подробно описано, что мАт В4 нейтрализует все вирусы ВИЧ клады В. В одном исследовании в общей сложности 73 представительных изолятов ВИЧ не-В клады из клады А (n=8), BF (n=1), C (n=18), D (n=18), E (n=4), EA (n=10), F (n=8), G (n=4), J (N=2), плюс три контрольных вируса 92HT594, JRCSF, JRFL, были превращены в рекомбинантные вирусы и исследованы в анализе ВИЧ PhenoSense на их чувствительность к мАт В4 (Таблица 3). Было обнаружено, что все рекомбинантные вирусы были крайне чувствительны к мАт В4 с беспрецедентно низкими концентрациями IC₅₀ и IC₉₀, со средними значениями IC₅₀=0,018 мкг/мл и IC₉₀=0,062 мкг/мл. Заслуживало внимания то, что было обнаружено, что многие из таких изолятов ВИЧ были получены от больных с множественной лекарственной резистентностью, что является четким указанием, что мАт В4 или его человеческий аналог будут очень эффективными при лечении больных, которые уже являются устойчивыми к лекарственному средству против ВИЧ.

ПРИМЕР 4

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО В4 ОПОСРЕДУЕТ КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ВХОДА ВИЧ: НЕОЖИДАННАЯ ОСОБЕННОСТЬ, КОТОРАЯ ПОЗВОЛЯЕТ ПРЕДПОЛОЖИТЬ ВОЗМОЖНОЕ ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ПОЯВЛЕНИЯ ВИЧ РЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ

Исследования конкурентного ингибиции могут позволить оценить эффективность и способность ингибитора (например, антитела-ингибитора входа) конкурировать с

белками оболочки ВИЧ за один и тот же связывающий участок рецептора на CD4 и, таким образом, ингибировать вход ВИЧ в клетку. В теоретическом исследовании мАт B4 конкурирует с белком оболочки ВИЧ (gp120) за связывание CD4. На **Фигуре 1а** показаны предполагаемые результаты данного исследования, где каждая линия

⁵ представляет разный вирусный изолят. В частности, ожидаемые результаты данного теоретического исследования демонстрируют, что хотя разные вирусные изоляты могут иметь разную чувствительность (IC_{50}) к мАт B4, вход всех вирусных изолятов был бы ингибиран на 100% в случае присутствия мАт B4 в достаточной концентрации.

¹⁰ Для сравнения, исследования неконкурентного ингибиования могут позволять оценивать эффективность и способность ингибитора (например, антагониста корецептора или антитела, которое связывается с другой частью CD4) ингибировать или уменьшать способность белков оболочки ВИЧ связываться с CD4 и, таким образом, ингибировать вход ВИЧ в клетку. В теоретическом исследовании проанализирована способность неконкурентного ингибитора (например, TMB-355) ингибировать ¹⁵ связывание белка оболочки ВИЧ (gp120) с CD4. На **Фигуре 1б** показаны предполагаемые результаты данного исследования, где каждая линия представляет разный вирусный изолят. В частности, ожидаемые результаты данного теоретического исследования демонстрируют, что разные вирусные изоляты могут иметь разную чувствительность (IC_{50}) к TMB-355, и, по меньшей мере, некоторая часть вирусных изолятов будет входить ²⁰ в клетку независимо от присутствующего количества TMB-355. На основе этого теоретического исследования можно ожидать, что устойчивость ВИЧ будет наблюдаться как "плато" в максимальном проценте ингибиования независимо от IC_{50} .

²⁵ TMB-355 (ранее TNX-355, также называемый ибализумаб) является гуманизированным моноклональным IgG4 антителом, которое было разработано для связывания с внеклеточным доменом 2 CD4 резуса и человека с предотвращением входа ВИЧ в CD4+ клетки после связывания (например, Burkly, LC, et al., 1992; и Kurizkes, DR, et al., 2004). Участок связывания антитела TMB-355 на CD4 отличается от участка, требуемого для связывания белка оболочки gp120 ВИЧ-1, и отличается от участка, необходимого для взаимодействия с белками главного комплекса гистосовместимости. Соответственно, ³⁰ TMB-355 опосредует неконкурентное ингибиование входа ВИЧ.

³⁵ TMB-355, как было показано, обладает сильной нейтрализующей активностью против некоторых вирусов ВИЧ-1, однако его ингибирующая активность неоднородна при оценке широкой группы штаммов ВИЧ. На **Фигуре 2** показано, что МПИ TMB-355 изменяется в пределах от 100% до 15% (ось Y слева), в сочетании с увеличением IC_{50} от 0,01 мкг/мл до 10 мкг/мл (ось Y справа), против группы 118 вирусов псевдотипа Env ВИЧ, причем каждый столбец соответствует одному изоляту вируса (Song, R., et al., 2013). Из всех проанализированных клад, вирусы клады А и Е были значительно более чувствительными к TMB-355, чем вирусы не из клады А и Е. Кроме того, были ⁴⁰ обнаружены резистентные мутанты вируса с мутациями, идентифицированными в области V5 gp120 у больных, получавших лечение TMB-355 для снижения вирусной нагрузки (Toma, J., et al., 2011; Pace, C.S., et al., 2013). Неконкурентное ингибирующее действие, продемонстрированное TMB-355 (ибализумаб), дает основание предположить, что в период лечения антителами могла присутствовать высокая вероятность развития ⁴⁵ устойчивых мутантов ВИЧ, поскольку вирусная репликация будет наблюдаться в случае изолятов, которые подверглись менее чем 100% ингибираванию.

Напротив, данные, собранные за 10-летний период в группе более чем 850 вирусов псевдотипа Env ВИЧ, показывают, что мАт B4 обеспечивает неожиданную широту и

активность при ингибиции входа ВИЧ (**Фигура 3**). На основе полученного массива данных можно отметить, что мАт B4 обладает почти 100% МПИ, причем IC₅₀ сгруппирована около двух концентраций, одна от 0,01 до 1 мкг/мл и другая около 10 мкг/мл. Профиль ингибиции входа ВИЧ для мАт B4 обладает характерными свойствами механизма конкурентного ингибиции с МПИ для каждого из вирусов ВИЧ на уровне ~100% независимо от IC₅₀. С учетом особенно сильных свойств конкурентного ингибиции входа ВИЧ у мАт B4, устойчивые мутанты вируса вряд ли будут развиваться в течение периода лечения мАт B4. Такое мощное конкурентное ингибиение, которое проявляет мАт B4, никогда не наблюдали ни у одного другого ингибитора ВИЧ, протестированного на настоящий момент.

Данные МПИ и IC₅₀ из этого Примера, в сочетании с данными, показывающими, что многие из изолятов ВИЧ, полученных у больных, резистентных к лекарственным средствам, были очень чувствительны к мАт B4, обсуждаемому в Примере 3, указывают на то, что мАт B4 или его человеческий аналог будут крайне эффективными при лечении резистентных к лекарственным средствам больных ВИЧ, у которых неэффективно лечение ВААРТ. Механизмнейтрализации, опосредуемой мАт B4, дает уникальное лекарственное средство против ВИЧ, которое могло бы предотвратить появление резистентных к лекарственным средствам вирусных мутантов у больных ВИЧ, проходящих лечение мАт B4 или его человеческими аналогами, несущими подобные области Fv.

ПРИМЕР 5

ГУМАНИЗАЦИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА B4

Как мышнее антитело, мАт B4 является иммуногенным у людей. Гуманизация мышьиных антител может быть выполнена с помощью способа, который в настоящее время известен как технология деиммунизации (Jones, T.D., et al. 2009). Деиммунизация мАт B4 подробно описана в патенте США 7,501,494 (Lynn., S. and Wang, C.Y.) (который полностью включен посредством ссылки), как изложено ниже.

Во-первых, константные области мышьего антитела B4 (С_H и С_C) были полностью удалены и заменены константными областями человеческого IgG₁ (SEQ ID NO: 12 и 14, соответственно), тогда как Fv фрагменты были сохранены с получением, таким образом, химерного антитела B4. Затем деиммунизация Fv фрагмента мышьего мАт B4 для применения человеком была выполнена посредством идентификации и удаления потенциально иммуногенных мышьих Т и В-клеточных эпитопов. Удаление эпитопов Т-клеток было выполнено после идентификации таких эпитопов в вариабельных областях мАт B4. Аминокислотные последовательности вариабельной области были проанализированы на присутствие мотивов, связывающих МНС класса II, с помощью метода 3-мерного "пептидного протягивания". Удаление В-клеточных эпитопов из вариабельной области было выполнено путем 'винирования' поверхностных остатков, которые не препятствуют распознаванию антитела. Деиммунизированный, гуманизированный вариант мАт B4 обозначен как мАт dB4.

В патенте США 7,501,494 (Lynn., S. and Wang, C.Y.) обсуждается, что IgG₁ содержит биантенный комплексный N-связанный углевод в СH2, который важен для эффекторных функций, таких как фиксация комплемента и антигенависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), которые приводят к элиминации антигена-мишени. Поскольку мАт B4 направленно взаимодействует с рецепторным комплексом CD4, оно может вызывать разрушение CD4+ клеток и иммуносупрессию функции CD4+ клеток посредством эффекторных функций IgG₁, которые ответственны за связывание

комплемента. Таким образом, удаление участка N-гликозилирования в Fc-области IgG₁ устраняет способность IgG₁ связывать человеческий FcR1, активировать комплемент или связывать C1q с устраниением, таким образом, опосредуемой IgG₁

⁵ комплементзависимой цитотоксичности (CdC). Удаление участка N-гликозилирования в Fc-области IgG₁ было достигнуто путем замены одного аминокислотного остатка Asn (N) на His (H) (т.е. N298H).

Нумерация/положения аминокислот, обсуждаемые в настоящем описании, основаны на последовательностях, содержащихся в Списке последовательностей, который является ¹⁰ частью настоящего описания. Следует отметить, что участок гликозилирования в положении ак298, обсуждаемом выше, соответствует участку гликозилирования, присутствующему в ак297 нативной молекулы IgG₁, при нумерации согласно европейской системе нумерации для IgG₁. Таким образом, ак298 в настоящей заявке соответствует участку гликозилирования в ак297, обсуждаемому в патенте США 7,501,494.

¹⁵ Области CDR1, 2 и 3 тяжелой (**Фигура 4**) и легкой (**Фигура 5**) цепей Fv-домена деиммунизированного мАт dB4 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6, соответственно (**Таблица 4**). Полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепей мАт dB4 показаны на **Фигурах 4 и 5** как SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно.

Полупериод существования мАт dB4, как обнаружили, был улучшен (увеличен) в ²⁰ результате мутации некоторых аминокислот в тяжелой цепи антитела. В частности, полупериод существования гуманизированного антитела был улучшен в результате замен аминокислот Fc тяжелой цепи в положениях ак253 (Met), ак255 (Ser) и ак257 (Thr) на Tyr, Thr и Glu, соответственно. Полноразмерная последовательность улучшенной тяжелой цепи гуманизированного антитела мАт dB4 показана на **Фигуре 6** как SEQ ID ²⁵ NO: 9. Таким образом, улучшенное гуманизированное антитело мАт dB4 содержит легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 8, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9.

Уникальной особенностью последовательности и структуры мышного мАт B4 и ³⁰ гуманизированного мАт dB4 является присутствие связывающего сахара остатка Asn в аминокислотном положении 101 (Asn101) в тяжелой цепи Fv. Этот связывающий сахар участок необычен из-за своего положения Fv-области и неожиданно скрыт в Fv-домене, и может быть обнажен только при ферментативном отщеплении сахара при денатурации полной молекулы антитела. Присутствие этого сахара в Fv-области первоначально затрудняло исследование свойств антитела. Однако модификации в сахарной цепи или ³⁵ связывающем участке нарушили аффинность связывания антитела с CD4. Таким образом, такой необычный участок N-гликозилирования в Fv-области очень важен для связывания антитела с CD4.

На **Фигуре 7** показана полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи мАт dB4 с выделением участков гликозилирования, замены и мутации, обсуждаемых ⁴⁰ выше в отношении **Фигур 4 и 6**.

ПРИМЕР 6

ДЕМОНСТРАЦИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ МЕЖДУ мАт DB4 И ЕГО ИСХОДНЫМ мАт B4 С ПОМОЩЬЮ МИКРОАНАЛИЗА БЛЯШЕК МТ-2, АНАЛИЗОВ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ МКПК И АНАЛИЗА ВХОДА PHENOSENSE

⁴⁵ Обширные сравнительные исследования проводили с целью оценки биоэквивалентности деиммунизированного/гуманизированного, Fc-агликозилированного мАт dB4 и исходного мышного мАт B4, чтобы гарантировать, что гуманизированный вариант мог применяться для дальнейших исследований

токсичности/безопасности и эффективности у животных приматов и людей. Результаты этих сравнительных исследований представлены ниже.

1. Высокочувствительные анализы нейтрализации ВИЧ-1, проведенные в микроанализах образования бляшек MT-2 и в анализах митоген-стимулируемых МКПК с репрезентативными изолятами ВИЧ из клад А, В, С, Д и Е и клад С и Е, соответственно. Не наблюдали никакой потери активности нейтрализации ВИЧ после гуманизации мышиного мАт В4 до антитела мАт dB4 с применением технологии деиммунизации. Сопоставимые результаты показаны в микроанализе образования бляшек MT-2 (Таблица 5) и анализе на основе МКПК (Таблица 6).

10 2. Таким образом, продемонстрирована биоэквивалентность между мышним мАт В4 и мАт dB4, поскольку значения IC₅₀ и IC₉₀ для всех изолятов ВИЧ из всех измеренных клад отличаются друг относительно друга в пределах двухкратных значений.

15 3. Ингибирование входа ВИЧ под действием мАт В4, мАт dB4, а также двух других известных ВИЧ-env направленных моноклональных нейтрализующих антител, 2F5 и 2G12, оценивали на линии экспрессирующих два рецептора (CXCR4 и CCR5 или X4/R5)

20 клеток U87 с отобранными изолятами ВИЧ разного тропизма, включая JRCSF (R5), HXB2 (X4), 92TH594 (R5/X4), первичный изолят #5 (R5), первичный изолят #6 (R5) и первичный изолят #7 (R5). В данном исследовании ингибирование входа ВИЧ оценивали в Monogram Biosciences при использовании псевдотипированных вирусов, которые несли гликопротеин оболочки из любого из сотен штаммов ВИЧ и люциферазу. Нейтрализацию антителом измеряли путем количественного определения биолюминесценции, которую давали U87-CD4+/CCR5+/CXCR4+ клетки, генно-инженерно модифицированные для экспрессии люциферазы под контролем ВИЧ tat. Результаты данного исследования показаны в Таблице 7 и демонстрируют, что:

25 а. Мышиное мАт В4 (MuB4; строка 4) является намного более активным при ингибировании входа ВИЧ по сравнению с двумя наиболее мощными антителами против ВИЧ Env, 2F5 (строка 1) и 2G12 (строка 2). Соответствующие значения IC₅₀ для различных изолятов ВИЧ составляют 0,04 против 4 и 0,8; 0,4 против 0,07 и 0,5; 0,05 против 3 и 1,3; 0,05 против 50 и 20; 0,05 против 2 и 3; 0,03 против >100 и 2,

30 соответственно;

б. Мышиное мАт В4 (MuB4; строка 4) и мАт dB4 (строка 3) неожиданно имеют эквивалентные значения IC₅₀ при тестировании с такими же репрезентативными изолятами ВИЧ с различными типами тропизма.

35 Таким образом, документально подтверждено, что мышиное мАт В4 и деиммунизированное мАт dB4, которые имеют одни и те же CDR-области тяжелой и легкой цепей, являются биоэквивалентными, и при этом функциональные свойства этих двух антител являются характерными друг для друга в различных *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

ПРИМЕР 7

40 ИССЛЕДОВАНИЕ (А) СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ DB4 И мАт В4 С КЛЕТКАМИ HPB-ALL; (Б) СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ DB4 С CD4-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ МКПК КЛЕТКАМИ; (С) СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ DB4 С РЕКОМБИНАНТНЫМ CD4 И (Д) СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ DB4 И GP120 С КЛЕТКАМИ HPB-ALL

1. Общая информация

Хотя качественный аспект антигенного связывания и функциональных свойств известен, как было продемонстрировано в нейтрализующих анализах, для мАт dB4 и

его исходного мышного мАт B4, как было показано в предыдущих Примерах, количественные клеточные профили связывания мАт B4 и мАт dB4 в CD4+ Т-лимфоцитах ранее не были исследованы.

Как мышное мАт B4, так и его гуманизированное, Fc-агликазилированное IgG₁

⁵ моноклональное антитело мАт dB4 тестировали на клеточные профили связывания на нормальных CD4+ Т-лимфоцитах человеческой крови, а также на CD4+ Т-лейкозных HPB-ALL клетках. Клетки HPB-ALL использовали, потому что мАт B4 было отобрано при иммунизации мышей клетками HPB-ALL, как обсуждается в Примере 1. Общее клеточное связывание оценивали с помощью FACS анализа, и результаты представлены ¹⁰ как значения EC₅₀ или IC₅₀ на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI). В дополнение к оценке общего клеточного связывания антител также исследовали абсолютную аффинность связывания (Kd) и связывающую способность (B_{max}) нативной молекулы IgG₁ dB4 с клетками HPB-ALL.

2. Материалы

2.1 Культуральная среда и реактивы.

Среда RPMI-1640 и эмбриональная бычья сыворотка для культивирования клеток HPB-ALL были получены от Gibco (кат. 11875-093 и 10091-148, соответственно). Бычий сывороточный альбумин был получен от ApplicChem (кат. A-0850). Инкубирование клеток с тестируемыми антителами выполняли в 96-луночных планшетах onNUNC с V-образным дном (кат. 249662). Пробирки для микроразведения (1,2 мл) для подготовки образцов были получены от Bertec (кат. 1710-00). Фиксацию клеток выполняли 2% формальдегидом; образцы разводили PBS (pH 7,4), содержащим 0,05% BSA и 0,05% азida натрия; и промывочным буфером был PBS (pH 7,4) с 0,05% азida натрия.

²⁵ Связывание мышного мАт B4 и гуманизированного мАт dB4 отслеживали IgG-FITC козы против иммуноглобулина мыши (Sigma, кат. F8264) и F(ab')₂ IgG Fcγ-FITC козы против иммуноглобулина человека (Jackson ImmunoResearch, кат. 109-096-098), соответственно. Конъюгат dB4-Alexa 488 (сокращенно указанный как "dB4-Alexa" по всему тексту) был получен в компании-заявителе (United Biomedical, Inc.) ("UBI") (UBI ³⁰ партия 0102143). Конъюгат B4-биотин был получен в UBI (партия 051807). Конъюгат овцы против hIgG-HRP был получен от The Binding Site (кат. AP004); Extravidin-HRP от Sigma-Aldrich (кат. E2886); и растворимый rCD4 был получен от R&D System (кат. 514-CD-050). Пептид p2704a оболочки ВИЧ был получен в UBI, рекомбинантный gp120 MN был получен от ImmunoDiagnostics (кат. 1021-2). Сортировку CD4+ Т-клеток крови для ³⁵ отслеживания связывания выполняли с помощью FITC-меченного антитела против CD4(D2) (Ancell, кат. 148-020). Флуоресцентные сферы из наборов LinearFlow™ Green Flow Cytometry Intensity Calibration Kits (Molecular Probe) использовали в качестве стандартов для определения величины относительной флуоресценции меченых клеток. Другие используемые детекторы флуоресценции были следующими: FITC-ChromPure ⁴⁰ IgG козы, F(ab')₂ фрагмент (Jackson ImmunoResearch, кат. 005-090-006); CD3 PE (ASR) (BD Biosciences, кат. 340662); CD45 PerCP (ASR) (BD Biosciences, кат. 340665).

2.2 Клетки HPB-ALL и CD4+ Т-клетки периферической крови.

Клеточная линия HPB-ALL, линия тимусных клеток острого лимфолейкоза человека, была получена от DSMZ ACC. МКПК CD4+ Т-клетки (кровь, недавно забранная у ⁴⁵ здоровых доноров, в вакуумных ЭДТА-контейнерах) были получены из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) после лизиса эритроцитов NH₄Cl-содержащим гипотоническим раствором (смесь 8,3 г/л хлорида аммония, 0,84 г/л бикарбоната натрия и 29,4 мг/л ЭДТА, pH 7,4)

2.3 Мышиное мАт B4 и гуманизированное мАт dB4.

Мышиный моноклональный B4 IgG₁ (UBI партия 120197) был получен при манипуляции в гибридоме с использованием клеток HPB-ALL в качестве иммуногена. Полученный из B4, гуманизированный dB4 IgG₁ (UBI Asia, контрольная партия) был Fc-агликазилирован посредством замены N298H (Примеры 5).

2.4 Обнаружение с помощью ELISA и FACS.

96-луночный микропланшет производства Nalge NUNC International, плоскодонный (кат. 442404) для оптического сканирования и с V-образным дном для инкубирования клеток (кат. 249570). Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре для микропланшетов VersaMax (Molecular Devices). Флуоресцентные красители детектировали на сканере BD FACSCalibur (BD Biosciences); и полученные данные регистрировали с помощью ассоциированной программы Cell Quest. Данные связывания ELISA и FACS импортировали в программу SigmaPlot 11 для количественного анализа.

3. Методы

3.1 Связывание dB4 с клетками HPB-ALL

3.1.1 Исследование времени равновесия. В микропланшеты с V-образным дном добавляли аликвоты 2×10^5 клеток в 0,1 мл на лунку, центрифугировали и удаляли жидкость. В течение различного времени, до 180 минут, клетки инкубировали на льду с аликвотами 100 мкл dB7 при различных концентрациях, до 100 нг/мл. В указанное время супернатанты собирали для определения свободного, несвязавшегося лекарственного средства на основе антитела. Связанную фракцию вычисляли путем вычитания свободной фракции из полной добавленной концентрации лекарственного средства.

Концентрации свободного dB4 в связывающем растворе определяли количественно с помощью ELISA. Коротко, анализ включал использование смеси антитела овцы против hIgL (0,5 мкг/мл), нанесенного на микропланшеты NUNC Maxisorp, и HRP-антитела овцы против huIgG (разведение 1/1000) в качестве детектирующего белка. Концентрации в неизвестных образцах измеряли на основе калибровочных стандартов в пределах 0,14-18,5 нг/мл.

3.1.2 Исследование прямого связывания с dB4.

В микропланшеты с V-образным дном добавляли аликвоты 2×10^5 клеток в 0,1 мл на лунку, центрифугировали и удаляли жидкость. Клетки инкубировали на льду в течение 1 часа с аликвотами 100 мкл dB4 при различных концентрациях до 2000 нг/мл. После инкубирования dB4 удаляли и добавляли новую аликвоту dB4 к клеткам при такой же концентрации, используемой для начального инкубирования, и инкубировали клетки на льду в течение еще одного часа. Этот этап повторяли еще раз. Клетки из этих трех инкубирований (пассажей) исследовали. После третьего инкубирования клетки один раз промывали, центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и окрашивали на льду в течение 30 мин 100 мкл F(ab)₂ Fc-FITC козы против huIgG (250 нг/мл). Клетки один раз промывали и удаляли жидкость после центрифугирования. В каждую лунку добавляли аликвоты 200 мкл связывающего буфера и переносили в пробирки для микроразведения для проточного цитометрического анализа. Связывающую интенсивность (среднюю интенсивность флуоресценции, MFI), на основе ввода 5000 клеток на каждый образец, регистрировали на FACS.

3.1.3 Исследование аффинности связывания (Kd) dB4. В пробирках Эппendorф антитело dB4 в концентрации 3,1-2000 нг/мл (0,5 мл) добавляли к клеткам HPB-ALL в количестве 4×10^5 клеток (0,5 мл) и инкубировали в течение 1 ч на льду при мягким встряхивании.

Абсолютную аффинность связывания определяли при насыщении связывания, где концентрации свободного dB4 ([F]) в растворе определяли количественно с помощью ELISA, а связанную фракцию ([B]) вычисляли, как описано в исследовании равновесия выше. Полученные в результате профили насыщающих концентраций свободного и связанного антитела анализировали на SigmaPlot методом аппроксимации кривой на основе уравнения: $[B] = B_{max} \cdot \{[F]\} / ([F] + K_d)$, где соответствующие [B] и [F] обозначают концентрации связанного и свободного антитела.

3.1.4 Конкуренция dB4 и B4 с B4-биотином. В плоскодонные микропланшеты, покрытые смесью sCD4 (0,5 мкг/мл) и пептида p2704a (2,0 мкг/мл), добавляли аликвоты 0,1 мл dB4 или B4 при концентрации 0,78-100 мкг/мл в присутствии B4-биотина (10 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После конкурентного связывания с захватывающей смесью связанный B4-биотин детектировали Extravidin-HRP и измеряли на спектрофотометре для ELISA.

3.1.5 Конкуренция dB4 и B4 с dB4-Alexa. В микропланшеты с V-образным дном

добавляли аликвоты 2×10^5 клеток в 0,1 мл на лунку, центрифугировали и удаляли жидкость. Клетки инкубировали на льду в течение 1 ч с аликвотами 100 мкл dB4 или B4 (до 2000 нг/мл) в присутствии dB4-Alexa (250 нг/мл). Клетки один раз промывали и удаляли жидкость после центрифугирования. В каждую лунку добавляли аликвоты 200 мкл связывающего буфера и переносили в пробирки для микроразведения для проточного цитометрического анализа. Связывающую интенсивность (средняя интенсивность флуоресценции, MFI), на основе ввода 5000 клеток на каждый образец, регистрировали на FACS.

3.1.6 Конкуренция dB4C7 и gp120 MN с dB4C7-Alexa. В микропланшеты с V-образным

дном добавляли аликвоты 2×10^5 клеток в 0,1 мл на лунку, центрифугировали и удаляли жидкость. Клетки инкубировали на льду в течение 1 ч с аликвотами 100 мкл dB4C7 или gp120 MN (до 200 нМ, ~30 мкг/мл) в присутствии dB4-Alexa (250 нг/мл). Клетки один раз промывали и удаляли жидкость после центрифугирования. В каждую лунку добавляли аликвоты 200 мкл связывающего буфера и переносили в пробирки для микроразведения для проточного цитометрического анализа. Связывающую интенсивность (средняя интенсивность флуоресценции, MFI), на основе ввода 5000 клеток на каждый образец, регистрировали на FACS.

3.2 Связывание dB4 с CD4+ Т-лимфоцитами крови

3.2.1 Исследование температурно-зависимого связывания dB4. Для имитации

физиологических условий, когда dB4 (UB-421) после в/в введения связывалось бы (закрывало или занимало) с рецепторами CD4 на CD4+ Т-клетках, аликвоты недавно забраной у персонала лаборатории ЭДТА-крови инкубировали при 37°C с равным объемом dB4 в буфере для разведения при концентрациях до 100 мкг/мл. Для сравнения другой набор образцов инкубировали параллельно на льду. После инкубирования в течение 1 ч образцы лизировали 20-кратным объемом буфера для лизиса эритроцитов в течение 10 минут при комнатной температуре, получив фракцию лейкоцитов периферической крови (ЛПК).

Фракции ЛПК центрифугировали, промывали и затем восстанавливали равным объемом буфера PBS, содержащего 1,0% BSA и азид натрия (например, 0,1 мл крови с 0,1 мл буфера для разведения). Образцы ЛПК окрашивали на льду в течение 30 мин смесью 0,1 мл F(ab)₂ Fc-FITC козы против hIgG, PE-антитела против CD3 и PerCP-антитела против CD45. После промывки образцы фиксировали 2% формальдегидом и подвергали FACS анализу на основе ввода 10000 клеток. Популяцию Т-лимфоцитов

сортировали с использованием PE-антитела против CD3.

3.2.2 Прямое связывание. Прямое связывание dB4 с CD4+ Т-клетками крови определяли у трех мужчин и трех женщин, участвующих в исследовании, при этом их недавно забранную ЭДТА-кровь инкубировали с dB4 при 37°C в течение 1 ч. МАт dB4

связывалось с CD4+ Т-клетками и, как обнаружили, достигало кажущегося насыщения в диапазоне концентрации 0,2-200 нг/мл. Популяцию Т-лимфоцитов сортировали с использованием PE-антитела против CD3. Методики эксперимента были такими же, как описанные выше в исследовании температурно-зависимого связывания, где клетки окрашивали F(ab)₂ Fcγ-FITC козы против hIgG для определения связывания dB4.

3.2.3 Свободные связывающие участки. Параллельно с вышеуказанным исследованием прямого связывания уровень свободных связывающих участков, оставшихся после связывания dB4 (перед полным заполнением рецептора), исследовали тогда же для каждого из трех мужчин и трех женщин, участвующих в исследовании. Методики эксперимента были такими же, как описанные выше для прямого связывания, за исключением того, что фиксированное количество dB4-Alexa при концентрации 250 нг/мл использовали для определения уровней незанятых свободных связывающих участков.

3.2.4 Калибрующие сферы. Для одновременного исследования прямого связывания и свободных связывающих участков, стандартную кривую зависимости log(MFI) от log(% сфер) строили в каждом из шести различных случаев при использовании комбинации двух наборов Molecular Probes LinearFlow™ (кат. L14821 и L14823). Комбинация наборов обеспечивает широкий калибранный диапазон стандартов высокой и низкой интенсивности для применения в экспериментах с использованием проточной цитометрии. В качестве референсных стандартов такие флуоресцентные сферы использовали для количественного определения относительной флуоресценции на клетках, меченных F(ab)₂ FcP-FITC козы против hIgG или dB4-Alexa.

4. Результаты и обсуждение

4.1 Профиль связывания dB4 и определение его абсолютной аффинности связывания (Kd) в CD4-положительных клетках HPB-ALL.

4.1.1 Равновесие активности связывания с клетками HPB-ALL. Перед полным исследованием реакции связывания лиганда и рецептора, время, требуемое для достижения равновесия, определяли для лиганда при различных концентрациях, т.е. состояние плато, когда скорость ассоциации равна скорости диссоциации. Общеизвестно, что чем ниже концентрация, тем больше времени требуется для достижения равновесия.

В случае взаимодействия dB4-CD4 в CD4-положительных клетках HPB-ALL, инкутируемых на льду, требовалось приблизительно 60 мин при концентрации 2,0 нг/мл и приблизительно 15 минут при концентрации 50 нг/мл для достижения плато в значении % связавшегося антитела. Почти мгновенное достижение плато наблюдали при концентрации dB4 100 нг/мл (0,1 мкг/мл) и более высоких уровнях.

Эти результаты указывают, что реакция связывания dB4 может быть проведена за 1 ч для широкого диапазона концентраций (например, при концентрациях $\geq 2,0$ нг/мл). Исследование связывания проводили в холода и/или в присутствии 0,05% азота, чтобы избежать потенциального эндоцитоза комплексов лиганд-рецептор. Инкубирование при комнатной температуре или 37°C могло обеспечивать более быстрое достижение плато реакции. При таких подобранных выше условиях, клетки HPB-ALL, с тремя различными пассажами клеток, инкубировали на льду в течение 1 ч с dB4. Супернатанты собирали для определения с помощью ELISA концентраций свободного лекарственного средства, при этом связанные фракции получали путем вычитания из общего количества. Абсолютную аффинность связывания и связывающую способность вычисляли с

помощью кривой связывания, показанной на **Фигуре 8**.

4.1.2 Прямое связывание с клетками HPB-ALL. В трех различных случаях (пассажах клеток) 2×10^5 клеток HPB-ALL инкубировали в течение 1 ч на льду с dB4 до ~2000 нг/мл, при этом антитело показало профиль насыщения связывания, характеризуемый 4-параметрической логистической функцией, где степень связывания была определена с помощью F(ab)₂ Fc-FITC козы против huIgG и выражена как средняя интенсивность флуоресценции (MFI). Связывание приближалось к насыщению при 200 нг/мл (0,2 мкг/мл) и более. Средняя EC₅₀ связывания, согласно оценке, составляла 42,2 нг/мл (Таблица 8) с небольшой вариацией между пассажами (n=3). Абсолютные значения MFI также нормализовали по % MFI с целью сравнения между пассажами. Стандартное отклонение, таким образом, было минимизировано, при этом значения EC₅₀ по существу остались такими же; значения EC₅₀ полного среднего связывания для обеих кривых средних значений, как оценивали, составляли 42,9 нг/мл (Таблица 8).

4.1.3 Аффинность связывания (Kd) и связывающая способность (Vmax) в клетках HPB-ALL. Сбор супернатантов после инкубирования (на льду в течение 1 часа) позволил с помощью ELISA определить концентрацию [F] свободного (несвязавшегося) dB4 и, таким образом, концентрацию связавшегося [B] антитела при вычитании из суммарной (полной) концентрации. Оценка абсолютной аффинности связывания с dB4 была выполнена при использовании профиля свободного лекарственного средства в сравнении со связанным лекарственным средством, как показано в **Таблице 9**. Средняя Kd согласно оценке составила $5,6 \times 10^{-11}$ М (диапазон: $3,1-8,1 \times 10^{-11}$ М), и Vmax согласно оценке составила $1,2 \times 10^6$ Ат на клетку (диапазон: $0,93-1,4 \times 10^6$). Эти результаты показали, что dB4 связывалось с рецепторами CD4 на клетках HPB-ALL с исключительно высокой аффинностью, и что клетки HPB-ALL имеют высокую плотность с более чем миллионом связывающих участков для dB4 на клетку в максимуме (**Таблица 9**). Плотность рецепторов CD4 на клетках HPB-ALL была по меньшей мере в 20 раз выше, чем на CD4+ Т-лимфоцитах крови, которая составляла приблизительно $3,2-6,1 \times 10^4$ связывающих участков на клетку.

4.2 Сравнение dB4 и B4 при связывании с клетками HPB-ALL.

Вопрос того, изменяла ли гуманизация посредством способа деиммунизации мышного антитела B4 до dB4 аффинность связывания, тщательно исследовали по двум техническим оценкам при использовании конкурентной схемы.

Во-первых, аффинности связывания мАт B4 и мАт dB4 исследовали на планшете ELISA, покрытом захватывающей смесью растворимого CD4 (sCD4) и пептида p2704a. Пептид p2704a имитирует рецепторный комплекс CD4-CCR5, поскольку он содержит последовательность эпитопа на CCR5, который ВИЧ-1 захватывает для входа в CD4-клетки. Связывание B4-биотина с покрытой смесью sCD4/p2704a ингибировалось в присутствии мАт B4 или мАт dB4 в различных концентрациях при анализе с помощью ELISA. В случае совместного присутствия антител мАт B4 или мАт dB4 и их конкуренции с B4-биотином за связывание с захватывающей белковой смесью, связывание B4-биотина было ингибировано B4 и dB4 со значениями IC₅₀ 5539 нг/мл и 8191 нг/мл, соответственно (**Фигура 9**). Отношение IC₅₀ B4 к dB4 составляло 0,68, указывая на то, что гуманизированное dB4 обладает аффинностью связывания, относительно сопоставимой с мышным антителом B4.

Во-вторых, относительную аффинность связывания также исследовали при использовании CD4-положительных клеток HPB-ALL, где B4 или dB4 антитела совместно

присутствовали и конкурировали с dB4-Alexa за связывание с клеточными рецепторами CD4. Проанализированное с помощью FACS связывание dB4-Alexa было ингибирано B4 и dB4 со значениями IC₅₀ 135 и 197 нг/мл, соответственно (**Фигура 10**). Отношение IC₅₀ B4 к dB4 составляло 0,69, что было по существу таким же, как было

⁵ продемонстрировано парадигмой ELISA, опять же указывая, что гуманизированное dB4 связывается с рецептором CD4 с аффинностью, относительно сопоставимой с мышиным антителом B4.

Это сравнительное исследование ингибиции конкурентного связывания с использованием исходного антитела B4 и его гуманизированного антитела dB4C7 (UB-10 421) обеспечило профиль связывания антитела против CD4-положительных Т-клеток (HPB-ALL), как измерено средней интенсивностью флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации антитела в ряде концентраций (от 100 до 104 нг/мл). Это исследование также подтвердило данные, представленные в **Таблицах 5 и 6**, что соответствующие нейтрализующие активности обоих антител в MT2 и в МКПК системах анализа обладают 15 сопоставимыми активностями нейтрализующих антител.

Результаты, полученные в этих сравнительных исследованиях, дают основание предположить, что гуманизация методом деиммунизации не привела к значительному уменьшению аффинности связывания dB4C7 (UB-421) с рецепторами CD4 по сравнению с его исходным мышевидным антителом B4.

4.3. Характеристики связывания мАт dB4 с CD4.

Были оценены характеристики связывания мАт dB4 с CD4.

4.3.1. Связывание мАт dB4 с растворимым CD4 и CD4, связанным с клетками. Как обсуждается выше, dB4 ингибирировало связывание B4-биотина с sCD4/p2704a с IC₅₀ 8191 25 нг/мл, согласно оценке ELISA (**Фигура 9**), и dB4 ингибирировало связывание dB4-Alexa с клетками HPB-ALL с IC₅₀ 197 нг/мл, согласно анализу FACS (**Фигура 10**). Примечательно, что эти данные демонстрируют, что dB4 имело намного более высокую аффинность связывания с CD4-положительными Т-клетками по сравнению с растворимым CD4 (sCD4). В частности, сравнение значений IC₅₀ в двух исследованиях показало, что 30 аффинность связывания dB4 была более чем в 40 раз выше в отношении CD4-положительных Т-клеток по сравнению с sCD4.

4.3.2. Сравнение dB4 и gp120 MN при связывании клеток HPB-ALL. Конкурентные исследования провели для сравнения аффинностей связывания dB4 и gp120 MN ВИЧ с CD4, связанным с CD4-положительными Т-клетками. В частности, сравнивали способность dB4 и gp120 MN ингибировать связывание dB4-Alexa с CD4 на клетках HPB-ALL (**Фигура 11**). В первом исследовании dB4 ингибирировало связывание dB4-Alexa с CD4 на клетках HPB-ALL с IC₅₀ 1,8 нМ. В сравнительном исследовании gp120 MN ингибирировал связывание dB4-Alexa с CD4 на клетках HPB-ALL с IC₅₀ 97,2 нМ. Согласно 40 этим результатам dB4, как обнаружили, обладало существенно более высокой аффинностью связывания с CD4 на HPB-ALL Т-клетках по сравнению с gp120 MN. В частности, сравнение значений IC₅₀ в двух исследованиях показало, что аффинность связывания dB4 с CD4 по меньшей мере в 50 раз выше, чем в случае gp120 MN.

4.3.3. Сравнение аффинности связывания dB4 и gp120 MN с CD4. Как обсуждается выше, мАт dB4 связывается с CD4 с аффинностью связывания (Kd) приблизительно 45 5,6×10⁻¹¹ М (**Таблица 9**). Ранее другими исследователями посредством кристаллографических исследований было обнаружено, что gp120 ВИЧ-1 связывается около домена 1 молекулы CD4 с высокой аффинностью связывания (Kd) приблизительно

5 5×10^{-9} М (Myszka, D.G., et al., "Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction" Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 1, 2000; 97(16): 9026-9031). Таким образом, сравнение значений Kd dB4 и gp120 показывает, что аффинность связывания dB4 с CD4 приблизительно в 100 раз выше, чем аффинность связывания gp120. Этот результат согласуется с вышеуказанными данными, что dB4 связывается с клетками HPB-ALL по меньшей мере в 50 раз сильнее, чем gp120 MN, на основе сравнения значений IC₅₀.

10 Общие результаты *in vitro*, как обсуждается выше, продемонстрировали, что dB4 могло бы блокировать или уменьшать заражение ВИЧ-1 посредством предотвращения или перекрывания входа вируса ВИЧ в клетку.

4.4. Температурно-зависимое связывание dB4 (UB-421) с CD4+ Т-клетками крови.

15 Связывание dB4 с CD4+ Т-клетками в человеческой крови при нормальной температуре тела (37°C) исследовали для определения, можно ли dB4 эффективно применять в качестве терапевтического средства у людей. Для имитации физиологических условий тела человека dB4C7 (UB-421) инкубировали с недавно забранной кровью при 37°C в течение 1 ч, и образцы лейкоцитов периферической крови (ЛПК) получали с помощью процедур лизиса эритроцитов. Инкубирование на льду (4°C) также проводили параллельно. Фракции ЛПК затем окрашивали F(ab)₂-FITC козы против huIgG для визуализации прямого связывания dB4 с рецепторами CD4 на CD4-сорттированных Т-клетках.

20 Было отмечено, что клеточное инкубирование с dB4 в течение 1 ч при 37°C, как оказалось, не вызывало эндоцитоза лиганд-рецептора, поскольку не наблюдали никакого изменения MFI мышного FITC-антитела против CD4(D2), по сравнению с инкубированием при 4°C (данные не показаны). Мышиное FITC-антитело против CD4 (D2) для сортировки CD4+ Т-клеток при концентрации 50-1000 нг/мл и dB4 (направленно взаимодействующее с доменом D1 рецептора CD4) при концентрациях до 200 нг/мл не конкурировали за связывание.

25 Как показано в образце крови одной женщины (**Фигура 12**), мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) инкубировали с dB4 при двух разных температурах, 37°C или 4°C, в течение 1 часа. Сортированные CD4+ Т-клетки окрашивали для наблюдения связывания dB4 на FACS. На **Фигуре 12** показано, что dB4 связывалось с рецепторами CD4 с аффинностью в 5 раз более высокой при 37°C, чем при 4°C, на основе значений IC₅₀ 4,8 нг/мл и 23,0 нг/мл, соответственно. Как ожидалось, dB4 достигало такой же максимальной MFI связывания при обоих температурных условиях.

30 35 Значения MFI отражают степень занятости рецептора, в особенности, если эти значения нормализованы и выражены в % MFI.

40 **4.4.1 Прямое связывание dB4 с CD4+ Т-клетками крови.** Также исследовали профиль связывания dB4 с CD4+ Т-клетками в человеческой крови при нормальной температуре тела (37°C). Прямую связывающую активность dB4 с CD4+ клетками крови оценивали в шести различных случаях при использовании недавно забранной крови шести взрослых (трех мужчин и трех женщин) (**Таблица 10**). После 1 ч инкубирования лейкоциты периферической крови выделяли, окрашивали F(ab)₂ Fc-FITC козы против huIgG и анализировали dB4, связанное с CD4-сорттированными Т-клетками, с помощью FACS. Образцы калибровали с референсными сферами для считывания флуоресценции.

45 Значения связывания (EC₅₀), как обнаружили, составляли от 2,6 нг/мл до 5,7 нг/мл, со средним EC₅₀ 4,1 нг/мл. Кроме того, максимальные значения % MFI изменились в пределах от 68% до 93%, при этом среднее составляло 77,8% (**Таблица 10**). Эти результаты отражают, что вариация между субъектами имеет незначительную значимость в

отношении аффинности связывания и плотности рецепторов, соответственно.

4.4.2 Свободные CD4 связывающие участки после связывания рецепторов мАт dB4.

Вместе с прямым связыванием dB4 с CD4+ клетками крови при 4°C (детектируемым антителом козы против hIgG), незанятые свободные CD4 связывающие участки на CD4+ клетках оценивали с помощью dB4-Alexa.

В отсутствие dB4 один dB4-конъюгат был способен достигать ~100% своего максимального связывания при концентрации приблизительно 250 нг/мл (**Фигура 13**). При концентрациях выше 500 нг/мл конъюгат dB4-Alexa мог вытеснять приблизительно 10% или больше связанного dB4 (данные не показаны). В частности, когда рецепторы были заняты dB4 на приближающемся к насыщению уровне 250 нг/мл, связывание dB4-Alexa (при концентрации 250 нг/мл) с рецепторами CD4 было полностью блокировано.

Снижение занятости рецептора при уменьшении содержания dB4, как наблюдали, сопровождалось увеличением связывания dB4-Alexa. Степень занятости рецептора, симметрично синхронизированная с уровнем свободных связывающих участков, при этом обе кривые пересекались приблизительно при 4,0 нг/мл (**Фигура 13**), согласуется с их значениями связывания EC₅₀ (**Таблица 10**).

Общие результаты, таким образом, указывают, что применение dB4-Alexa *in vitro* на уровне 250 нг/мл, в сочетании с MFI и %MFI, могло бы быть подходящей парадигмой для исследования занятости рецептора *in vivo* после введения dB4C7 (UB-421) людям.

5. Выводы

1. МАт dB4 реагирует с рецепторами CD4 на клетках HPB-ALL с необычно высокой активностью, достигая мгновенного равновесия на льду при концентрациях выше 50 нг/мл. Абсолютная аффинность связывания (Kd), согласно оценкам, составляла $5,6 \times 10^{-11}$ М, и максимально $1,2 \times 10^6$ молекул dB4 (B_{max}) могли связываться с одной клеткой HPB-ALL, которая имеет плотность рецепторов по меньшей мере в 20 раз выше, чем у нормальных CD4+ Т-клеток крови.

2. Гуманизация мышного B4 до мАт dB4 не приводит к значимому изменению аффинности связывания dB4 с рецепторами CD4. В схеме ингибиования связывания с использованием молекулярного ELISA (планшеты покрыты sCD4 и CCR5 эпитоп-содержащим пептидом p2704a), а также клеточного FACS с клетками HPB-ALL, оба антитела сопоставимо блокируют связывание индикаторов, таких как B4-биотин или dB4-Alexa, так как отношения IC₅₀ B4 к dB4, как наблюдали, составляли приблизительно 0,7 в обоих исследованиях.

3. Антитело dB4 связывается с рецепторами CD4 с аффинностью по меньшей мере в 50 раз более высокой, чем для белка оболочки gp120 MN ВИЧ-1. В частности, исследования ингибиования связывания с использованием клеток HPB-ALL продемонстрировали, что dB4 и gp120 MN ингибируют связывание индикатора dB4-Alexa со значениями IC₅₀ 1,8 и 97,2 нм, соответственно. Этот результат также согласуется с высокой аффинностью связывания dB4 (Kd), которая приблизительно в 100 раз выше, чем ранее сообщали для рекомбинантного gp120.

4. МАт dB4 связывается с CD4+ Т-клетками крови с аффинностью связывания, подобной клеткам HPB-ALL. При холодных условиях (4°C) dB4 имеет EC₅₀ приблизительно 23,0 нг/мл, а при нормальной температуре тела (37°C) dB4 связывается с CD4+ Т-клетками крови с приблизительно в 5 раз более высокой аффинностью, при этом значение связывания EC₅₀ оценивали на уровне 4,8 нг/мл.

5. Исследования с образцами крови, забранными у шести людей, подтвердили, что

присутствует прямая (обратно пропорциональная) корреляция между концентрацией dB4 и занятостью рецепторов CD4. Противоположные кривые, показанные на **Фигуре 13**, пересекаются приблизительно при 4,0 нг/мл, что соответствует среднему значению связывания EC₅₀ dB4 с CD4. Эти общие результаты указывают, что применение dB4-

⁵ Alexa *in vitro* (на уровне 250 нг/мл) в сочетании с измерением калиброванной флуоресцентными сферами %MFI, может быть подходящей парадигмой для исследования *in vivo* занятости рецепторов после введения dB4C7 (UB-421) людям.

ПРИМЕР 8

АНТИТЕЛО В4 ЭФФЕКТИВНО ИНГИБИРУЕТ БЕСКЛЕТОЧНУЮ И 10 МЕЖКЛЕТОЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ ВИЧ

Частицы ВИЧ обычно распространяются по всему телу путем бесклеточной передачи, когда вирус распространяется в кровотоке и локальном окружении, заражая клетки. Вирус также обладает способностью передаваться от инфицированных неинфицированным клеткам напрямую с помощью механизма, который требует ¹⁵ непосредственного межклеточного контакта. Такое распространение происходит, когда инфицированная клетка формирует стабильную точку контакта с неинфицированной клеткой и передает частицы ВИЧ непосредственно в неинфицированную клетку. Межклеточное распространение является более эффективным, более быстрым и не требует распространения в кровотоке по сравнению ²⁰ с бесклеточным распространением.

Sigal, A., et al., 2011 сообщали, что инфекции, происходящие от бесклеточного вируса, сильно уменьшаются в присутствии антиретровирусного средства тенофовира, тогда как инфекции, включающие межклеточное распространение, заметно менее чувствительны к лекарственному средству в анализе с сокультивированием (**Фигура 25**). Снижение чувствительности было достаточным, чтобы препятствовать завершению множества циклов инфекции в присутствии лекарственного средства. Авторы исследовали репликацию при межклеточном распространении в присутствии клинических концентраций лекарственного средства, используя стохастическую модель инфекции, и обнаружили, что репликация было неустойчивой, без существенного накопления ³⁰ мутаций. Если межклеточное распространение обладает такими же свойствами *in vivo*, это может иметь негативные последствия для иммунной системы, ведущие к неэффективной терапии у лиц с факторами риска, и потенциально способствовать вирусному персистированию и, следовательно, является барьером к излечению ВИЧ-инфекции.

³⁵ Поэтому важно оценить способность и активность мАт В4 и мАт dB4 родственных антител при ингибировании межклеточной передачи ВИЧ для оценки их потенциального действия в лечении.

1. Анализ для измерения опосредуемого антителом ингибирования межклеточной передачи ВИЧ

40 1.1 Материалы и методы

1.1.1 Клетки и вирусы. Клон Jurkat-inGLuc (Программа NIH по исследованию СПИДа и реагентов) с репортерным геном люциферазы, встроенным в геном ВИЧ-1, был выбран в качестве донорных клеток из-за низкой экспрессии поверхностного CD4 для минимизации инфекции от донора к донору в экспериментах сокультивирования с ⁴⁵ первичными CD4+ Т-клетками-мишениями. Репортерный ген люциферазы может экспрессироваться в инфицированных клетках и использоваться в качестве маркера вирусной инфекции. Эти экспрессируемые вирусом репортеры в инфицированных клетках можно измерять для количественной оценки ВИЧ-1 инфекции. Первичные

CD4+ Т-клетки использовали в качестве клеток-мишеней. В исследовании использовали вирусы UG266 и UG046 клады D.

1.1.2 Анализ межклеточной передачи вируса. В этом анализе доноры преинкубировали с антителом B4 в серийных разведениях перед смешиванием с указанными штаммами

5 ВИЧ-1 и использовали через несколько дней, когда ~10-75% клеток стали Gag+.

Донорные и CD4-положительные МКПК клетки-мишени затем смешивали в

соотношении 1:2 в 96-луночных планшетах в конечной концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/ мл в 200 мкл. Через 48 ч клетки окрашивали на внутриклеточный Gag и анализировали

10 с помощью проточной цитометрии. GLuc, накопленную в супернатанте культуры,

детектировали при использовании набора для анализа люциферазы *Gaussia BioLux* (New England Biolabs) и люминометра Berthold Technologies.

1.1.3 Вычисление IC₅₀ и IC₉₀. Кривые дозозависимого ингибиования были построены при аппроксимации данных с сигмоидальными кривыми доза-эффект (с переменным наклоном). Процент ингибиования определяли как (процентный сигнал в необработанных клетках-мишениях - процентный сигнал в обработанных антителом клетках)/(процентный сигнал в необработанных клетках-мишениях)×100. IC₅₀ и IC₉₀ были вычислены соответственным образом.

2. Результаты и обсуждение

20 В Таблице 11 показано, что антитело B4 могло ингибировать межклеточную и бесклеточную передачу ВИЧ (вирусные штаммы UG266 и UG046 клады С)

эквивалентным образом, при измерении согласно строгому критерию 90%

ингибиования входа. В частности, титры ингибиования слияния, как установили, составили 1:140 и 1:245 для вирусных штаммов UG266 и UG046 в анализа межклеточной

25 передачи, что было сопоставимо с титрами нейтрализации 1:136 и 1:234 в анализа

нейтрализации бесклеточной передачи, соответственно. Более высокие титры

ингибиования слияния для двух штаммов наблюдали в случае межклеточной передачи по сравнению с соответствующей бесклеточной передачей, при измерении согласно критерию 50% ингибиования входа.

30 Эти результаты демонстрируют, что антитело B4 обладает необычным свойством в силу своей способности ингибировать и межклеточную, и бесклеточную передачу ВИЧ по сравнению со всеми другими нейтрализующими моноклональными антителами, направленными против белков Env ВИЧ, и другими средствами АРТ, исследованными на настоящий момент. Эти результаты позволяют предположить, что мАт B4 и мАт dB4 родственные антитела исключительно пригодны для предотвращения бесклеточного и межклеточного распространения вируса ВИЧ у человека.

ПРИМЕР 9

АНТИТЕЛО UB-421 (DB4C7 ИЛИ DB4) ОПОСРЕДУЕТ РЕАКТИВАЦИЮ ПОКОЯЩИХСЯ МКПК ДЛЯ УСИЛЕННОЙ ВИРУСНОЙ РЕПЛИКАЦИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ

1. Общая информация

ВИЧ-1 инфицирует покоящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), но остается неактивным до последующей активации клеток. *In vitro* модель с использованием условий и протокола культивирования клеток, которые позволяют добиться непродуктивной инфекции в покоящихся Т-клетках, имитирующей латентное носительство ВИЧ-1 в неактивных МКПК, использовали для исследования стимулирующего действия термоинактивированных ВИЧ-1 (иВИЧ-1) или gp120-против-gp120 иммунных комплексов на таких покоящихся МКПК (Briant, L., et al., 1996).

Было продемонстрировано, что захват CD4 гликопротеинами оболочки термоинактивированных ВИЧ-1 (иВИЧ-1) или gp120-против gp120 иммунных комплексов являлся достаточным, при перекрестном связывании, чтобы стимулировать путь передачи сигнала, регулирующий активацию NF-кВ (т.е. ядерную транслокацию) и AP-1, который в свою очередь включает внеклеточный домен 1 (D1) и интрацитоплазматический домен CD4, а также несколько киназ (Lck, Raf-1, MEK и ERK), что вызывает индукцию прогрессии клеточного цикла, активацию экспрессии на поверхности клеток маркера активации CD25 и стимуляцию провирусной интеграции и заставляет клетки продуцировать вирус.

Данные отдельного научного исследования, полученные Таном с сотр. (Than, et al., 1997), также подтвердили, что перекрестное связывание молекул CD4 на gp120 связывающем участке моноклональным антителом против CD4 заставляет латентно инфицированные МКПК ВИЧ-инфицированных больных активировать вирусную репликацию. МАт против CD4, используемым в данном исследовании, являлось Leu3a, которое связывает CDR2-петлю D1 CD4. В частности, Leu3a направлено на линейный эпитоп, представленный пептидом с ак47-64 в домене 1 CD4 (Chiba, Y. 1992).

Кроме того, реактивация вируса в покоящихся МКПК, как обнаружили, была специфично индуцирована моноклональными антителами, направленными против CDR2-петли в домене 1 (D1) CD4, а не антителами, направленными против других эпитопов, таких как CDR3 в D1 или близлежащая область соединения D1/D2 (Briant, L., et al., 1999) (**Фигура 15**, сравнить дорожку 4 с дорожками 5 и 6). Такая реактивация вируса может быть предотвращена предшествующим поглощением лигандов CDR2-петли растворимым CD4 (sCD4) (**Фигура 15**, сравнить дорожку 4 и дорожку 8).

Таким образом, было важно оценить, может ли антитело dB4C7 (UB-421) с высокой аффинностью связывания с CD4 около области домена 1 опосредовать реактивацию покоящихся МКПК для усиления вирусной репликации у ВИЧ-инфицированных лиц.

2. Уточнение конформационного связывающего участка B4/dB4 вокруг D1 CD4

2.1 Ингибиование конкурентного последовательного связывания Leu3a с CD4-положительными МКПК шимпанзе моноклональным антителом B4, но не в обратном порядке

В данном исследовании использовали клетки МКПК шимпанзе, выделенные у двух субъектов (X282 и X301), а также мАт B4 (меченное FITC) и Leu3a (меченное PE). МКПК последовательно окрашивали соответствующими антителами и анализировали с помощью цитофлуорографии. Данные, полученные в этом эксперименте, приведены в **Таблице 12** и обсуждаются ниже.

В контрольных образцах с одной меткой клетки, окрашенные только Leu3a, давали положительный результат на связывание Leu3a-PE; и клетки, окрашенные только мАт B4, давали положительный результат на связывание B4-FITC. В частности, CD4+ клетки (детектируемые Leu3a) в неинфицированных образцах шимпанзе (X282 и X301) составляли 25,5% и 44,0% соответственно, аналогично клеткам, детектируемым мАт B4 (26,1% и 45,5%).

Предварительное связывание Leu3a с последующим контактом с мАт B4 приводило к двойному окрашиванию (Leu3a+/B4+) клеток МКПК в количествах, подобных контрольным клеткам с одиночным окрашиванием одним Leu3a или B4 (т.е. 24,5% и 46,7% для X282 и X301, соответственно).

Напротив, предварительное связывание мАт B4 с последующим контактом с Leu3a приводило только к МКПК, окрашенным только мАт B4 без положительного окрашивания Leu3a в методике с одиночным или двойным окрашиванием.

В совокупности эти результаты демонстрируют одностороннее ингибирование антителом B4-FITC против Leu3a-PE. Таким образом, связывание B4 не блокируется предыдущим связыванием Leu3a; однако связывание Leu3a блокируется предыдущим связыванием B4. Указанные данные подтверждают, что мАт B4 распознает

- 5 конформационные эпитопы, покрывающие область CDR2 домена 1 CD4, распознаваемые антителом Leu3a, и что мАт B4 связывается с этой областью CD4 с более высокой аффинностью по сравнению с антителом Leu3a.

2.2 Конкурентное ингибирование в ELISA связывания B4 с rsCD4 иммунной сывороткой, направленной против RC пептида ВИЧ (ак39-66)

10 Аффинность связывания мАт B4 с полноразмерным рекомбинантным растворимым CD4 (rsCD4) оценивали посредством исследования конкурентного ингибирования при использовании иммунной сыворотки, направленной против области CDR2 домена 1 CD4.

15 **2.2.1 Поликлональные антитела против RC ВИЧ.** Поликлональные антитела против области CDR2 домена 1 CD4 получали при иммунизации морских свинок циклическим пептидом, включающим ак39-66 CD4. Этот циклический пептид указан в данном исследовании как пептид рецепторного комплекса ВИЧ (RC пептид ВИЧ) и был ранее описан как пептид p2240c в Wang, et al., 2002.

20 В частности, сыворотка морской свинки, направленная против RC пептида ВИЧ, была получена в определенные моменты времени после внутримышечной иммунизации морских свинок линии Данкин-Хартли возрастом 4-6 недель 100 мкг в 0,5 мл на дозу в полном адьюванте Фрейнда в неделю 0 и неполном адьюванте Фрейнда в 3 и 6 недель, с последующими ежемесячными повторными иммунизациями в неполном адьюванте Фрейнда после этого.

25 Полученные поликлональные антитела указаны как "поликлональные антитела против RC ВИЧ".

30 **2.2.2 Конкурентное ингибирование связывания B4 с rsCD4 поликлональными антителами против RC ВИЧ.** Эксперимент по конкурентному ингибированию проводили при использовании 96-луночных микротитровальных планшетов, покрытых полноразмерным rsCD4 в концентрации 0,08 мкг/мл в количестве 0,1 мл на лунку. Лунки инкубировали с сывороткой морской свинки, забранной в 0, 3, 6, 9, 12, 14, 16 и 19 недель после иммунизации иммуногеном, направленным против RC пептида ВИЧ (ак39-66 CD4) в разведении 1:30 перед связыванием биотинилированным антителом B4, с последующим связыванием с конъюгированным авидином-HRP в качестве индикатора.

35 Также тестировали сыворотки отрицательного контроля (изотип RC) от неиммунизированных морских свинок, забранные в течение того же периода.

40 На **Фигуре 16** показано, что связывание биотинилированного B4 с rsCD4 было значимо ингибировано поликлональными антителами против RC ВИЧ, полученными в 6 недель после первой иммунизации, достигающими практически полного ингибирования через 9 недель после первой иммунизации.

45 Это исследование конкурентного ингибирования связывания также продемонстрировало, что связывающий участок мАт B4 расположен около петли CDR2 домена 1 CD4, хотя прямое связывание мАт B4 с этим пептидом не было значимым вследствие предпочтительного связывания мАт B4 с конформационным контуром мембрносвязанного CD4.

2.3 Реактивация покоящихся CD4-положительных Т-клеток для усиления продукции вируса у ВИЧ-инфицированного лица при перекрестном связывании мАт dB4

Способность мАт dB4 активировать покоящиеся CD4+ клетки оценивали посредством

обработки клеток мАт dB4 и контроля продукции ФНО- α , вирусной нагрузки и пролиферации клеток.

В данном исследовании 8-луночные культуральные планшеты покрывали человеческим IgG при инкубировании планшета с 200 мкл антитела козы против IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в течение 1 часа при 37°C. Покрытые планшеты хранили при 4°C в холодильной камере до следующего использования в данном исследовании.

МКПК больных ВИЧ размораживали в течение 1,5 часов согласно стандартной методике. Активацию покоящихся CD4+ клеток оценивали при обработке МКПК либо мАт dB4 (экспериментальным), PMA+PHA (положительный контроль), либо только средой (отрицательный контроль), как указано ниже.

2.3.1 Обработка мАт dB4. Клетки обрабатывали мАт dB4 при концентрации 3 мкг/10⁶ клеток/мл в течение 1 часа при 4°C, чтобы инициировать перекрестное связывание CD4 на клетках. Клетки обрабатывали мАт dB4, затем промывали и культивировали на покрытых 48-луночных культуральных планшетах в течение 7 дней со средой RPMI и 10% FBS. Лунку без покрытия также использовали в качестве отрицательного контроля. Аликвоты супернатанта культуры замораживали в день 0, день 2 и день 7 для последующей оценки. Точку времени День 0 для образца мАт dB4 получали при удалении супернатанта из клеток после 30 минут обработки при 4°C.

2.3.2 Обработка PMA+PHA. Клетки обрабатывали 0,1 мкм фитогемагглютинина (PHA) с 15 мкг/мл форболмиристатацетата (PMA) (Sigma) (PMA+PHA) на покрытых 48-луночных культуральных планшетах в течение 7 дней со средой RPMI и 10% FBS в качестве положительного контроля для реактивации покоящихся CD4+ клеток. Лунку без покрытия также использовали в качестве отрицательного контроля. Аликвоты супернатанта культуры замораживали в день 0, день 2 и день 7 для последующей оценки. Точку времени День 0 для образца PMA+PHA получали при удалении супернатанта из клеток после 30 минут обработки при 4°C.

2.3.3 Только среда. В качестве отрицательного контроля клетки инкубировали на покрытых 48-луночных культуральных планшетах в течение 7 дней со средой RPMI и 10% FBS (только среда). Лунку без покрытия также использовали в качестве дополнительного отрицательного контроля. Аликвоты супернатанта культуры замораживали в день 0, день 2 и день 7 для последующей оценки. Точку времени День 0 для образца чистой среды получали при удалении супернатанта из клеток после 30 минут инкубирования в среде при 4°C.

2.3.4 Анализ реактивации CD4+. Реактивацию CD4+ клеток определяли при оценке продукции ФНО- α , вирусной нагрузки и пролиферации клеток. Результаты этого исследования приведены в **Таблице 13**.

Аликвоты всех образцов анализировали по следующим показателям: (1) концентрация ФНО- α с помощью количественного ELISA; (2) вирусная нагрузка ВИЧ с помощью ОТ-ПЦР; (3) количество клеток; и (4) жизнеспособность при окрашивании трипановым синим, с использованием стандартных методов.

В частности, данные показывают, что перекрестное связывание покрытых мАт dB4 МКПК клеток от больных ВИЧ вызывало умеренную продукцию ФНО- α по сравнению с одной средой в отрицательном контроле (не поддается обнаружению) и клетками, стимулированными PMA+PHA (приблизительно в 3-5 раз выше, чем в покрытых мАт dB4 клетках).

Кроме того, образец мАт dB4 пролиферировал со скоростью, аналогичной чистой среде отрицательного контроля; тогда как стимулированные PMA+PHA клетки

пролиферировали в намного более высокой степени по сравнению с клетками, перекрестно связанными мАт dB4 (количества клеток в культуре РМА+РНА были в 5 раз выше, чем в культуре мАт dB4 в день 7).

Однако вирусная нагрузка ВИЧ была значительно увеличена в клетках, перекрестно

связанных мАт dB4, по сравнению с контрольной средой и РМА+РНА-стимулированными клетками. В частности, клетки, перекрестно связанные мАт dB4, показали 151% и 220% увеличение вирусной нагрузки по сравнению с одной средой в качестве отрицательного контроля в дни 2 и 7, соответственно; тогда как культура РМА+РНА показала субоптимальную продукцию вирусной нагрузки (55% и 78% в дни 10 2 и 7, соответственно) несмотря на 5-кратное увеличение пролиферации клеток.

3. Выводы

1. Мышиное мАт B4, как обнаружили, распознавало конформационный участок на CD4 рядом с участком, распознаваемым антителом Leu3a (ак47-64 в области CDR2).

МАт dB4, как ожидают, будут иметь такие же свойства распознавания, как описанные 15 в настоящей заявке для мАт B4, на основе сравнительных исследований, представленных в Примере 7.

2. Связывание мышного мАт B4 с полноразмерным rsCD4 было ингибирировано поликлональными антителами, направленными против циклического пептида, содержащего ак39-66 области CDR2 домена 1 CD4 (RC пептид ВИЧ). Эти результаты 20 указывают, что мАт B4 распознает ак39-66 CD4, которые соответствуют CDR2 петле D1 CD4. МАт dB4, как ожидают, будут иметь такие же свойства распознавания, как описанные в настоящей заявке для мАт B4, на основе сравнительных изучений, представленных в Примере 7.

3. Перекрестное связывание CD4 с мАт dB4, как установили, активировало продукцию 25 вириуса в ВИЧ-инфицированных МКПК CD4+ Т-клетках. В частности, мАт dB4 приводит к индукции продукции ФНО- α и увеличенной продукции ВИЧ без индукции пролиферации клеток, как показано в **Таблице 13**.

4. Согласно результатам, полученным в данном Примере, мАт dB4 (включая UB-421) может опосредовать реактивацию покоящихся МКПК для увеличения продукции 30 вириуса у ВИЧ-инфицированных лиц.

ПРИМЕР 10

МАт DB4C7 И ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ RC ВИЧ ИНГИБИРУЮТ АНТИГЕН-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ-КЛЕТОК И ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ (IL2 И IFN- γ) CD4-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ Т-КЛЕТКАМИ, НАРУШАЯ, ТАКИМ ОБРАЗОМ, ВИЧ ПАТОГЕННЫЙ ЦИКЛ ПИРОПТОЗА

1. Общая информация

Недавние сообщения показали, что при ВИЧ-инфицировании пермиссивных активированных CD4+ Т-клеток, гибель клеток проходит "молча", посредством каспаза-3-зависимого апоптоза (Doitsh, G., et al., 2014). С другой стороны, когда или R5, или X4-тропный ВИЧ abortивно инфицирует непермиссивные, неактивные CD4+ Т-клетки из лимфоидной ткани, эти клетки погибают путем каспаза-1-зависимого пироптоза, интенсивно воспалительной формы апоптоза. Интерферон-индуксирующий фактор 16 (IFI16) был идентифицирован как сенсор хозяйской ДНК, который распознает неполные 40 обратные транскрипты ВИЧ, что, в свою очередь, инициирует активацию каспазы-1 (Monroe, K.M., et al., 2013). В большинстве лимфоидных тканей человека, включая миндалины, лимфатические узлы и селезенку, активированная и пермиссивная 45 субпопуляция клеток составляет 5% или меньше от общего количества CD4 Т-клеток,

тогда как непермиссивные неактивные клетки составляют 95% или больше мишней, с которыми сталкивается ВИЧ. Таким образом, каспаза-1-опосредованный пироптоз, не каспаза-3-опосредованный апоптоз, представляется преимущественно ответственным за направление гибели CD4 Т-клеток после инфицирования вирусом ВИЧ этих

5 лимфоидных тканей. Эти результаты также подтверждаются анализом недавно выделенных лимфатических узлов у субъектов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, в ходе которого каспаза-1 и IL-1 β обнаруживаются в паракортикальной зоне, которая богата покоящимися CD4 Т-клетками, тогда как активность каспазы-3 обнаруживается в анатомически отличных герминативных центрах, где обнаруживают продуктивно

10 инфицированные клетки.

Пироптоз, скорее всего, вызывает быстрое устранение различных бактериальных инфекций, удаляя внутриклеточные ниши репликации и усиливая защитные ответы организма-хозяина посредством высвобождения провоспалительных цитокинов и эндогенных сигналов опасности. Впрочем, при патогенном хроническом воспалении, 15 таком как при ВИЧ-инфекции, пироптоз не является защитной реакцией и не приводит к устраниению первичной инфекции. На самом деле пироптоз, по-видимому, создает дефектный патогенный цикл, в котором гибнущие CD4 Т-клетки высвобождают воспалительные сигналы, которые привлекают еще больше клеток в инфицированную лимфоидную ткань, погибающих и вызывающих еще более сильное воспаление. Эти 20 события формируют хроническое состояние воспаления, которое способствует прогрессированию заболевания и повреждению тканей. Хроническое воспаление может также вызывать сохранение скрытого резервуара ВИЧ, стимулируя гомеостатическую пролиферацию CD4 Т-клеток памяти.

Истощение CD4 Т-клеток и развитие хронического воспаления являются 25 сигнатурными процессами в патогенезе ВИЧ, которые способствуют прогрессированию заболевания, при этом пироптоз обеспечивает неожиданную связь между этими двумя процессами, способствующими развитию заболевания.

Данные, приведенные выше, позволяют предположить, что пироптоз, который 30 протекает в лимфоидных тканях в процессе ВИЧ-инфекции, может быть облегчен или уменьшен с помощью механизма, который подавляет пролиферацию CD4+ клеток и/или продукцию воспалительных цитокинов, вызванную антигенной стимуляцией CD4+ клеток.

2. Эксперимент

Исследование проводили с целью определения, может ли мАт dB4 нарушать 35 патогенный цикл, вызванный пироптозом, ингибируя развитие хронического воспаления у ВИЧ-инфицированных лиц. Ингибирование продукции цитокинов, вызванной антигенным стимулом, могло бы облегчить бремя пироптоза во многих покоящихся Т-клетках, которые уже имеют abortивную ВИЧ-инфекцию, нарушая, таким образом, патологию ВИЧ при истощении CD4-положительных Т-клеток вследствие продукции 40 цитокинов.

In vitro модель с использованием стафилококкового энтеротоксина В (SEB) применяли для оценки способности мАт dB4C7 (UB-421) ингибировать пролиферацию МКПК Т-клеток как у здоровых, так и у ВИЧ-инфицированных лиц. SEB представляет собой суперантителен, который обладает способностью стимулировать все Т-клетки, несущие 45 определенный Т-клеточный антигенный рецептор (TCR), и вызывает мощную продукцию цитокинов.

В сотрудничестве с д-ром Huyen Cao и д-ром Mohamed Elrefaei, функциональные анализы здоровых людей-доноров (n=3) и ВИЧ-инфицированных доноров (n=6, АРТ-

наивных, количество CD4+ >200, вирусная нагрузка >10000) проводили для оценки, могут ли мАт dB4C7 (UB-421) или поликлональные антитела против RC ВИЧ, направленные против CDR2 области D1 CD4 (описанные в Примере 9), ингибировать пролиферацию клеток и продукцию цитокинов (IL2 и IFN- γ).

2.1 Субъекты исследования и образцы.

ВИЧ-положительные, не подвергавшиеся терапии АРТ, добровольцы (n=6) набирали из когорты REACH (Сан-Франциско). Три подобранных по возрасту, ВИЧ-серонегативных контрольных добровольца также включали в исследование. МКПК выделяли и криоконсервировали в жидким азоте до времени анализа.

2.2 Насыщающая концентрация мАт dB4C7 или очищенных поликлональных антител против RC ВИЧ, которые использовали.

CD4+ Т-клетки сначала окрашивали в непрямом иммунофлуоресцентном исследовании с использованием мАт dB4C7 IgG или поликлональных IgG антител против RC ВИЧ, затем Alexa-антителом козы против HuIgG или Alexa-антителом козы против IgG морской свинки, соответственно. Полученные в результате окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на процент обнаруженных положительных клеток. МАт dB4C7 и поликлональные антитела против RC ВИЧ титровали между 50 мкг/мл и 0,0025 мкг/мл в 2-кратном разведении. Титрование антител для мАт dB4 и антител против RC ВИЧ определяли как % связывания CD4 в зависимости от концентрации антитела в мкг/мл. Эти титрования оценивали перед применением в функциональных анализах Т-клеток, проводимых у ВИЧ-инфицированных и здоровых лиц.

На Фигуре 17 показано, что насыщающие концентрации для соответствующих реагентов, используемых в функциональных анализах, как установили, составляли 1 мкг/мл для мАт dB4 (dB4C7) и 25 мкг/мл для поликлональных антител против RC ВИЧ.

2.3 Пролиферация CD4+ или CD8+ Т-клеток.

Пролиферацию клеток анализировали с помощью флуоресцентного анализа с CFSE (сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина), который образуется в результате потери красителя CFDA-SE (карбоксифлуоресцеина диацетата (сукцинимидиловый сложный эфир) в процессе клеточного деления. CFSE использовали в качестве заменителя в анализе (пролиферации) с ^3H -тимидином.

МКПК инкубировали с насыщающими концентрациями мАт dB4C7 или очищенных поликлональных антител против RC ВИЧ для покрытия рецепторов CD4 на поверхности клеток. Клетки также инкубировали с изотипом антитела против RC ВИЧ при концентрации 25 мкг/мл и PHA (10 мкг/мл; Sigma-Aldrich) в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

МКПК метили CFDA-SE (Molecular Probes, Eugene, OR) в PBS, затем тушили флуоресценцию 100% FCS (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Затем клетки ресуспендировали в RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) с 10% FCS после промывки PBS.

Затем клетки культивировали в присутствии Аг SEB (1 мкг/мл) в течение 5 дней при 37°C в 5% CO₂ и анализировали на экспрессию поверхностных маркеров.

Проточную цитометрию проводили для исследований CD3+ (Amcyan) очищенных CD4+ (PE, D2), CD8+ (PercpCY5.5) популяций клеток, каждую из которых затем измеряли на % CFSE-положительных клеток в % от пролиферирующих клеток. Сорок тысяч (40000) лимфоцитов на образец получали при использовании LSR II (BD Biosciences, Mountain View, CA) и выполняли анализ с помощью программы FLOWJO (TreeStar, San Carlos, CA). Результаты измеряли в % от делящихся CD4 (или CD8) Т-клеток. Все участники исследования продемонстрировали значительную пролиферацию после

стимуляции РНА. Пролиферация CD4T клеток без стимуляции Аг SEB (отрицательный контроль) составила <0,5%.

2.4 Анализ с внутриклеточным окрашиванием для измерения продукции цитокинов (IL2 и IFN- γ).

МКПК ($0,5 \times 10^6$ клеток) инкубировали в течение 2 часов с Аг SEB (1 мкг/мл) при 37°C в 5% CO₂. Клетки промывали PBS, содержащим 0,1% FCS (промывочный буфер) и фиксировали путем ресуспенсирования клеток в лизисном растворе (BD Biosciences) в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки один раз промывали промывочным буфером, затем permeabilizировали при ресуспенсировании в 0,5 мл permeabilizationного раствора 2 (BD Biosciences) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали промывочным буфером и окрашивали антителами против IL-2 APC, против IFN- γ (PE CY7) и против CD3 (Amcyan), против CD4 (PE, D2) или против CD8 (Percp CY5.5) (BD Pharmingen). Сорок тысяч (40000) лимфоцитов на образец получали при использовании LSR II (BD Biosciences) и проводили анализ с помощью программы FLOWJO (TreeStar). Процент цитокин-продуцирующих CD4 или CD8 T-клеток без стимуляции Аг составил <0,05% (отрицательный контроль). Результаты были выражены в % CD4+ (или CD8+) T-клеток, которые экспрессируют IFN- γ или IL2.

2.5 Статистический анализ.

Статистический анализ и сравнения выполняли при использовании парного t-критерия.

3. Результаты

Результаты, полученные в этом исследовании Аг SEB-индуцированной пролиферации Т-клеток, показали, что и мАт dB4C7 (1 мкг/мл), и поликлональные антитела против RC ВИЧ (25 мкг/мл) при насыщающих условиях уменьшали пролиферацию CD4+ Т-клеток, но не пролиферацию CD8+ Т-клеток как у не подвергавшихся лечению АРТ больных ВИЧ, так и у подобранных по возрасту здоровых людей (данные не показаны).

МАт dB4 (1 мкг/мл) и очищенные поликлональные антитела против RC ВИЧ (25 мкг/мл), при их соответствующих насыщающих CD4 поверхности МКПК связывающих концентрациях, подавляли продукцию IL2 в индуцированных суперантителом SEB пролиферирующих CD4+ Т-клетках у ВИЧ-отрицательных (Фигура 18а) и ВИЧ-положительных (Фигура 18б) лиц. Такая супрессия не была обнаружена в CD8+ Т-клетках от тех же ВИЧ-положительных и отрицательных лиц (Фигура 18с).

МАт dB4 (1 мкг/мл) и очищенные антитела против RC ВИЧ (25 мкг/мл), при их соответствующих насыщающих концентрациях, также подавляли продукцию IFN-гамма в индуцированных суперантителом SEB пролиферирующих CD4+ Т-клетках у ВИЧ-отрицательных (Фигура 18д) и ВИЧ-положительных (Фигура 18е) лиц. Такая супрессия не была обнаружена в CD8+ Т-клетках от тех же ВИЧ-отрицательных (Фигура 18ф) и положительных (Фигура 18г) лиц.

4. Выводы

Антитело мАт dB4C7 (UB-421) и поликлональные антитела против RC ВИЧ, направленно взаимодействующие с областью CDR2 домена 1 CD4, как установили, подавляли индуцированную суперантителом SEB пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов (IL2 и IFN- γ) в CD4-положительных Т-клетках, но не пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов (IL2 и IFN- γ) в CD8-положительных Т-клетках. Сведения о том, что dB4C7 и поликлональные антитела против RC ВИЧ могли подавлять пролиферацию CD4+ Т-клеток и ассоциированную продукцию цитокинов (IL2 и IFN- γ), указывают, что антитело может проявлять подобные подавляющие действия в отношении

ассоциированной с другими CD4-положительными клетками продукции цитокинов, с потенциалом нарушения патогенного цикла пироптоза при ВИЧ.

Подавляющее действие в отношении пролиферации CD4-положительных Т-клеток и ассоциированной продукции цитокинов (IL2 и IFN- γ), наблюдаемое в этом и

- 5 предыдущих Примерах, имеет высокую значимость в том отношении, что антитела, направленные против области CDR2, описанные в настоящей заявке, могут оказывать одновременные противоположные действия на CD4-клетки, включающие: (1) реактивацию покоящихся ВИЧ-инфицированных CD4-положительных Т-клеток с индукцией высвобождения ВИЧ из своего латентного статуса (как обсуждается в
- 10 Примере 9); (2) конкурентное ингибирирование и предотвращение входа в неинфицированные CD4-положительные Т-клетки нового вируса ВИЧ, высвобождаемого в результате реактивации покоящихся CD4+ Т-клеток (Примеры 4 и 6); и (3) ингибирирование пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов в CD4-положительных Т-клетках при (супер) антигенной стимуляции (данный Пример).

- 15 Уникальные биологические особенности мАт dB4 и поликлональных антител против RC ВИЧ, направленно взаимодействующих с самим участком связывания ВИЧ, и инициирование иммунных ответов (т.е. область CDR2 домена 1 CD4), обеспечивают свойства, требуемые для функционального излечения ВИЧ-инфекции, а именно способность (1) предотвращать ВИЧ-инфекцию посредством ингибирирования входа;
- 20 (2) активировать продукцию вируса в покоящихся Т-клетках; и (3) непосредственно изменять продукцию цитокинов.

ПРИМЕР 11

- ДО- И ПОСТКОНТАКТНАЯ ПРОФИЛАКТИКА, А ТАКЖЕ ЛЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ мАт В4 У ШИМПАНЗЕ, ИНФИЦИРОВАННЫХ 25 ПЕРВИЧНЫМ ИЗОЛЯТОМ ВИЧ ВИЧ-1_{DH12} КЛАДЫ В

- Продемонстрировав многие уникальные свойства *in vitro* для В4 родственных высокоаффинных антител, направленно взаимодействующих с областью CDR2 домена 1 CD4, было важно проверить эффективность антитела В4 в предотвращении и/или лечении ВИЧ-инфекции в модели на животных, которые более всего подобны людям.
- 30 Шимпанзе использовались более 100 лет для моделирования человеческих вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций. С помощью тщательно разработанной модели инфекции у шимпанзе с использованием первичного изолята ВИЧ ВИЧ-1_{DH12} клады В, исследования с инфицированием были начаты для оценки потенциальной способности мАт В4 обеспечивать пассивный иммунитет против ВИЧ-1 инфекции в до- и постконтактном режимах. В частности, мАт В4 оценивали на его способность обеспечивать (1) стерилизующий иммунитет для защиты субъекта, подвергнутого контакту, от инфекции и (2) лечение субъекта, подвергнутого контакту, в случае применения антитела через несколько дней после начала инфекции.

1. До- и постконтактная профилактика ВИЧ-инфекции с применением мАт В4 у шимпанзе.

Оценивали потенциальную способность мАт В4 обеспечивать пассивный иммунитет против ВИЧ-1 инфекции в до- и постконтактном (контакт с ВИЧ-1) режимах.

1.1 Методы.

- 45 1.1.1 Животные, используемые в исследовании. В общей сложности в этом исследовании использовали четыре (4) шимпанзе. Один шимпанзе использовался в качестве животного для доконтактного лечения (X084), два шимпанзе использовались в качестве животных для постконтактного лечения (X356 и X357), и один шимпанзе использовался в качестве контроля (X259).

1.1.2 Восприимчивость животных к заражению стоком ВИЧ-1_{DH12}. Восприимчивость животных к заражению стоком ВИЧ-1_{DH12} была определена *in vitro* при заражении их МКПК перед лечением и заражении. Все культуры инфицировали в течение 3 дней контакта с вирусом.

1.1.3 Антитело мАт В4. мАт В4 для инфузии приготавливали в виде высокоочищенного препарата антитела в концентрации 5 мг/мл.

1.1.4 Профилактика/лечение до заражения. Шимпанзе X084 внутривенно вливали 5 мг/кг мАт В4 за 1 час до заражения ВИЧ-1_{DH12}.

1.1.5 Профилактика/лечение после заражения. Шимпанзе X356 и X357 внутривенно вливали 5 мг/кг мАт В4 через 1 час после заражения ВИЧ-1_{DH12}.

1.1.6 Контрольное животное. Шимпанзе X259 заражали ВИЧ-1_{DH12} без инфузии антитела мАт В4.

1.1.7 Заражение ВИЧ-1_{DH12}. Четырех (4) шимпанзе внутривенно инфицировали 100

TCID₅₀ ВИЧ-1_{DH12}, взятым из стока вируса, подготовленного ранее, и титровали в МКПК шимпанзе в Юго-Западном фонде биомедицинских исследований США (Southwest Foundation for Biomedical Research).

1.1.8 Обнаружение вируса ВИЧ-1_{DH12}. Развитие инфекции у шимпанзе контролировали

с помощью обнаружения вирусемии плазмы, ассоциированной с клетками вирусной нагрузки и иммунного ответа на ВИЧ при помощи ПЦР-амплификации ДНК последовательности gag, сокультивирования, ELISA с захватом p24 и иммуноблоттинга. Вирусемию сыворотки, указывающую на наличие ВИЧ-инфекции, измеряли в копиях ВИЧ-1 РНК/мл во всех образцах крови, забранных в течение 50-недельного периода

исследования у всех шимпанзе. Вирус ВИЧ-1_{DH12} обнаруживали в МКПК шимпанзе при выделении вируса и ПЦР-анализе ДНК с целью обнаружения провирусной ДНК, соответствующей gag. Продукцию вируса оценивали с помощью ELISA с захватом антигена p24 (Coulter). Серийные разведения от 1×10^6 до 1×10^2 клеток МКПК шимпанзе

и клеток лимфатических узлов были приготовлены для сокультивирования с 2×10^6 клеток из 3-дневных РНА-стимулированных бластов в среде с IL-2. Лунку с наибольшим разведением, которое приводило к продукции p24, брали в качестве конечного результата.

1.1.9 Содержание животных. Шимпанзе держали в Юго-Западном фонде биомедицинских исследований в соответствии с рекомендациями Национального научно-исследовательского совета США и с одобрением институционального IACUC.

1.2. Результаты

Стерилизующий иммунитет был получен с применением мАт В4 у шимпанзе, подвергнутых заражению ВИЧ-1_{DH12}. Никакие маркеры инфекции не удалось обнаружить в течение 32 недель наблюдения после заражения у животного, которому делали инфузию антитела мАт В4 до заражения ВИЧ-1 (X084) (**Фигура 19а**), или у двух животных, которым делали инфузию антитела мАт В4 через 1 час после обработки ВИЧ-1 (X356 и X357) (**Фигура 19б**).

В то же время, вирус с легкостью выделяли из МКПК контрольного животного (X259), начиная с недели 1 после заражения (**Фигура 19с**), и из плазмы к неделе 2 после заражения. Вирус также выделяли из клеток лимфатического узла X259, забранного на биопсию в недели 4 и 20. Инфицированные клетки в МКПК и компартментах лимфатических узлов были обнаружены при разведениях, содержащих количества

клеток, которые колебались в пределах от 1×10^4 до 1×10^6 . Сероконверсия у животного X259 происходила к неделе 4.

Присутствие свободного, несвязанного мАт В4, обнаруживаемого в кровотоке, быстро снижалось у шимпанзе X084, X356 и X357, обработанных антителом. CD4+ и CD8+ субпопуляции обработанных шимпанзе наблюдали в течение 20 недель после заражения без подтверждения CD4+ истощения. Не было никакой супрессии пролиферативной реакции МКПК шимпанзе на митогены (РНА, митоген фитолакки и конканавалин А) в течение недели 32.

Результаты данного исследования указывают, что мАт В4 может обеспечивать предотвращение или стерилизующее излечение ВИЧ-инфекции, подтверждаемое обширным последующим наблюдением вирусемии в сыворотке и других параметров даже через один год со дня заражения.

1.3. Выводы

В исследовании на шимпанзе ВИЧ-инфекция, вызванная вирулентным первичным изолятом, была прервана при введении мАт В4 до или через короткий промежуток времени после контакта. Переданный иммунитет являлся стерилизующим без подтверждения наличия транзиентной, сниженной или отсроченной вирусемии. Полная защита была очевидной, несмотря на быстрый клиренс антитела мАт В4 из плазмы, изолированного на CD4+ клетках в периферической крови и лимфоидной ткани.

Этот тщательно выполненный эксперимент также позволил предложить схему лечения с применением мАт В4 или родственного антитела в количестве 5 мг/кг для (i) больных в течение нескольких часов от контакта с ВИЧ или (ii) детей, рожденных материами, серопозитивными на момент родов, для достижения стерилизующего излечения.

1.4 Применения для постконтактной профилактики мАт В4 .

В Руководстве Службы здравоохранения США рекомендована постконтактная профилактика с применением антиретровирусных средств для медработника после случайного контакта с ВИЧ. Однако в Руководстве Службы здравоохранения США выражены сомнения по поводу токсичности лекарственных средств, которые в настоящее время доступны для постконтактной профилактики.

Результаты, полученные в данном исследовании, демонстрируют потенциал применения мАт В4 в качестве постконтактного профилактического лечения, которое может применяться вместо или вместе с текущим постконтактным лечением. Низкая токсичность и эффективность мАт В4 демонстрируют потенциальную способность антитела обладать более широкой активностью по сравнению с антиретровирусными средствами.

Эти результаты также указывают, что мАт В4 может применяться для предотвращения наследственной передачи ВИЧ от матери ребенку. Передача ВИЧ от матери ребенку (МТСТ), также называемая перинатальной или наследственной передачей, происходит, когда ВИЧ передается от ВИЧ+ женщины ее ребенку во время беременности, родов и/или родоразрешения или кормления грудью. Шанс МТСТ составляет приблизительно 25% во время беременности, родов и родоразрешения для ВИЧ+ женщины, не проходящей лечение вируса. Существует дополнительный 12% шанс МТСТ у не проходящей лечение ВИЧ+ женщины, которая кормит своих детей грудью. Во всем мире в 2001 году 1,8 миллиона женщин стали ВИЧ-инфицированными, и приблизительно 800000 детей также стали ВИЧ-инфицированными, большинство из них через МТСТ. Значительная доля людей, которым недавно поставили диагноз ВИЧ, во всем мире имеет возраст 15-24 года. Очень важным компонентом предотвращения

МТСТ должно быть предотвращение ВИЧ у молодых людей, особенно девочек и молодых женщин, прежде чем они начнут вести половую жизнь, и лечение уже инфицированных лиц. Дополнительную информацию, имеющую отношение к МТСТ, можно найти по адресу: caps.ucsf.edu/archives/factsheets/mother-to-child-transmission-

⁵ mtct#sthash.DTRyms46.dprf. Результаты, полученные с мАт В4, дают основание предположить, что МТСТ можно предотвратить на стадии родов и родоразрешения посредством однократного введения 5 мг/кг или больше мАт dB4 новорожденному ребенку ВИЧ+ женщины.

2. Лечение ВИЧ-инфекции с применением мАт В4 у шимпанзе.

2.1 Метод.

¹⁰ 2.1.1 **Животные, используемые в исследовании.** Шимпанзе X084, X356 и X357, используемых в предыдущем профилактическом исследовании и защищенных от инфекции ВИЧ-1_{DH12} после получения однократного введения мАт В4 в количестве 5 мг/кг, снова использовали в данном исследовании с инфицированием в режиме лечения.

¹⁵ 2.1.2 **Восприимчивость животных к заражению стоком ВИЧ-1_{DH12}.** До лечения антителами и заражения ВИЧ, у животных получали МКПК для определения восприимчивости к заражению ВИЧ-1_{DH12}. Все *in vitro* культуры заражали в течение 3 дней инокуляции вирусом.

²⁰ 2.1.3 **Антитело мАт В4.** МАт В4 для инфузии приготавливали в виде высокоочищенного препарата антитела в концентрации 5 мг/мл.

2.1.4 **Заражение ВИЧ-1_{DH12}.** Всех животных (X084, X356 и X357) заражали внутривенно 100 TCID₅₀ ВИЧ-1_{DH12}, взятых из стока вируса, подготовленного ранее, и титровали в МКПК шимпанзе в Юго-Западном фонде биомедицинских исследований.

²⁵ 2.1.5 **Лечение после заражения.** Шимпанзе X084 не получал лечения после заражения. Шимпанзе X357 делали инфузию 5 мг/кг мАт В4 в день 14 после заражения, когда вирусемия ВИЧ была у зараженного животного наиболее высокой, для лечения ВИЧ-инфекции. Шимпанзе X356 делали инфузию 5 мг/кг мАт В4 в дни 14, 18 и 22 после заражения.

2.2 Обзор результатов

Это исследование пассивной иммунотерапии проводили с инфузиями 5 мг/кг мышного мАт В4 для определения терапевтической эффективности мАт В4 у шимпанзе с острой фазой ВИЧ-инфекции. Трем шимпанзе (X084, X356 и X357) внутривенно (в/в) вводили ВИЧ-1_{DH12} и развитие инфекции подтверждали по результатам обнаружения вируса (не показаны) и количественной ОТ-ПЦР.

³⁵ РНК из ВИЧ-1_{DH12} была обнаружена (выше исходного уровня) с помощью ОТ-ПЦР через 7 дней после контакта у всех шимпанзе (X084, X356 и X357). Ассоциированный с клетками вирус был обнаружен в МКПК и клетках лимфатических узлов всех трех животных в течение 14 дней при выделении вируса и с помощью ДНК-ПЦР для обнаружения интеграции ВИЧ-1_{DH12}.

⁴⁰ В день 14 после заражения двум зараженным шимпанзе (X356 и X357) делали инфузию мАт В4 (5 мг/кг, в/в). В дни 18 и 22 после заражения одно животное (X356) получало две дополнительные дозы антитела (5 мг/кг, в/в). Вирусную нагрузку контролировали с помощью анализа ОТ-ПЦР с еженедельными интервалами в течение первых 12 недель, а затем ежемесячно до 40 недель после заражения. В день 14 после заражения, день, в который шимпанзе X356 и X357 получали инфузию мАт В4, вирусная РНК уже была в фазе быстрого роста. Эти два шимпанзе, получающие антитело, затем испытали

быстрые и значимые снижения своей вирусной нагрузки в 1-2 log в день 20, и заметное уменьшение продолжительности первичного виремического периода с четырех недель до одной недели (**Фигура 20а**, закрашенный круг), по сравнению с необработанным шимпанзе (X084) (**Фигура 20а**, незакрашенный круг).

⁵ На **Фигурах 20а** и **20б** сравнивается продолжительность вирусемии плазмы у необработанного контрольного шимпанзе X084 (из этого исследования, который раньше получал одну доконтактную дозу мАт B4), и необработанного контрольного X259 (из предыдущего исследования, который не получал дозу мАт B4) с шимпанзе X356, получающим три инфузии мАт B4. Шимпанзе X084 (**Фигура 20а**, незакрашенные ¹⁰ круги) и X259 (**Фигура 20б**, незакрашенные круги) заражали ВИЧ-1_{DH12} без какого-либо вмешательства, при этом вирусемия начала проявляться уже в день 3, обнаруживаемая в форме копий РНК ВИЧ-1 в сыворотке, после заражения вирусом. Продолжительность вирусемии ВИЧ-1 в сыворотке длилась приблизительно 42 дня, что характерно для инфекции ВИЧ-1_{DH12}. Шимпанзе X356 (**Фигуры 20а** и **20б**, закрытые ¹⁵ круги) получал три введения мАт B4, при этом вирусемия ВИЧ-1 резко снижалась, достигая неподдающегося обнаружению уровня в или приблизительно в день 21. Сравнение данных по вирусной нагрузке у X356 с X084 и X259 показывает снижение до 21 дня с характерной продолжительности вирусемии при инфекции ВИЧ-1_{DH12}.

²⁰ Как отмечено выше, необработанный контрольный шимпанзе X084 из этого исследования получал одно доконтактное введение мАт B4 в предыдущем исследовании; тогда как необработанный контрольный шимпанзе X259 из предыдущего исследования не получал введения мАт B4. Примечательно, что сравнение данных, полученных для X084 (**Фигура 20а**, незакрашенные круги), с X259 (**Фигура 20б**, незакрашенные круги) ²⁵ показывает, что X084 имел общую более низкую вирусную нагрузку в течение периода исследования по сравнению с X259. Таким образом, хотя вирусная нагрузка у необработанного животного в данном исследовании (X084) была значительно выше, чем у получавшего мАт B4 животного (X256), предшествующее воздействие мАт B4 у X084, по-видимому, значительно уменьшает общую вирусную нагрузку, особенно во ³⁰ время острой фазы ВИЧ-инфекции (сравнение X084 с X259). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что любое введение мАт B4 до контакта с ВИЧ может уменьшить интенсивность вирусной нагрузки во время острой фазы инфекции, что может также уменьшить передачу вируса от человека к человеку после заражения.

³⁵ Также выполнили окрашивание поверхности клеток и обнаружили, что мАт B4 оставалось связанным с CD4+ клетками в течение по меньшей мере семи дней у животного, получившего одну дозу мАт B4 в день 14 (X357), и сохранялось в течение по меньшей мере 14 дней у животного, получившего множество доз антитела (X356). Напротив, свободное мАт B4 обнаруживали в кровотоке у обоих животных в течение только трех дней после инфузии, при измерении нейтрализующей активности против изолята ВИЧ-1_{DH12}. Как и в профилактическом исследовании на шимпанзе, это согласуется с удалением мАт B4 из кровотока в результате связывания с CD4+ клетками.

⁴⁰ Анализ FACS обнаруживал CD4+ клетки во всех образцах в течение 40 недель при иммуноокрашивании *in vitro* на эпитоп CD4/B4, без заметного истощения. Иммуноокрашивание введенного инфузией мАт B4 было выполнено на МКПК в ⁴⁵ течение первого 21 дня. Митоген-индукцированная пролиферативная реакция (с использованием Con A, PWM или PHA) образцов МКПК до и после терапии антителами была различной и, по-видимому, не была затронута инфузией мАт B4. Эти наблюдения указывают, что мАт B4 способно нарушать вирусную инфекцию и уменьшать как

вирусную нагрузку, так и виремический период без доказательств неспецифической иммунотоксичности.

ПРИМЕР 12

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА UB-421, ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5 ФАРМАКОЛОГИИ/ТОКСИЧНОСТИ НА БАБУИНАХ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ТКАНЯХ

Введение

Данные, полученные из клеточной культуры и исследований на шимпанзе, обсуждаемые в предыдущих Примерах, продемонстрировали достаточную научную 10 значимость, чтобы оправдать дальнейшую разработку фармацевтической композиции, содержащей мАт dB4 для применения человеком. Фармацевтическую композицию, содержащую мАт dB4C7 (UB-421), изготавливали и проводили исследования общей безопасности на партиях, изготовленных для клинического применения.

Также проводили группу доклинических исследований безопасности с целью 15 получения фармакодинамических, фармакокинетических данных, информации по токсичности и безопасности для кандидатного лекарственного средства UB-421.

Исследования с однократным и многократным введением, а также дозозависимые (в низких и высоких дозах) исследования проводили на бабуинах (виды *Papio*), чтобы упростить схему клинического исследования фазы I для оценки дозозависимой 20 безопасности, переносимости и иммунотоксичности UB-421 у бессимптомных, инфицированных ВИЧ-1 людей, участвующих в исследовании. Бабуины использовались в качестве модели на животных в доклинических исследованиях фармакологии/ токсичности, поскольку CD4+ Т-клетки бабуинов обладают подобной аффинностью 25 связывания с мАт dB4C7, что и люди, как показано на **Фигуре 21** (т.е. EC₅₀=0,33 мкг/мл и 0,29 мкг/мл для человека и бабуина, соответственно). Исследования фармакологии у не относящихся к человеку приматов и исследования токсичности на бабуинах были начаты и выполнены в сотрудничестве с д-ром Krishna Murthy в Юго-Западном фонде биомедицинских исследований, отделении вирусологии и иммунологии, Сан-Антонио, Техас.

30 Кроме того, исследования перекрестной реактивности выполняли для оценки, имеет ли UB-421 какую-либо непредусмотренную реактивность и потенциальные области локализации цитотоксичности в тканях человека, не соответствующие предполагаемой мишени.

Как более подробно обсуждается ниже, данные, полученные в этих доклинических 35 исследованиях, демонстрируют достаточную научную значимость, чтобы оправдать дальнейшую разработку UB-421 в качестве нового исследуемого лекарственного средства в клинических испытаниях с участием людей.

1. Фармацевтическая композиция

Фармацевтические композиции, содержащие мАт dB4C7, были изготовлены для 40 применения человеком. В целом фармацевтические композиции, содержащие мАт dB4C7, могут быть изготовлены в подходящем буфере, включающем, без ограничения, цитрат, фосфат, Трис, бис-Трис и т.д., при pH от 6,0 до 7,0, и могут также содержать вспомогательные вещества, такие как сахара (от 50 мМ до 500 мМ сахарозы, трегалозы, маннита или их смесей), поверхностно-активные вещества (например, 0,025-0,5% Tween 45 20 или Tween 80), и/или другие реагенты.

UB-421 является обозначением фармацевтической композиции, содержащей 10 мг/ мл мАт dB4C7, 20 мМ глицина и 0,05% (об/об) Tween (полисорбата 20) в фосфатно- солевом буферном растворе (PBS), pH 6,5.

Лекарственные формы с высокой концентрацией мАт dB4 также были изготовлены для применения в некоторых областях, включая растворы для подкожных инъекций, которые содержали 10 мМ гистидина.

После производства проводили исследования общей безопасности и токсичности,

- 5 чтобы гарантировать, что изготовленный фармацевтический продукт можно безопасно вводить человеку и подопытным животным.

2. Исследования общей безопасности

2.1 Производственные партии UB-421 и критерии безопасности

Два крупномасштабных производства фармацевтического продукта UB-421 (P/N

- 10 Z807, партии № 225711 и 225758) подготовили для применения в клинических исследованиях и оценивали на общую безопасность.

Крупные серии (партии) UB-421 считались безопасными и пригодными для клинического применения, если следующие критерии были удовлетворены в течение 7-дневного периода тестирования: (1) все животные выживали в течение периода 15 тестирования; (2) не наблюдалось никакие очевидные проявления токсичности; и (3) ни у одного животного не было значительной потери веса между временем введения фармацевтической композиции до конца периода тестирования.

2.2 Подопытные животные

Мыши: (альбиносы линии BALB/cByJNarl (*Mus musculus*), без специфической

- 20 патогенной микрофлоры, самцы (National Animal Research Laboratory (NLAC), Taiwan)). (Номер исследования BIO-003.90)

Морские свинки: (альбиносы линии Хартли (*Cavia porcellus*), без специфической патогенной микрофлоры, самцы (National Taiwan University Hospital (NTUH), Animal Center, Taiwan)). (Номер исследования BIO-003.91)

2.3 Методы

Двум (2) мышам и двум (2) морским свинкам внутрибрюшинным путем вводили каждую партию UB-421. Контрольным мышам и морским свинкам внутрибрюшинным путем вводили изотонический раствор хлорида натрия ("S.T.", партия № 1OC0206).

- Каждая мышь получала общий объем 0,5 мл, и каждая морская свинка получала общий 30 объем 5,0 мл. Вес животных регистрировали перед введением доз (день 0) и перед прекращением (день 7). Каждое животное ежедневно наблюдали на предмет общего состояния здоровья и клинических проявлений токсичности.

2.4 Анализ и выводы

Результаты исследования общей безопасности дали следующие удовлетворительные

- 35 результаты для проанализированных критериев:

(1) Все животные, используемые в teste общей безопасности, оставались в живых в течение периода тестирования.

(2) Никаких очевидных проявлений токсичности у обработанных UB-421 животных не наблюдали.

- 40 (3) Ни одно животное не потеряло вес в течение периода тестирования.

На основании вышеизложенного партии сочли отрицательными на присутствие неожиданных, недопустимых посторонних примесей.

- Эти результаты подтвердили, что партии крупномасштабного производства UB-421 (партии № 225711 и 225758) были отрицательными на присутствие неожиданных или 45 недопустимых посторонних примесей. Таким образом, эти две партии считали безопасными и приемлемыми для применения в клинических исследованиях с участием людей.

3. Исследование А: Исследования токсичности при однократном введении UB-421 на

бабуинах

3.1 Методы

В исследовании A оценивали фармакодинамику, фармакокинетику и безопасность при однократном введении либо низкой дозы (5 мг/кг массы тела), либо высокой дозы (25 мг/кг массы тела) UB-421 в течение 42-дневного периода, как показано в Таблице 14а. В этом исследовании UB-421 вводили внутривенным вливанием либо в дозе 25 мг/кг, либо 5 мг/кг массы тела в течение 30 минут. Образцы крови забирали для анализа фармакокинетики (ФК) в 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 часа и в дни 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42.

Образцы крови исследовали с помощью проточного цитометрического анализа для контроля присутствия CD4+ Т-лимфоцитов при использовании следующих маркеров: домен 1 CD4 (антитело против CD4+D1) и домен 2 CD4 (антитело против CD4+D2). Alexa-dB4 использовали и в качестве маркера, и в качестве индикатора конкурентного связывания CD4 моноклональными антителами UB421 и антителами, направленными против домена 1 и 2 CD4. Alexa-антитело козы против huIgG использовали в качестве индикатора моноклональных антител, направленных против домена 1 и 2 CD4. Кроме того, антитела, направленные против CD3 и CD14, использовали для контроля общего количества Т-клеток (CD3) и моноцитов (CD14) в препарате МКПК.

3.2 Обзор результатов

В исследованиях фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности не зарегистрировали никаких систематических отрицательных наблюдений, которые могли бы давать основание для отказа от перехода к клиническим испытаниям UB-421 фазы I на людях. В отношении всех оцениваемых параметров следует отметить, что любую точку данных, которая, как было установлено, была значимо выше или ниже средних значений ("вне диапазона нормальных значений"), наблюдали как у контрольных, так и у подопытных животных.

Начальные фармакокинетические (ФК) показатели UB-421 оценивали при исследовании проб крови, полученных у бабуинов, получавших однократное введение низкой дозы (5 мг/кг) и высокой дозы (25 мг/кг) UB-421.

Результаты данного исследования показали, что терапия UB-421 приводила к существенному уменьшению обнаружения CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и CD14+CD4+ моноцитов, выделенных либо из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), либо из клеточных суспензий образцов биопсии лимфатических узлов. Предположили, что уменьшение этих клеток было вызвано "покрытием" CD4+ клеток UB-421, а не истощением CD4+ клеток у животных. Это предположение подтвердилось, когда было обнаружено, что не было изменения процента CD4+ Т-лимфоцитов, детектированных антителом к маркеру против CD4+ D2. Продолжительность такого "покрытия" CD4+ клеток UB-421 после инфузии составляла по меньшей мере 3 дня у животных, получавших низкую дозу, и по меньшей мере 7 дней у животных, получавших высокую дозу. После того как UB-421 больше не обнаруживалось в плазме животных, "покрытие" на CD4+ клетках уменьшалось, и CD4+ клетки (детектируемые антителом против CD4+ D1) возвращались к такому же проценту, который был обнаружен антителом против CD4+D2.

Подводя итог, следует отметить, что в этом исследовании UB-421 оказалось безопасным и могло покрывать CD4-положительные клетки полностью по меньшей мере в течение 3 дней при введении низкой дозы UB-421 и по меньшей мере 7 дней при введении высокой дозы UB-421. На основе результатов, обсуждаемых в предыдущих Примерах, в случае полного покрытия CD4+ клеток вход ВИЧ в клетки будет полностью

исключен, что приведет к снижению вирусной нагрузки.

4. Исследование В: Исследования токсичности при многократном введении на бабуинах

4.1 Методы

В исследовании В оценивали фармакодинамику, фармакокинетику и токсикологию

5 при многократном введении либо низкой дозы (5 мг/кг массы тела), либо высокой дозы (25 мг/кг массы тела) UB-421 в течение 56-дневного (8-недельного) периода, как показано в Таблице 14b. В этом исследовании Фаза лечения состояла из 8 полных введений UB-421, выполняемых с еженедельными интервалами (одно введение в неделю). В конце 10 8-недельной Фазы лечения половину прошедших лечение животных вскрывали и обследовали (Таблица 14b, Часть 1). Остальные животные проходили 12-недельную 15 Фазу восстановления, в которой животные оставались под наблюдением и подвергались забору образцов крови и лимфатических узлов (Таблица 14b, Часть 2). Образцы крови (и биоптаты лимфатических узлов*) забирали у животных для анализа в дни 0*, 1, 3, 7*, 14, 21, 28, 35*, 42, 49, 56* во время Фазы лечения и в дни 63*, 70, 77, 91, 105*, 133 во 20 время Фазы восстановления. Взрослые самцы (M) и самки (M) бабуинов (n=20; возраст: 7-18 лет) использовались в качестве системы тестирования.

4.2 Обзор результатов

Информация по фармакокинетике, фармакодинамике, токсичности и безопасности 20 при многократных введениях низкой дозы (5 мг/кг) и высокой дозы (25 мг/кг) UB-421 была получена из обширной группы доклинических исследований.

В совокупности данные, полученные в Части 1 и Части 2 Исследования В, показали, что кандидатное лекарственное средство UB-421 имело научную значимость для дальнейшей разработки в качестве нового исследуемого лекарственного средства. В исследованиях фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности не зарегистрировали 25 никаких систематических отрицательных наблюдений, которые могли бы давать основание для отказа от перехода к клиническим испытаниям UB-421 фазы I на людях. В отношении всех оцениваемых параметров следует отметить, что любую точку данных, которая, как было установлено, была значимо выше или ниже средних значений ("вне диапазона нормальных значений"), наблюдали как у контрольных, так и у подопытных 30 животных.

4.2.1 Анализ крови и биопсия. Обширную группу анализов выполняли с образцами, полученными от животных, получавших многократные введения низкой дозы и высокой дозы UB-421. Результаты этих анализов представлены в Таблицах 15 и 17 и обсуждаются ниже.

35 UB-421 поддавалось обнаружению в плазме в течение по меньшей мере 3 дней у животных, получавших низкую дозу (5 мг/кг) UB-421, и в течение по меньшей мере 7 дней у животных, получавших высокую дозу (25 мг/кг) UB-421, при использовании теста UBI ELISA (обсуждаемого в Примере 7) и анализа МТ-2 (обсуждаемого в Примере 2). Избыток UB-421 был обнаружен в плазме некоторых животных, получавших 40 высокую дозу, в течение по меньшей мере 14 дней после последней инфузии.

Антитела бабуина, направленные против UB-421, не были обнаружены ни у одного из 16 животных, получавших UB-421, подтвердив, что кандидатное лекарственное средство не было иммуногенным у получавших лечение животных.

Все бабуины были привиты вакциной против вируса гепатита В (HBV) (Merck) в дни 45 0 и 28. Детектируемые уровни антител бабуина против вируса гепатита В наблюдались в день 56 у 4 из 4 контрольных (1B) животных, у 6 из 8 бабуинов, получавших низкую дозу (2B) UB-421, и у 3 из 8 бабуинов, получавших высокую дозу (3B) UB-421. Эти результаты указывают, что "покрытие" CD4+ клеток UB-421 может вызывать у

некоторых животных гиперактивность, препятствующую иммунизации антигенами. Однако такой эффект гиперактивности, как установили, был обратимым, поскольку эти животные смогли вырабатывать антитела против вируса гепатита В после прекращения терапии UB-421 и дополнительной иммунизации вакциной против вируса гепатита В.

4.2.2 Наблюдения и результаты вскрытия. Макро и микроскопические исследования бабуинов, получавших лечение в этом исследовании, представлены в Таблицах 16 и 17.

В целом ткани, взятые у всех бабуинов, оцениваемых в данном исследовании (Части 1 и 2), не показали каких-либо необычных или систематических патологических изменений, которые могли быть связаны с введением UB-421 на уровнях низкой или высокой дозы.

Офтальмоскопические обследования (глаз) проводили на всей Группе 3В (высокая доза) животных (n=8) при включении в исследование, перед инфузией, и повторно, в конце Фазы лечения, через одну неделю после последней инфузии. Офтальмологические заключения у этих животных показали, что оба глаза оставались в пределах нормальных показателей во всех тестах, сделанных в конце Фазы лечения.

Показатели электрокардиограммы (ЭКГ) были получены у всех животных (n=20) до, во время и после прекращения введения каждой дозы. Заключения по электрокардиограмме у всех исследованных животных показали, что обнаруженные изменения ЭКГ находились в рамках нормальной ежедневной вариации.

4.2.3 Результаты токсикологического исследования, обеспечивающие регистрацию IND (нового экспериментального ЛС)

Не было никаких существенных различий в результатах иммунотоксичности между группами, получавшими UB-421 (2В и 3В), и контрольной группой (1В), за исключением пониженного иммунного ответа на вакцинацию HBV. Результаты клинических лабораторных исследований, офтальмологические (глазные) заключения, показатели ЭКГ и результаты гистопатологии подтверждали выводы, что UB-421 являлось безопасным и хорошо переносимым у взрослых бабуинов после получения восьми еженедельных инфузий при величине дозы до 25 мг/кг, лечения, которое обеспечивало эффективное покрытие клеток-мишеней без их истощения.

5. Исследование перекрестной реактивности в человеческих тканях

Как обсуждается в предыдущих Примерах, антитела мАт dB4, в том числе мАт dB4C7 (главный компонент в кандидатном лекарственном средстве UB-421), демонстрируют высокую аффинность связывания с CD4 и, в частности, мембранным CD4 на Т-клетках. В следующем доклиническом исследовании оценивали, связывается ли мАт dB4C7 с другими типами клеток, при использовании набора тканей из 30 человеческих органов. Цель данного исследования состояла в оценке, обладает ли мАт dB4C7 какой-либо случайной реактивностью и потенциальными локализациями цитотоксичности в человеческих тканях, не соответствующими предполагаемой мишени.

5.1 Методы

Иммуногистохимическое исследование проводили при использовании замороженной по стандарту FDA матрицы тканей, содержащей в общей сложности 90 столбиков ткани из 30 органов, при этом каждый орган был взят у 3 здоровых доноров (срезы тканевых микроматриц (TMA) BioMax, Rockville, MD). Дополнительные криостатные срезы индивидуальных человеческих образцов также включали в набор человеческих тканей, как описано в Таблице 18. Набор человеческих тканей исследовали на иммунореактивность при использовании биотинилированного мАт dB4C7 и контрольного реагента (биотинилированного антитела козы против IgG кролика) для

оценки специфичности и нежелательной аутореактивности.

5.2 Результаты

Картинами окрашивания, наблюдавшимися в срезах нормальной ткани взрослых, осматривал и оценивал на предмет реактивности сертифицированный клинический патолог в PhenoPath Laboratories (Seattle, WA). Сильное положительное окрашивание поверхностных мембран наблюдалось в тимусе и Т-клеточно-зависимых областях в миндалине (и лимфатических узлах), и слабая положительная реактивность была отмечена в селезенке. Случайные мононуклеарные клетки, ассоциируемые с лимфоцитами или макрофагами, окрашивались положительно во множестве тканей с ожидаемой картиной. Также было отмечено слабое по центру окрашивание клеток Купфера в печени. За исключением слабого окрашивания эндогенного биотина в некоторых тканях, все другие исследованные ткани взрослых людей были отрицательными. Предварительное инкубирование срезов миндалины с немеченым антителом мАт dB4C7 блокировало картину специфического окрашивания. Никакой неожиданной перекрестной реактивности не наблюдали.

Эти результаты подтвердили, что мАт dB4C7 (главный компонент в UB-421) не обладает случайной перекрестной реактивностью, которая потенциально могла приводить к цитотоксичности в человеческих тканях, не соответствующих предполагаемой мишени.

ПРИМЕР 13

ОТКРЫТОЕ ДОЗОЗАВИСИМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗЫ I, С ОДНОКРАТНЫМ ВВЕДЕНИЕМ, ДЛЯ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ И ФАРМАКОКИНЕТИКИ UB-421 У БЕССИМПТОМНЫХ ВИЧ-1 ИНФИЦИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ

1. Цели

Основная цель состояла в оценке безопасности и переносимости однократной внутривенной инфузии возрастающих доз UB-421 у бессимптомных, инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) субъектов, при этом дополнительная цель состояла в определении фармакокинетики однократной внутривенной инфузии возрастающих доз UB-421 у бессимптомных ВИЧ-1 инфицированных субъектов (идентификационный код клинического исследования: NCT01140126).

2. Методика

Открытое, с однократным введением, дозозависимое (с повышением дозы), двухцентровое, несравнительное.

3. Количество участников

В общей сложности зарегистрировали 20 участников (5 субъектов в каждой когорте).

4. Диагноз и основные критерии включения

Субъекты должны были соответствовать всем следующим критериям для участия в данном исследовании.

1. ВИЧ-1 серопозитивный;

2. Возраст 20 лет или старше;

3. Для версии протокола от 09 марта 2010: Бессимптомные, при определении исследователем на основе истории болезни, медицинского осмотра, электрокардиограммы (ЭКГ), при этом результаты анализов коагуляции, а также клинической биохимии и общих анализов крови при скрининговом визите (посещение 1, V1), должны быть в диапазоне нормальных значений $\pm 10\%$;

4. Для версии протокола от 01 июля 2010: Бессимптомные, определенные как больные без острого или симптоматического вирусного гепатита в течение 24 недель до скринингового визита (посещение 1, V1), и не имевшие случаев СПИД-определенного

заболевания, которое было определено исследователем на основе истории болезни, медицинского осмотра, ЭКГ и лабораторных показателей;

5. Для версии протокола от 09 марта 2010: количество CD4+ Т-клеток >350 клеток/⁵ мм³ и вирусная нагрузка ВИЧ-1 >5000 копий/мл, полученные при скрининговом визите (посещение 1, V1);

6. Для версии протокола от 01 июля 2010: количество CD4+ Т-клеток >350 клеток/⁵ мм³ и вирусная нагрузка ВИЧ-1 >5000 копий/мл, полученные в течение 4 недель до скринингового визита или при скрининговом визите (посещение 1, V1);

10 7. Не подвергавшиеся лечению, т.е. наивные субъекты, не получавшие предыдущей или текущей антиретровирусной терапии;

8. Не кормящие грудью, в отношении женщин;

9. Субъекты должны иметь отрицательный результат анализа сыворотки на беременность при скрининговом визите для женщин, способных к деторождению;

15 10. Субъекты должны согласиться использовать средства барьерной контрацепции (женский или мужской презерватив) в течение периода исследования; и

11. Субъекты должны подписать информированное согласие перед прохождением каких-либо процедур в исследовании.

5. Исследуемый продукт (продукты) и метод воздействия

20 UB-421 (dB4C7 мАт) поставлялся в концентрации 10 мг/мл (100 мг во флаконе объемом 10 мл).

Субъекты были разделены на четыре (4) когорты, содержащих по 5 субъектов, на основе получаемой дозы UB-421. Каждый зарегистрированный в исследовании субъект получил однократное внутривенное вливание UB-421 с одной из следующих величин дозы: 1 мг/кг массы тела (Когорта 1), 5 мг/кг массы тела (Когорта 2), 10 мг/кг массы тела (Когорта 3) или 25 мг/кг массы тела (Когорта 4) в день 0 (Посещение 2, V2).

Подходящий объем UB-421 вычисляли на основе указанной дозы и массы тела субъекта. Объем каждой отдельной дозы регулировали при использовании стерильного раствора хлорида натрия, чтобы каждый отдельный субъект в когорте получал вливание в эквивалентном инфузируемом объеме лекарственного средства. Затем дозу UB-421 вводили с помощью инфузионного насоса.

6. Продолжительность лечения:

Период времени, начиная от скрининга, лечения и последующего наблюдения: 62-90 дней. Период времени, начиная от инфузии до конца исследования: 60 дней.

7. Критерии оценки:

7.1 Основные конечные показатели оценки безопасности:

1. Медицинский осмотр (РЕ)

2. Основные показатели жизнедеятельности

3. Клинические анализы биохимии и общие анализы крови

40 4. Число случаев нежелательных явлений (AE)/тяжелых нежелательных явлений (SAE)

5. Электрокардиограмма (ЭКГ)

7.2 Дополнительные конечные показатели оценки безопасности:

45 1. Концентрации антител против UB-421 (иммуногенность UB-421) в сыворотке были выполнены в день 0 (до вливания), день 14, день 28 и день 60 после введения дозы.

2. Начальное количество CD4+ Т-клеток оценивали в скрининговый визит (V1), или оно было основано на доскрининговых данных, полученных в течение 4 недель до скринингового визита.

3. Последующие количества CD4+ Т-клеток оценивали в день 60 после введения дозы.

8. Конечный показатель эффективности:

Конечный показатель эффективности оценивали как изменение вирусной нагрузки ВИЧ-1 относительно исходного показателя. Исходную вирусную нагрузку ВИЧ-1 определяли как вирусную нагрузку, оцениваемую в скрининговый визит V1.

9. Фармакокинетика (ФК)

В отношении UB-421 оценивали следующие фармакокинетические параметры (РК):

1. C_{max} : наблюдаемая максимальная концентрация лекарственного средства в

сыворотке после введения дозы.

2. T_{max} : время, за которое была достигнута C_{max} .

3. λ_z : константа скорости элиминации (в конечной фазе).

4. $t_{1/2}$: полупериод элиминации (в конечной фазе).

5. $AUC_{(0 \rightarrow last)}$: площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени с нулевого момента времени (введение) до момента анализа последнего образца.

6. $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$: площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени с нулевого момента времени до бесконечности.

7. CL: сывороточный клиренс лекарственного средства из организма.

8. $V\beta$: объем распределения в фазе элиминации.

9. V_{ss} : объем распределения в равновесном состоянии.

10. $MRT_{(0 \rightarrow \infty)}$: среднее время удержания ($MRT_{(0 \rightarrow t)}$), экстраполируемое до бесконечности.

10. Статистические методы:

10.1 Основные конечные показатели оценки безопасности

1. Медицинский осмотр: Физические патологии обобщали при использовании описательной статистики по центру, дню, когорте и в целом. Также представлены Таблицы перехода от начала исследования до последнего посещения.

2. Основные показатели жизнедеятельности: Основные показатели жизнедеятельности обобщали при использовании описательной статистики по каждому посещению.

Изменения относительно исходных значений также были представлены по центру, дню, когорте и в целом.

3. Клиническая биохимия и общие анализы крови: Результаты клинической биохимии и общих анализов крови обобщали по соответствующим посещениям при использовании описательной статистики. На основе профессиональных оценок исследователей и стандартных показателей диапазонов нормальных значений в каждом исследовательском центре результаты тестов распределяли в одну из четырех категорий: нормальные, патологические без клинической значимости (NCS), патологические с клинической значимостью (CS) и патологические с типично клинической значимостью (CST). Изменения патологии по результатам лабораторных исследований с начала исследования до последнего посещения также показаны в Таблицах перехода.

4. Число нежелательных явлений (AE): случаи AE до начала лечения, случаи AE при начале лечения (TEAE) и связанные с лекарственными средствами случаи AE обобщены по плотностям распределения. Каждый описанный случай AE был связан с одним кодом из Медицинского словаря регуляторной деятельности (MedDRA) и одним системно-органным классом. Таблицу классификации AE Национального института аллергии и инфекционных заболеваний, отделения исследования СПИДа (DAIDS), v1.0, использовали для оценки тяжести.

5. ЭКГ: данные регистрации ЭКГ, полученные при соответствующих посещениях, обобщали с помощью описательной статистики.

10.2 Дополнительные конечные показатели оценки безопасности

1. Концентрация антитела против UB-421 в сыворотке: концентрации антитела

5 обобщали по соответствующим посещениям.

2. Количество CD4+ Т-клеток: количества клеток и проценты клеток обобщали по соответствующим посещениям при использовании статистики распределения. Изменение от начала исследования до последнего посещения по количеству и проценту CD4+ Т-клеток также было обобщено.

10.3 Конечный показатель оценки эффективности

1. Вирусная нагрузка ВИЧ-1: Вирусную нагрузку ВИЧ-1 обобщали при использовании описательной статистики при каждом посещении. Изменение от исходных значений= (значение при посещении после лечения - значение при первом посещении) также было представлено по центру, дню, когорте лечения и в целом.

10.4 Оценка фармакокинетики

Фармакокинетические параметры обобщали при использовании описательной статистики при каждом посещении.

Согласно протоколу и плану статистических анализов (SAP), конечные показатели оценки безопасности анализировали на совокупности участников с назначенным

20 лечением (ITT), тогда как анализы эффективности будут выполнены как на ITT, так и на совокупности оценки эффективности. Что касается оценки ФК, поскольку только субъекты в TVGH имели доступные для сбора образцы для анализа данных ФК, эти субъекты были определены как совокупность ФК. Оценки ФК выполняли только для субъектов TVGH.

11. Обзор выводов

11.1 Результаты оценки эффективности, фармакокинетики и безопасности

11.1.1 Результаты оценки эффективности. Эффективность UB-421 оценивали при измерении изменений вирусной нагрузки ВИЧ-1 в различные моменты времени в течение исследования, как показано на **Фигуре 22а**. Анализы эффективности показывают, что

30 заметные чистые изменения средней вирусной нагрузки ВИЧ-1 были обнаружены у субъектов из Когорты 2 (5 мг/кг), Когорты 3 (10 мг/кг) и Когорты 4 (25 мг/кг) после инфузии UB-421, но не у субъектов в Когорте 1 (1 мг/кг).

Эффективность лекарственного средства на основе антитела UB-421 (mAb dB4C7) продемонстрирована снижением вирусной нагрузки до 2,25 log₁₀ (в группе 10 мг/кг)

35 после однократного введения (**Фигура 22б**). Максимальное среднее уменьшение вирусной нагрузки ВИЧ-1 для каждой когорты обобщенно представлено ниже и показано на **Фигуре 22б**:

Когорта 1 (1 мг/кг): 0,29 log₁₀ копий/мл в день 6 (V5)

Когорта 2 (5 мг/кг): 0,97 log₁₀ копий/мл в день 6 (V5)

40 Когорта 3 (10 мг/кг): 1,58 log₁₀ копий/мл в день 10 (V6)

Когорта 4 (25 мг/кг): 1,63 log₁₀ копий/мл в день 14 (V7)

Продолжительность супрессии ВИЧ-1 коррелировала с величиной дозы, при этом субъекты в когортах с более высокой дозой показали более длительную

45 продолжительность снижения вирусной нагрузки ВИЧ-1 по сравнению с субъектами в когортах с более низкой дозой (**Фигура 22а**). Продолжительность супрессии вирусной нагрузки ВИЧ-1 у субъектов, которым вливали самую высокую дозу UB-421 (Когорта 4, 25 мг/кг), сохранялась в течение наиболее длительного времени, приблизительно 28

дней.

Подводя итог, следует отметить, что антитело UB-421, как было обнаружено, оказывало сильное противовирусное действие в дозозависимом отношении при величине дозы 5, 10 и 25 мг/кг. Таким образом, более высокий % больных достигал $>1 \log_{10}$ уменьшения уровней РНК ВИЧ-1 в сыворотке при лечении UB-421 по сравнению с

5 TMB-355, при введении сопоставимых доз.

Теоретическое сравнение данных об эффективности из этого исследования с использованием UB-421 оценивали в сравнении с данными по эффективности, ранее опубликованным для TMB-355 (ранее известного как TNX-355; Kuritzkes, D.R., et al., 10 2004, Фигура 1), как показано на **Фигурах 23а-23с**. Согласно этому сравнению UB-421 достигало 10-кратного снижения вирусной нагрузки после однократного введения 10 мг/кг или 25 мг/кг у 100% исследуемых субъектов; тогда как TMB-355 смогло достичь 10-кратного снижения вирусной нагрузки только у 83% субъектов при использовании таких же дозировок.

15 **11.1.2 Результаты оценки фармакокинетики.** Фармакокинетические (ФК) параметры, перечисленные выше, оценивали для каждой дозы UB-421, используемой в данном исследовании (1, 5, 10 и 25 мг/кг). В **Таблице 19** обобщены результаты нескольких ФК параметров (C_{max} , $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, $T_{1/2}$ и MRT), оцениваемые у 3 субъектов в каждой когорте. Результаты показали корреляцию между значениями данных для каждого параметра ФК и вводимой дозы UB-421. Таким образом, увеличение дозы UB-421 с 1 мг/кг до 25 20 мг/кг соответствовало увеличению оцениваемого параметра ФК. В частности, C_{max} увеличилась с 28,6 мкг/мл до 462,5 мкг/мл; $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ увеличилась с 201 мкг·ч/мл до 51367 мкг·ч/мл; $T_{1/2}$ увеличился с 14,4 часов до 85,4 часов; и $MRT_{(0 \rightarrow \infty)}$ увеличилось с 21,6 часов до 97,4 часов.

25 **11.1.3 Результаты оценки безопасности.** Показатели безопасности UB-421 оценивали с помощью медицинского осмотра, по основным показателям жизнедеятельности, клинической биохимии и общим анализам крови, случаям AE/SAE и ЭКГ. Количество CD4+ Т-клеток и концентрацию антител против UB-421 также измеряли для обеспечения дальнейшей оценки безопасности.

30 Общий процент случаев TEAE с оценкой тяжести составлял 65,0% (13 из 20 субъектов) в общей сложности с 30 событиями. У трех субъектов регистрировали шесть связанных с лечением AE с оценкой тяжести: степень 1 (легкая) "зуд" и "фурункул" у субъекта B-001-001 (получавшего дозу 1 мг/кг UB-421); степень 1 (легкая) "повышенное количество лимфоцитов", "пониженное количество нейтрофилов" и "пониженное количество 35 тромбоцитов" у субъекта A-015-009 (получавшего дозу 10 мг/кг UB-421); и степень 2 (умеренная) "сыпь кореподобная" у субъекта B-015-008 (получавшего дозу 25 мг/кг UB-421). Случай кореподобной сыпи у субъекта B-015-008 представлял собой предполагаемую непредвиденную тяжелую нежелательную реакцию (SUSAR); субъект был выписан из больницы через 5 дней наблюдения. У одного субъекта регистрировали 40 другое SAE, не связанное с UB-421, анальный свищ и геморрой у субъекта A-012-005 (получавшего дозу 5 мг/кг UB-421); никаких связанных с лечением патологий не обнаружили по результатам ЭКГ или основным показателям жизнедеятельности. В лечении была только одна доза; следовательно, никакого прерывания лечения или изменения дозы не происходило.

45 Антитела против UB-421 были обнаружены у трех субъектов (по одному в каждой Когорте 2, 3 и 4) в день 14 (V7) на уровнях лишь немного выше предела обнаружения анализа 0,4 мкг/мл. Антитела против UB-421 при следующих посещениях не были обнаружены до дня 60 (конец исследования). Никакие соответствующие AE или другие

физические патологии не были связаны с появлением антител против UB-421.

Кроме того, количество CD4+ Т-клеток и процент клеток были относительно стабильными в течение 60-дневного периода лечения, а также последующего периода без лечения.

- 5 Подводя итог, необходимо отметить, что UB-421 было безопасным и хорошо переносилось ВИЧ-1 инфицированными взрослыми при введении однократной дозы в диапазоне доз от 1 до 25 мг/кг путем внутривенной (в/в) инфузии.

12. Выводы

- В данном исследовании фазы I, с однократным внутривенным вливанием UB-421 в 10 дозах от 1 до 25 мг/кг, было продемонстрировано, что UB-421 было безопасным и хорошо переносилось ВИЧ-1 инфицированными взрослыми. Большинство случаев АЕ были умеренными и не были связаны с исследуемым лекарственным средством. Только один случай SUSAR, выражавшийся в кореподобной кожной сыпи, зарегистрировали в Когорте 4 (доза 25 мг/кг), однако было неясно, был ли этот случай связан с 15 исследуемым лекарственным средством. Преходящие иммунные ответы на UB-421 были обнаружены только в день 14 (V7) у трех субъектов с уровнями антител незначительно выше предела обнаружения анализа 0,4 мкг/мл, что позволяет предположить, что появление антитела имело малую клиническую значимость.
- Относительно фармакокинетического профиля исследуемого лекарственного средства 20 отклонение основных параметров коррелировало с величиной дозы. Кроме того, степень и продолжительность супрессии вирусной нагрузки ВИЧ-1 была значимо и положительно связана с величиной дозы UB-421 при 5, 10 и 25 мг/кг, но не была настолько очевидна в когорте с дозой 1 мг/кг.

С учетом обоих результатов оценки безопасности и эффективности, полученных в 25 данном исследовании, UB-421 при величине дозы по меньшей мере 5 мг/кг гарантировало дальнейшую разработку в лечении бессимптомных ВИЧ-1 инфицированных взрослых.

ПРИМЕР 14

ОТКРЫТОЕ, С МНОГОКРАТНЫМ ВВЕДЕНИЕМ, ДОЗОЗАВИСИМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗЫ IА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И 30 ЭФФЕКТИВНОСТИ UB-421 У БЕССИМПТОМНЫХ ВИЧ-1 ИНФИЦИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ

1. Цели исследования:

1. Оценка безопасности и переносимости многократных введений двух схем введения доз UB-421 у бессимптомных ВИЧ-1 инфицированных субъектов.
- 35 2. Получение подтверждения противовирусной активности при многократном введении с двумя схемами введения доз UB-421 у этих субъектов.
3. Оценка противовирусной активности и профилей безопасности для определения оптимального введения UB-421 и схемы введения доз.

(Идентификационный код клинического исследования: NCT01668043).

40 2. Схема исследования

Исследование было открытым, с многократным внутривенным введением UB-421. Субъекты, которые были серопозитивными на ВИЧ-1 и бессимптомными, были проверены на соответствие критериям включения. Двадцать девять (29) зарегистрированных субъектов получали многократные внутривенные вливания исследуемого лекарственного средства (UB-421) с одной из двух величин дозы, 10 мг/кг раз в неделю (Когорта 1) или 25 мг/кг раз в две недели (Когорта 2), в течение восьминедельного периода лечения. Субъектов распределяли в одну из двух когорт исследования в зависимости от исследовательского центра и от очередности при

включении в исследование. Субъектов наблюдали в течение дополнительного восьминедельного периода после восьминедельного периода лечения. Исследование закончилось в неделю 16.

3. Критерии включения

Субъекты должны были соответствовать следующим критериям для участия в исследовании фазы Па:

1. Бессимптомный, не подвергавшийся антиретровирусной терапии (АРТ), ВИЧ-1 серопозитивный
2. Количество CD4+ Т-клеток >350 клеток/ мм^3 ³
3. Вирусная нагрузка ВИЧ-1 >5000 копий/мл
4. Отсутствие активной инфекции, требующей срочной терапии (кроме ВИЧ-1)
5. Не применяет иммуномодулирующие препараты или системную химиотерапию
6. Не нуждается в высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ).

После завершения данного исследования субъекты наблюдались согласно стандартной схеме мониторинга (без антиретровирусных средств) в клиниках для амбулаторных больных или получали стандартную антиретровирусную терапию (например, ВААРТ) в зависимости от решения ведущего исследователя согласно текущим Руководствам по диагностике и лечению ВИЧ/СПИДА. Лицам, которые были зарегистрированы для участия в исследовании фазы I с UB-421 и соответствовали критериям включения исследования фазы Па, позволяли участвовать в данном исследовании.

4. Исследуемый продукт(ы)

UB-421 (dB4C7 мАт) поставлялось в концентрации 10 мг/мл (100 мг во флаконе объемом 10 мл).

Каждый зарегистрированный субъект получал многократные внутривенные вливания UB-421 с одной из следующих величин дозы: 10 мг/кг раз в неделю (Когорта 1) или 25 мг/кг раз в две недели (Когорта 2) в течение восьми недель. Соответствующий объем UB-421 был основан на указанной дозе и массе тела субъекта. Объем каждой отдельной дозы регулировали при использовании стерильного раствора хлорида натрия, чтобы каждый отдельный субъект в когорте получал инфузию в эквивалентном инфузционном объеме лекарственного средства. Суммарный инфузионный объем составлял приблизительно 100 мл для когорты с дозой 10 мг/кг и 200 мл для когорты с дозой 25 мг/кг. Время вливания при каждом введении составляло приблизительно один-два часа.

5. Критерии оценки:

5.1 Основные конечные показатели оценки безопасности и эффективности:

Следующие параметры безопасности и переносимости UB-421 оценивались в течение недели 16 (конец исследования):

1. Медицинский осмотр (РЕ)
2. Основные показатели жизнедеятельности
3. Анализы клинической биохимии и общие анализы крови
4. Число случаев нежелательных явлений (AE)/тяжелых нежелательных явлений (SAE)

Следующие параметры эффективности UB-421 оценивались в каждой когорте исследования в течение периода исследования (от V2 до V12):

1. Индивидуальное максимальное снижение вирусной нагрузки
2. Среднее максимальное снижение вирусной нагрузки

5.2 Дополнительные вирусологические конечные показатели

Следующие вирусологические реакции оценивались в течение периода исследования

(от V2 до V12):

1. Индивидуальное максимальное снижение вирусной нагрузки и среднее максимальное снижение вирусной нагрузки по подгруппам в и между каждой когортой исследования.

5 2. Процент субъектов с вирусной нагрузкой <50 копий/мл;

3. Процент субъектов с вирусной нагрузкой <200 копий/мл;

4. Процент субъектов со снижением вирусной нагрузки $>0,5 \log_{10}$ копий/мл;

5. Процент субъектов со снижением вирусной нагрузки $>1 \log_{10}$ копий/мл;

10 6. Процент субъектов с вирусной отдачей (увеличение вирусной нагрузки более чем в $0,5 \log_{10}$ с самого низкого уровня), не более чем через 7 дней и через 14 дней после введения лекарственного средства в последнем завершенном исследовании для когорты 1 и для когорты 2, соответственно;

7. Концентрации антител против UB-421 в сыворотке (имmunогенность UB-421);

8. Изменения количества CD4+ и CD8+ Т-клеток;

15 9. Фармакокинетические параметры UB-421 (C_{max} , $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ и $AUC_{(0 \rightarrow last)}$).

6. Исследуемая совокупность:

Совокупность участников с назначенным лечением (ITT): 29 субъектов, которые получали по меньшей мере одно введение исследуемого лекарственного средства.

20 Совокупность ITT для Когорты 1 и Когорты 2 составила 14 субъектов и 15 субъектов, соответственно.

Совокупность участников без нарушений протокола (PP): 18 субъектов, которые получали все введения исследуемого лекарственного средства, с подтвержденными исходными показателями и по меньшей мере одним подтвержденным измерением 25 эффективности после лечения (анализом вирусной нагрузки ВИЧ-1), и отсутствием серьезных нарушений протокола. Совокупность PP для Когорты 1 и Когорты 2 составила 7 субъектов и 11 субъектов, соответственно.

Совокупность оценки безопасности и иммуногенности: 29 субъектов, включенных в совокупность с назначенным лечением.

30 Совокупность оценки фармакокинетики: была основана на подгруппе в совокупности оценки иммуногенности и безопасности.

Исходные данные и результаты оценки безопасности были проанализированы на совокупностях оценки безопасности и иммуногенности, тогда как анализ эффективности проводили и на ITT, и на PP совокупностях. Фармакокинетический анализ проводили 35 на совокупности оценки фармакокинетики.

7. Продолжительность периода исследования

Период скрининга: <4 недели

Период лечения: 8 недель

Период последующего наблюдения: 8 недель после завершения Периода лечения

40 Посещение 0 представляло первичный скрининг, причем каждое посещение во время исследования представляло 1-недельный период. Период последующего наблюдения обычно проводили с еженедельными интервалами.

8. Обзор результатов:

8.1 Исследуемая совокупность.

45 В общей сложности 33 бессимптомных ВИЧ-инфицированных взрослых обследовали в двух исследовательских центрах на Тайване. Из них 29 субъектов соответствовали критериям скрининга и были отобраны для исследования. Все 29 субъектов, соответствующих критериям включения, были мужского пола.

8.2 Результаты оценки безопасности и переносимости:

Все 29 субъектов испытали по меньшей мере 1 АЕ за время исследования, в общей сложности со 128 случаями АЕ. Из них 114 (89,06% у всех 29 субъектов) являлись нежелательными явлениями при начале лечения (TEAE), и 14 (10,94% у 5 субъектов)

явились АЕ, возникшими до начала лечения. Никаких тяжелых нежелательных явлений (SAE) у 29 субъектов не наблюдали. Ни один случай АЕ до начала лечения не был связан с UB-421, и ни одно из этих явлений не считали SAE. Большинство зарегистрированных случаев (78,95%) TEAE были легкими, 17,54% были умеренными и 3,51% (у 1 субъекта) было тяжелыми.

Наиболее часто наблюдаемым (>10%) TEAE являлась кожная сыпь и крапивница. Кроме нежелательных явлений, нарушения по результатам общего анализа крови (154 события у 22 субъектов) и биохимии (32 события у 6 субъектов) наблюдали у 22 субъектов. Однако большинство изменений было незначительным и не имело клинической значимости. Результаты медицинского осмотра и основные показатели жизнедеятельности были в целом нормальными или клинически незначимыми в течение периода исследования.

UB-421 хорошо переносилось в течение периода исследования с общей переносимостью лечения в течение 8-недельного периода лечения, составившей 73,84%, как указано в протоколе клинического исследования.

8.3 Фармакодинамика

8.3.1 Количество CD4+ Т и CD8+ Т-клеток. После 8-недельного Периода лечения и 8-недельного Периода последующего наблюдения, среднее количество CD4+ Т-клеток немного уменьшилось относительно исходного значения на $55,10 \pm 117,97$ клеток/ мм^3 , при этом среднее количество CD8+ Т-клеток увеличилось относительно исходного значения на $193,31 \pm 459,34$ клеток/ мм^3 . Репрезентативные количества CD4+ Т-клеток для субъектов в Когорте 1 и среднее количество CD4 Т-клеток показаны в **Таблице 22а** и на **Фигуре 24а**. Репрезентативные количества CD4+ Т-клеток для субъектов в Когорте 2 и среднее количество CD4 Т-клеток показаны в **Таблице 22б** и на **Фигуре 24б**.

8.3.2 Покрытие CD4 рецепторов UB-421. Степень покрытия CD4 рецепторов определяли с помощью проточной цитометрии при использовании флуоресцентно коньюгированного UB-421. Результаты, полученные у четырех репрезентативных субъектов, двух из Когорты 1 и двух из Когорты 2, показаны на **Фигурах 25а-25б** и **Фигурах 25с-25д**, соответственно. Чувствительность анализа составляла 0,15 мкг/мл. Клиническая эффективность UB-421 при многократном введении доз с величиной 10 мг/кг раз в неделю или 25 мг/кг раз в две недели показала снижение вирусной нагрузки до неподдающегося обнаружению уровня в присутствии >10 мкг/мл. Уровень UB-421 в сыворотке при использовании в качестве монотерапии. Не было никакой вирусной отдачи, пока МКПК CD4+ клетки были полностью покрыты (т.е. % связывания dB4C7-Alexa приближается к 0).

Полное покрытие CD4 рецепторов на МКПК антителом UB-421 достигалось после двух-трех введений UB-421 при обеих величинах вводимой дозы. Кроме того, полное покрытие CD4+ Т-клеток антителом UB-421 сохранялось в течение всего периода лечения (**Фигуры 25а-25д**, верхняя панель). У большинства субъектов связывание UB-421 с CD4 рецепторами уменьшалось и возвращалось на исходные значения в течение трех недель после последнего вливания UB-421, как определяли при связывании флуоресцентного мАт dB4C7 (dB4C7-Alexa).

Концентрацию UB-421, присутствующего в сыворотке субъектов в течение исследования, оценивали с целью определения концентрации UB-421 в сыворотке,

достаточной для достижения полного покрытия CD4 и вирусной супрессии ВИЧ-1. На основе полученных данных, постоянное полное покрытие CD4+ Т-клеток и вирусная супрессия ВИЧ-1 под воздействием UB-421 достигалась, пока концентрация UB-421 в сыворотке превышала 10 мкг/мл (Фигура 25а-25д, нижняя панель).

8.4 Фармакокинетика:

Средняя AUC, наблюдаемая в Когорте 1, увеличилась с 17300 ± 10000 мкг \times ч/мл (Посещение 1-2) до 23900 ± 10700 мкг \times ч/мл (Посещение 8-9), затем возвратилась на исходные значения в Посещение 11-12. Средняя AUC_(0→last), наблюдавшаяся в Когорте 1, составляла 171000 ± 70300 мкг \times ч/мл.

Средняя AUC, наблюдавшаяся в Когорте 2, увеличилась с 56500 ± 19500 мкг \times ч/мл (Посещение 1-3) до 61100 ± 20700 мкг \times ч/мл (Посещение 7-9), затем возвратилась на исходные значения в Посещение 11-12. Средняя AUC_(0→last), наблюдавшаяся в Когорте 2, составляла 239000 ± 73900 мкг \times ч/мл.

Эти данные демонстрируют, что средняя концентрация лекарственного средства в сыворотке, при оценке по AUC_(0→last), была выше у субъектов, которым вводили 25 мг/кг UB-421 раз в две недели (Когорта 2, 239000 ± 73900 мкг \times ч/мл), по сравнению с субъектами, получавшими вливание 10 мг/кг UB-421 раз в неделю (Когорта 1, 171000 ± 70300 мкг \times ч/мл).

8.5 Результаты оценки эффективности:

Двадцать девять (29) ВИЧ-1 инфицированных субъектов были включены в данное исследование и получили по меньшей мере одну дозу UB-421 (совокупность ITT). Из двадцати девяти (29) включенных субъектов в общей сложности восемнадцать (18) субъектов завершили 8-недельный Период лечения, получив все введения исследуемого лекарственного средства (совокупность PP). Эффективность многократного введения UB-421 исследовали с помощью оценки индивидуального и среднего максимального снижения вирусной нагрузки у зарегистрированных в исследовании бессимптомных ВИЧ-1 инфицированных субъектов в течение исследования, результаты ITT и PP совокупностей для Когорт 1 и 2 приведены в **Таблице 20**.

Было установлено, что среднее максимальное снижение вирусной нагрузки значимо не отличалось между двумя величинами дозы ни в ITT, ни в PP совокупностях. В частности, вирусные нагрузки уменьшились в совокупности ITT на $2,27 \pm 0,60 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 1 и на $2,45 \pm 0,46 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 2. В совокупности PP вирусные нагрузки уменьшились на $2,73 \pm 0,34 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 1 и на $2,47 \pm 0,45 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 2.

В течение периода лечения снижение вирусной нагрузки $\geq 0,5 \log_{10}$ копий/мл наблюдали у всех ($n=29$, 100,00%) субъектов исследования; при этом снижение вирусной нагрузки $\geq 1 \log_{10}$ копий/мл также наблюдали у всех ($n=29$, 100,00%) субъектов исследования.

Дальнейшая оценка данных, полученных в течение Периода лечения, показала следующее:

В Когорте 1 у 8/14 (57,14%) субъектов в ITT и у 5/7 субъектов (на 71,43%) в PP вирусная нагрузка составила ≤ 200 копий/мл; кроме того, у 3/14 (21,43%) субъектов в ITT и 3/7 (42,86%) субъектов в PP вирусная нагрузка составила <50 копий/мл.

В Когорте 2 у 10/15 субъектов (на 66,67%) в ITT и у 7/11 субъектов (на 63,64%) в PP вирусная нагрузка составила ≤ 200 копий/мл; и у 3/15 субъектов (на 20,00%) в ITT и 2/11 (18,18%) субъектов в PP вирусная нагрузка составила <50 копий/мл.

Репрезентативные данные по снижению вирусной нагрузки у субъектов в Когортах

1 и 2 показаны в Таблицах 21а-21с и на Фигурах 25а-25д (верхние панели). Не было обнаружено никаких статистически значимых различий в доле субъектов со снижением вирусной нагрузки в каждой когорте, при сравнении между когортами или между субсовокупностями в каждой когорте. Кроме того, вирусная нагрузка была уменьшена до уровней ниже текущего предела обнаружения анализа (20 копий/мл) у 43% и 18% субъектов в Когорте 1 и 2, соответственно, в течение восьминедельного Периода лечения. У всех субъектов сохранилось снижение вирусной нагрузки, тогда как CD4+ Т-клетки были полностью покрыты UB-421. Вирусная нагрузка возвращались на исходные значения в обеих когортах к концу Периода последующего наблюдения.

Кроме того, никакой вирусной отдачи не наблюдали ни у одного из субъектов исследования в течение Периода лечения. Никаких поддающихся количественному определению антител против UB421 не было обнаружено в течение всего периода лечения у больного в обеих когортах (Таблица 21а-21с).

8.6 Сравнение UB-421 с TMB-355:

Результаты, полученные в этом исследовании для UB-421, сравнивали с результатами, полученными в аналогичных исследованиях для TMB-355 (ибализумаб, ранее TNX-355) выполненных другими исследователями (Jacobson, J.L., et al., 2009; Toma, J., et al., 2011; и Pace, C.S., et al., 2013). На Фигуре 26а показано превосходное снижение вирусной нагрузки до $>3 \log_{10}$ без отдачи вирусной нагрузки в присутствии UB-421 при полном покрытии CD4+ клеток. Напротив, больные, проходящие лечение TMB-355, столкнулись с вирусной отдачей уже через одну неделю после лечения, даже в присутствии полного покрытия CD4+ клеток, что указывает на развитие устойчивых вирусных мутантов (Фигура 26б).

Сравнение этих двух схем лечения, показанных на фигурах, демонстрирует, что лечение ВИЧ-инфицированных субъектов UB-421 имеет явные преимущества по сравнению с лечением TMB-355. В частности, UB-421 обеспечивает непрерывное уменьшение вирусной нагрузки ВИЧ в течение всего Периода лечения и даже через одну или две недели в Периоде последующего наблюдения, с максимальным снижением вирусной нагрузки $>3 \log_{10}$. Напротив, TMB-355 обеспечивает лишь временное снижение вирусной нагрузки при первом введении и максимальное снижение вирусной нагрузки приблизительно $1 \log_{10}$.

Кроме того, предыдущие исследования с использованием TMB-355 показали, что, несмотря на присутствие TMB-355 в сыворотке и полное покрытие CD4-положительных Т-клеток, вирусная отдача ВИЧ происходила после одной недели лечения (Jacobson, J.L., et al., 2009). Этот результат согласуется с более ранним прогнозом в Примере 4, выше, что механизм неконкурентного ингибиования входа, опосредуемый TMB-355 (ибализумабом), может давать высокую вероятность развития устойчивых мутантов ВИЧ в течение периода лечения антителом. Фактически, вирусные устойчивые мутанты были обнаружены с мутациями, идентифицированными в области V5 gp120 (Toma, J., et al., 2011; Pace, C.S., et al., 2013) у больных, проходящих лечение TMB-355 для снижения вирусной нагрузки.

9. Выводы

Восьминедельное лечение UB-421 у бессимптомных ВИЧ-1 инфицированных субъектов, как обнаружили, хорошо переносилось. Кроме того, репрезентативные количества CD4+ Т-клеток у отдельных субъектов (Таблицы 22а и 22б) и средние количества CD4 Т-клеток (Фигуры 24а и 24б) в обеих когортах 1 и 2, соответственно, оставались стабильными в течение двухмесячного периода наблюдения.

Что еще более важно, лечение UB-421 привело к значимому снижению вирусной нагрузки у всех субъектов (100% прошедших лечение субъектов реагировали с максимальным снижением $\geq 1 \log_{10}$ копий/мл. Обе схемы инфузии, 10 мг/кг раз в неделю (Когорта 1) и 25 мг/кг раз в две недели (Когорта 2), показали аналогичную эффективность при снижении вирусной нагрузки. Среднее максимальное снижение вирусной нагрузки в совокупности ITT достигало $2,27 \pm 0,60 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 1 и $2,45 \pm 0,46 \log_{10}$ копий/мл в Когорте 2). Наблюдаемая эффективность снижения вирусной нагрузки под воздействием UB-421 превосходит какие-либо другие низкомолекулярные средства против ВИЧ, протестированные на настоящий момент.

Результаты клинического исследования в этом тщательно проведенном исследовании UB-421 фазы II с многократными дозами продемонстрировали высокую переносимость, безопасность и беспрецедентную эффективность в снижении вирусной нагрузки в качестве монотерапии, без вирусной отдачи в течение Периода лечения. Результаты, полученные в этом исследовании, являются неожиданными и противоречат устоявшемуся мнению в той области, что моноклональные антитела против CD4, которые связываются с доменом 1 CD4, могут быть иммунодепрессивными в результате нарушения иммунных функций, опосредуемых главным комплексом гистосовместимости класса II, и что такие способы терапии будут непригодными для лечения ВИЧ заболевания (Jacobson, J.L., et al., 2009). Эти результаты также дают основание предполагать, что дополнительные методы терапии ВИЧ с применением UB-421 в сочетании с самостоятельной ВААРТ и/или с другими активирующими резервуары ВИЧ средствами, такими как HDACi, могли бы обеспечивать функциональное излечение ВИЧ-инфекции.

ПРИМЕР 15

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОНОТЕРАПИИ UB-421 ВМЕСТО АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ У ВИЧ-1 ИНФИЦИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ

На Фигуре 27 показан способ лечения различных групп больных ВИЧ с применением монотерапии UB-421 вместо антиретровирусного средства. Подробные цели и протокол описаны ниже.

1. Задействованные совокупности больных

Субъекты, серопозитивные на ВИЧ-1, с вирусной супрессией на фоне применения стабильной высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), могли быть допущены к такому лечению.

Подходящие больные получают UB-421, вводимое в/в или п/к путем, в течение начального периода продолжительностью 4 месяца, с последующим другим курсом лечения ВААРТ. Курс лечения "ВААРТ-UB-421" с чередованием может повторяться несколько раз до отсутствия вирусной отдачи при отмене UB-421 и терапии ВААРТ, что приводит, таким образом, к функциональному излечению ВИЧ-инфекции.

Более конкретно, указанные субъекты получают многократные внутривенные вливания исследуемого лекарственного средства (UB-421) при одной из двух величин дозы, 10 мг/кг раз в неделю или 25 мг/кг раз в две недели, в течение восьминедельного и шестнадцатинедельного периодов лечения, соответственно. Схемы применения ВААРТ отменяют за день до первой инфузии UB-421. Перед введением UB-421 субъекты проходят профилактическую лекарственную терапию (премедикацию), включающую стероидные и антигистаминные препараты, согласно решению ведущего исследователя, для предотвращения инфузионных реакций. После выполнения последнего запланированного введения UB-421 все субъекты снова проходят свою первоначальную

или другую подходящую вирус-чувствительную антиретровирусную терапию в тот же день. Применение схем ВААРТ будут назначать ведущие исследователи. Вирусная нагрузка и количества клеток CD4 у всех больных будут наблюдать в течение периода лечения и через 6 месяцев после завершения периода лечения.

5 **2. Критерии включения**

Субъекты могут быть включены в эту методику лечения, если они соответствуют всем следующим критериям:

1. ВИЧ-1 серопозитивные;

2. В возрасте 20 лет или старше;

10 3. Проходили лечение ВААРТ, определенное как по меньшей мере 2 нуклеозидных/нуклеотидных ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ) плюс ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ), ингибитор интегразы или ингибитор протеазы, в течение по меньшей мере 2 лет; лечение продолжается и без изменений лекарственных препаратов в течение одного года до включения в исследование;

15 4. С двумя измерениями количества CD4+ Т-клеток ≥ 500 клеток/ мм^3 или процента CD4 $\geq 28\%$ в течение 1 года до скринингового визита;

5. С количеством CD4+ Т-клеток ≥ 500 клеток/ мм^3 , полученным в течение 4 недель до скринингового визита или при скрининговом визите;

20 6. РНК ВИЧ-1 в плазме остается необнаруживаемой в течение по меньшей мере 1 года до скринингового визита, по меньшей мере с 2 значениями вирусной нагрузки в течение года. Вирусная нагрузка также не обнаруживается в течение 4 недель до скринингового визита или при скрининговом визите; единственный эпизод обнаружения РНК ВИЧ в плазме за 4 недели перед скрининговым визитом не исключает участия.

25 **3. Критерии исключения**

Субъекты будут исключены из методики лечения по любой из следующих причин:

1. Любая активная инфекция (за исключением ВИЧ), требующая срочной терапии;
2. Любое ранее диагностированное или активное СПИД-определяющее заболевание в Категории В и Категории С состояний согласно Системе классификации ВИЧ-инфекции Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC);
30 3. Масса тела > 80 кг;

4. Любое зарегистрированное количество CD4+ Т-клеток < 250 клеток/ мм^3 или процент CD4+ Т-клеток $\leq 14\%$ в течение 12 недель перед скринингом;

35 5. Предыдущая регистрация в исследовании UB-421 фазы I или фазы II или какое-либо присутствие антитела против UB-421 в анамнезе;

6. Любое предыдущее применение моноклонального антитела в течение 12 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства UB-421;

40 7. Любые значимые заболевания (кроме ВИЧ-1 инфекции) или клинически значимые результаты, включая психиатрические и поведенческие нарушения, обнаруженные при скрининге, в истории болезни и/или при медицинском осмотре, которые по мнению исследователя не позволяют субъекту участвовать в данном исследовании;

8. Любая вакцинация в течение 8 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

9. Любая иммуномодулирующая терапия (включая интерферон), системная

45 химиотерапия в течение 12 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

10. Ожидаемая продолжительность жизни меньше 12 месяцев;

11. Применение любых запрещенных наркотических веществ внутривенно в течение

12 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

12. Больше одного изменения схемы ВААРТ в результате вирусологической неэффективности и предшествующая неходжкинская лимфома или саркома Капоши;

13. Любое текущее употребление алкоголя или запрещенных наркотических веществ,

5 которые, по мнению исследователя, нарушают способность субъекта соблюдать схемы введения доз и график посещений, и проходить обследования согласно протоколу.

4. Фармацевтический продукт

Фармацевтический продукт UB-421 (мАт dB4C7) поставляется в концентрации 10 мг/мл (100 мг во флаконе объемом 10 мл). Субъекты получают либо восемь доз UB-

10 421 10 мг/кг раз в неделю, либо восемь доз UB-421 25 мг/кг раз в две недели путем внутривенной инфузии.

Соответствующий объем UB-421 будет основан на указанной дозе и массе тела субъекта. Объем каждой отдельной дозы регулировали при использовании стерильного раствора хлорида натрия, чтобы каждый отдельный субъект в когорте получал инфузию 15 в эквивалентном инфузионном объеме лекарственного средства. Суммарный инфузионный объем составлял приблизительно 100 мл для когорты с дозой 10 мг/кг и 200 мл для когорты с дозой 25 мг/кг. Время вливания при каждом введении составляло приблизительно один-два часа.

ПРИМЕР 16

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ UB-421 В КОМБИНАЦИИ С ВААРТ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИЗЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

На **Фигуре 28** показан способ лечения различных групп больных ВИЧ с применением антитела UB-421 в комбинации с ВААРТ для функционального излечения ВИЧ-инфекции. Задействовали следующие совокупности больных: (1) не проходившие лечение 25 больные ВИЧ; (2) стабилизированные терапией ВААРТ больные ВИЧ; и (3) больные ВИЧ, у которых лечение ВААРТ было неэффективным.

Более конкретно, клинический протокол для функционального излечения ВИЧ у инфицированных субъектов может быть выполнен при введении UB-421 в/в или п/к путем в течение начального периода продолжительностью 4 месяца, с последующим 30 перерывом в лечении на 2 месяца, в качестве одного курса лечения (6 месяцев), в течение двух полных курсов (один год). Те же субъекты также начинают и продолжают лечение ВААРТ во время двух полных курсов лечения UB-421. В конце двух полных курсов и ВААРТ, и UB-421 будут отменены (**Группа А**), чтобы определить количество времени, требуемое для вирусной отдачи, если таковая последует. Контрольную группу, 35 включающую субъектов, которые проходят только ВААРТ за тот же 12-месячный период до отмены лечения ВААРТ, также оценивают для определения времени, требуемого для вирусной отдачи, если таковая последует (**Группа В**).

Вирусная нагрузка и количества клеток CD4 у всех больных мониторируют во время двух курсов параллельного лечения UB-421 и ВААРТ и через 6 месяцев после периода 40 лечения в течение в общей сложности 18 месяцев.

Группа А: лечение ВААРТ в комбинации с введением UB-421 в дозе 10 мг/кг раз в неделю или 25 мг/кг раз в две недели. Группа В: только лечение ВААРТ.

2. Схема лечения UB-421 при функциональном излечении (Таблица 23)

Потенциальное преимущество UB-421 по сравнению с препаратами ВААРТ:

45 1. UB-421 блокирует межклеточную передачу вирусов ВИЧ-1

2. UB-421 перекрестно связывает CDR2-подобную петлю CD4 и активирует клетки и, таким образом, индуцирует и высвобождает ВИЧ-1 из латентного состояния

3. Цели:

1. Обеспечить эффективное лечение и защиту ВИЧ-инфицированных субъектов путем применения UB-421 в комбинации с ВААРТ, блокируя бесклеточную и межклеточную передачу ВИЧ.

2. Обеспечить функциональное излечение ВИЧ у ВИЧ-инфицированных субъектов.

5. Задействованная совокупность больных:

(1) Стабилизированные лечением ВААРТ больные ВИЧ; (2) не проходившие лечение ВААРТ больные ВИЧ, и (3) больные ВИЧ, у которых лечение ВААРТ было неэффективным.

5. Фармацевтический продукт UB-421

10 Фармацевтический продукт UB-421 (мАт dB4C7) поставляется в концентрации 10 мг/мл (100 мг во флаконе объемом 10 мл). Субъекты получают либо восемь доз UB-421 10 мг/кг раз в неделю, либо восемь доз UB-421 25 мг/кг раз в две недели путем внутривенной инфузии.

15 Соответствующий объем UB-421 будет основан на указанной дозе и массе тела субъекта. Объем каждой отдельной дозы регулировали при использовании стерильного раствора хлорида натрия, чтобы каждый отдельный субъект в когорте получал инфузию в эквивалентном инфузционном объеме лекарственного средства. Суммарный инфузионный объем составлял приблизительно 100 мл для когорт с дозой 10 мг/кг и 200 мл для когорт с дозой 25 мг/кг. Время вливания при каждом введении составляло **20** приблизительно один-два часа.

6. Назначенные вмешательства:

Назначают следующие вмешательства:

6.1 Группа А - комбинация лечения UB-421 и ВААРТ

25 Субъекты проходят непрерывное лечение соответствующей терапией ВААРТ, а также проходят лечение UB-421 в течение двух полных курсов, дляящихся один год. Каждый курс лечения UB-421 будет включать введение 10 мг/кг UB-421 каждую неделю или введение 25 мг/кг UB-421 раз в две недели в течение 4 месяцев, с последующими двумя месяцами без лечения UB-421.

30 После завершения периода лечения продолжительностью 1 год будут отменены терапии ВААРТ и UB-421. Дополнительное неэкспериментальное исследование будет проведено для гарантии функционального излечения ВИЧ-инфекции при отсутствии вирусной отдачи без ВААРТ и UB-421.

6.1 Группа В - только лечение ВААРТ

35 В качестве контрольной группы отдельная группа субъектов будет проходить непрерывное лечение с применением подходящей терапии ВААРТ, без лечения UB-421, в течение одного периода.

После завершения периода лечения продолжительностью 1 год будет отменена терапия ВААРТ, и субъектов будут наблюдать на наличие вирусной отдачи.

Таблица 1. Неудовлетворенные медицинские потребности в лечении ВИЧ:

40 функциональное излечение и устранение

Стерилизующее лечение (устранение)	Функциональное излечение
Уничтожение всех ВИЧ-инфицированных клеток	Длительная супрессия вируса в отсутствие ВААРТ
РНК ВИЧ <1 копии/мл	РНК ВИЧ <50 копий/мл (или ниже предела обнаружения в анализе)
Излечение	Ремиссия

Таблица 2. Список разрабатываемых в настоящее время ингибиторов HDAC для реактивации ВИЧ-инфицированных покоящихся Т-клеток

Название ЛС		Информация	
5 Вориностат (SAHA)		Вориностат (субериоланилид гидроксамовой кислоты, SAHA, Золинза) является HDAC-ингибитором с IC ₅₀ ~10 нМ.	
Этиностат (MS-275, SNDX-275)		MS-275 является HDAC-ингибитором HDAC1 и HDAC3 с IC ₅₀ 0,51 мкМ и 1,7 мкМ, соответственно.	
10 Панобиностат (LBH589)		LBH589 (панобиностат) является новым HDAC-ингибитором широкого спектра для MOLT-4 и Reh клеток с IC ₅₀ 5 и 20 нМ, соответственно.	
Трихостатин А (TSA)		Трихостатин А (TSA) является HDAC-ингибитором с IC ₅₀ ~1,8 нМ.	
Белиностат (PDX101)		Белиностат (PXD101) является новым HDAC-ингибитором с IC ₅₀ 27 нМ в экстрактах клеток HeLa.	
15 Моцетиностат (MGCD0103)		MGCD0103 (Моцетиностат) является мощным ингибитором гистондеацетилаз (HDAC) I класса для HDAC 1, HDAC 2 и HDAC 3 с IC ₅₀ 0,15 мкМ, 0,29 мкМ и 1,66 мкМ, соответственно.	
MC1568		MC1568 является селективным HDAC-ингибитором II класса (IIa) с IC ₅₀ 220 нМ.	
Ромидепсин (FK228, депептид)		Ромидепсин (FK228, депептид) является мощным ингибитором гистондеацетилаз 1 и 2 (HDAC1 и HDAC2) с IC ₅₀ 36 нМ и 47 нМ, соответственно.	
15 M344		M344 is a potent HDAC-ингибитором с IC ₅₀ 100 нМ	
PCI-34051		PCI-34051 является мощным и специфическим ингибитором гистондеацетилазы 8 (HDAC8) с IC ₅₀ 10 нМ.	
Тубастатин А HCl		Тубастатин А является мощным ингибитором HDAC6 с IC ₅₀ 15 нМ.	
AR-42 (HDAC-42)		AR-42 является новым HDAC-ингибитором с IC ₅₀ 0,61 мкМ для линии клеток острого лимфобластного лейкоза (697).	
ITF2357 (Гивиностат)		ITF2357 (гивиностат) является активным при пероральном применении, мощным ингибитором гистондеацетилаз (HDAC) со значениями IC ₅₀ 7,5-16 нМ.	
20 SB939 (Прациностат)		SB939 является мощным низкомолекулярным ингибитором гистондеацетилазы со значениями IC ₅₀ от 40 нМ до 140 нМ для изоферментов HDAC I класса, II класса и IV класса.	
Дроксиностат		Дроксиностат (CMH, 5809354) является селективным ингибитором HDAC3, HDAC6 и HDAC8 с IC ₅₀ от 1,46 мкМ до 16,9 мкМ.	
25 CUDC-01		CUDC-101 является мощным многонаправленным ингибитором HDAC, EGFR и HER2 с IC ₅₀ 4,4, 2,4 и 15,7 нМ, соответственно.	
Вальпроевой кислоты натриевая соль (вальпроат натрия)		Вальпроевой кислоты натриевая соль (вальпроат натрия) является ингибитором гистондеацетилазы с IC ₅₀ 0,4 мМ и проявляет противоопухолевое, противовоспалительное и нейропротекторное действие.	
JNJ-26481585		JNJ-26481585 (квизиностат) является биодоступным при пероральном применении HDAC-ингибитором второго поколения на основе гидроксамовой кислоты с IC ₅₀ 0,11 нМ для HDAC1.	
30 LAQ824 (NVP-LAQ824, дациностат)		LAQ824 (NVP-LAQ824) является новым HDAC-ингибитором с IC ₅₀ 32 нМ.	
PCI-24781		HDAC-ингибитор с Ki 7 мкМ.	

Таблица 3.
Ингибирующая активность моноклонального антитела B4 в отношении входа ВИЧ (Анализ Monogram BioScience PhenoSense™)

МАт B4: вирусы не клады В			МАт B4: вирусы не клады В					
Клада	Название изолята	МАт B4 (мкг/мл)		Клада	Название изолята	МАт B4 (мкг/мл)		
		IC50	IC90			IC50	IC90	
40	A	92/RW/008	0,026	0,082	D	93/UG/086	0,015	0,052
	A	92/RW/024	0,055	0,105	D	94/UG/105	0,021	0,073
	A	93/RW/029	0,019	0,063	D	94/UG/114	0,015	0,054
	A	93/UG/077	0,012	0,109	D	94/UG/117	0,017	0,063
	A	94/UG/103	0,021	0,082	D	94/UG/118	0,020	0,066
	A	CA1	0,011	0,062	D	CD1	0,016	0,047
45	A	CA2	0,018	0,055	E	93/TH/057	0,023	0,079
	A	CA3	0,019	0,052	E	93/TH/305	0,02 1	0,069
	BF	93/BR/019	0,013	0,046	E	CMU06	0,026	0,088
	C	10362	0,020	0,065	E?	QZ4589	0,036	0,170
	C	21068	0,011	0,053	EA	92/TH/005	0,012	0,054
	C	10215-6	0,018	0,063	EA	92/TH/006	0,022	0,073
	C	11657-3	0,025	0,067	EA	92/TH/007	0,013	0,061

	C	20635-4	0,020	0,090	EA	92/TH/009	0,021	0,052
	C	93/IN/101	0,016	0,047	EA	92/TH/019	0,022	0,063
5	C	CC1	0,016	0,052	EA	92/TH/020	0,015	0,051
	C	CC10	0,015	0,053	EA	92/TH/021	0,017	0,052
	C	CC2	0,021	0,065	EA	92/TH/022	0,012	0,035
	C	CC3	0,012	0,049	EA	92/TH/024	0,010	0,048
	C	CC4	0,013	0,044	EA	CMU02	0,011	0,041
10	C	CC5	0,019	0,062	F	93/BR/020	0,024	0,069
	C	CC6	0,018	0,061	F	CF2	0,016	0,053
	C	CC7	0,013	0,050	F	CF3	0,024	0,081
	C	CCS	0,019	0,053	F	CF4	0,019	0,055
15	C	CC9	0,020	0,071	F	CF5	0,01,8	0,060
	C	MW/93/959	0,019	0,050	F	CF6	0,018	0,064
	C	MW/93/960	0,010	0,056	F	CF7	0,019	0,064
	D	92/UG/001	0,018	0,056	F	CF8	0,017	0,079
20	D	92/UG/005	0,019	0,073	G	CG1	0,018	0,071
	D	92/UG/021	0,017	0,054	G	CG2	0,027	0,081
	D	92/UG/024	0,040	0,055	G	CG3	0,016	0,045
	D	92/UG/035	0,011	0,025	G	CG4	0,013	0,037
	D	92/UG/038	0,014	0,039	J	CJ1	0,018	0,056
	D	92/UG/046	0,015	0,042	J	CJ2	0,019	0,063
	D	93/UG/053	0,020	0,049	Контроль	92HT594	0,021	0,062
25	D	93/UG/065	0,015	0,044	Контроль	JRCSF	0,034	0,077
	D	93/UG-067	0,016	0,080	Контроль	JRFL	0,074	0,152
	D	93/UG/070	0,011	0,053				
	D	93/UG/082	0,016	0,059	<i>Среднее: IC50=0,018 мкг/мл</i>		<i>IC90=0,062 мкг/мл</i>	

Таблица 4.

Соответствующие последовательности CDR1, 2, 3 из последовательностей тяжелой и легкой цепей мышиного антитела B4

Описание		SEQ ID NO	Последовательность
CDR1 тяжелой цепи мышиного антитела B4		1	DYVIH
CDR2 тяжелой цепи мышиного антитела B4		2	EIYPGSGSAYSNAKFKD
CDR3 тяжелой цепи мышиного антитела B4		3	RGNGTGFAY
CDR1 легкой цепи мышиного антитела B4		4	KAGQSVDYDGD SYMN
CDR2 легкой цепи мышиного антитела B4		5	VASNLES
CDR3 легкой цепи мышиного антитела B4		6	QQSYKDPLT

Таблица 5. Нейтрализующие активности деиммунизированного B4 (dB4C7) по сравнению с исходным B4 (МТ-2 микроанализ образования бляшек)

Изолят ВИЧ-1	Клада	Антитело B4*	Конц. антитела (мкг/мл) при 50% ингибиции	Конц. антитела (мкг/мл) при 90% ингибиции
VL 135	B	мАт dB4C7	0,06	0,19
		мышиное мАт B4	0,12	0,29
UG 029	A	мАт dB4C7	0,5	1,88
		мышиное мАт B4	0,31	0,94
UG 046	D	мАт dB4C7	0,44	11
		мышиное мАт B4	0,43	5,7
TH 036	E	мАт dB4C7	0,19	0,56
		мышиное мАт B4	0,25	0,74
USNG/98/31	C	мАт dB4C7	0,08	0,22
		мышиное мАт B4	0,19	0,36

Таблица 6. Нейтрализующие активности деиммунизированного B4 (dB4C7) по сравнению с исходным B4 (анализ МКПК)

Изолят ВИЧ-1	Клада	Антитело B4*	Конц. антитела (мкг/мл) при 50% ингибировании	Конц. антитела (мкг/мл) при 90% ингибировании
ZA/98/009	C	мАт dB4C7	0,04	0,08
		мышиное мАт B4	0,03	0,13
CM 235	E	мАт dB4C7	0,04	0,07
		мышиное мАт B4	0,02	0,1

Таблица 7. Ингибиование входа изолятов ВИЧ (R5, X4 или R5/X4) в CD4-положительные МКПК клетки в бесклеточной системе моноклональным антителом B4 или dB4, измеренное по IC₅₀ (мкг/мл) при нейтрализации вирусной репликации.

Нейтрализующие моноклональные антитела 2F5 и 2GJ2 широкого спектра действия, направленные против gp120 ВИЧ, включены для сравнения.

Антитело	IC ₅₀ (мкг/мл)					
	JBCSF (R5)	HXB2 (X4)	92TH594 (R5/X4)	Первичный изолят #5 (R5)	Первичный изолят #6 (R5)	Первичный изолят #7 (R5)
2F5	4	0,07	3	50	2	>100
2G12	0,8	0,5	1,3	20	3	2
мАт dB4C7	0,04	0,4	0,05	0,05	0,05	0,03
мАт B4	0,04	0,4	0,05	0,05	0,05	0,03

Таблица 8. Связывающая активность (EC₅₀) dB4C7 с клетками HPB-ALL

Эксп. (номер)	EC ₅₀ по MFI (нг/мл)	EC ₅₀ по %MFI (нг/мл)
1	42,1	42,4
2	43,7	45,7
3	40,7	40,7
Среднее	42,2	42,9
SD	1,5	2,5
%CV	3,6	5,9

Таблица 9. Абсолютная аффинность связывания (Kd) и связывающая способность (Bmax) dB4C7 с клетками HPB-ALL

Эксп. (номер)	Kd (нг/мл)	Kd (10 ⁻¹¹ М)	Bmax (нг/мл)	Bmax (10 ⁻¹¹ М)	Bmax (10 ⁶ Ат/клетка)
1	8,6	5,7	65,4	43,6	1,3
2	12,1	8,1	70,4	47,0	1,4
3	4,7	3,1	46,4	31,1	0,93
Среднее	8,5	5,6	60,7	40,6	1,2
SD	3,7	2,5	12,7	8,4	0,25
%CV	43,7	44,4	20,9	20,6	20,5

Таблица 10. Связывающие активности (EC₅₀) dB4C7, детектированного (1) FITC-антителом козы против huIgG и (2) dB4C7-Alexa, связывающимся с CD4+ Т-клетками крови

Субъекты (пол)	Антитело козы против hIgG		dB4C7-Alexa	
	EC50 (нг/мл)	Max. (%)	EC50 (нг/мл)	Max. (%)
M1	3,7	93,0	4,8	67,3
M2	4,2	68,9	4,6	62,6
M3	2,6	67,6	3,3	63,7
F1	4,7	91,3	4,3	65,6
F2	5,7	71,5	6,6	68,3
F3	3,7	74,6	4,3	61,0

Среднее	4,1	77,8	4,7	64,7
SD	1,1	11,4	1,1	2,8
%CV	25,5	14,6	23,4	4,3

Таблица 11. Моноклональное антитело В4 блокирует бесклеточную и межклеточную передачу ВИЧ

Штамм вируса	Титр для ингибирования слияния (межклеточный)		Титр для нейтрализации (бесклеточный)	
	50%	90%	50%	90%
UG266	1:1060	1:140	1:280	1:136
UG046	1:1479	1:245	1:628	1:234

Таблица 12. Последовательное окрашивание в анализе FACS - процент положительных МКПК

	Одномаркерный контроль		1 ^й - Leu3a связывание 2 ^й - B4 экспозиция			1 ^й - B4 связывание 2 ^й - Leu3a экспозиция		
	Leu3a+	B4+	Leu3a+ B4-	Leu3a- B4+	Leu3a+ B4+	Leu3a+ B4-	Leu3a- B4+	Leu3a+ B4+
	X282	25,5	26,1	0,1	0,8	24,5	0,0	21,9
	X301	44,0	45,5	0,3	0,6	46,7	0,0	42,7
								3,0

Таблица 13. Уровни ФНО- α и вирусной нагрузки ВИЧ-1 в культуре МКПК

Стимулятор	Конц. ФНО- α (пг/мл)			Вирусная нагрузка (копий/мл)			% изменение вирусной нагрузки (нормализованное по среде)			Число клеток ($\times 10^6$)/выживаемость (%)		
	D0	D2	D7	D0	D2	D7	D0	D2	D7	D0	D2	D7
Только среда (контроль)	ND	ND	ND	82	37731	24905	100	100	100	11,86/92,4	2,13/94,4	0,84/98,4
МАт dB4	ND	546,7	349,5	99	57162	54797	121	151	220	11,98/89,2	2,00/91,7	1,02/77,1
PMA+PHA	ND	2593,1	1030	344	20738	19465	420	55	78	11,71/93,4	1,32/85,2	5,20/92,0

ND: неподдающийся обнаружению

Таблица 14а. Исследование А: Доклиническое исследование с однократным введением на бабуинах

Группа	Доза (100 мл)	Интервал введения	Кол-во животных	
			Самец	Самка
1А (контроль)	Нет (раствор хлорида натрия)	Однократная доза	1	1
2А (низкая доза)	5 мг/кг МТ	Однократная доза	1	1
3А (высокая доза)	25 мг/кг МТ	Однократная доза	1	1

Таблица 14б. Исследование В: Доклиническое исследование с многократным введением на бабуинах

	Группа	Доза 1, 2 (100 мл)	Кол-во животных	
			Самец	Самка
Часть 1 Только фаза лечения	1В	Контроль	Раствор хлорида натрия	1
	2В	UB-421 - низкая доза	5 мг/кг	2
	3В	UB-421 - низкая доза	25 мг/кг	2
Часть 2 Фаза лечения и фаза восстановления	1В	Контроль	Раствор хлорида натрия	1
	2В	UB-421 - низкая доза	5 мг/кг	2
	3В	UB-421 - низкая доза	25 мг/кг	2

¹ Вводили раз в неделю в течение 8 недель

² Дозировка: мг (UB-421) /кг (массы тела)

Таблица 15. Кровь и результаты биопсии у бабуинов

Показатели	Результат
Клинический анализ крови	Норма
Клинический анализ биохимии	Норма
Коагулационные пробы	Норма
Анализ UB-421: Сыворотка и CD4+ клетки	Дозозависимая кинетика
Антитела бабуина против UB-421	Антитела против UB-421 не обнаружены
Минимальная конц. UB-421, обнаруженная с сыворотке, образцов с UB-421, связанным с CD4+ клетками	~ 10 мкг/мл
Субпопуляции лимфоцитов и моноцитов	Не наблюдали истощения CD4+ клеток
Влияние UB-421 на вакцинацию HBV	Гипореактивность по отношению к HBV, наблюдаемая у 6 из 8 животных, получавших низкую дозу UB-421, и у 3 из 8 животных, получавших высокую дозу UB-421
Анализ цитокинов (IL-2, IL-6, IFN-γ, ФНО-α)	Нет изменения в продукции цитокинов, наблюдаемой в стимулируемых митогеном культурах МКПК
Проточная цитометрия лимфатического узла (T-клетки и моноциты)	Дозозависимая кинетика

Таблица 16. Наблюдения и результаты вскрытия у бабуинов

Показатели	Результат
Офтальмологические (глазные) наблюдения	Норма - не отмечали изменений после 8 еженедельных введений высокой дозы UB-421 (Группа 3В)
Электрокардиографические (ЭКГ) наблюдения в течение каждой инфузии	Изменения показателей ЭКГ идентифицировали как нормальные суточные вариации и не связанные с UB-421
Возраст	7-18 лет
Масса тела	Самки: 17-23 кг Самцы: 24-35 кг
Масса органов	В пределах нормы
Макро и микроскопическая картина	Некоторые животные имели возрастные нарушения (остеоартроз, амилоидоз и/или кисты желез внутренней секреции), не связанные с лечением UB-421
Гистопатология (окрашивание г/э) Образцы костного мозга	Нет значимых очагов - более 50 образцов органов и тканей исследовали у каждого животного

Таблица 17. Доклинический обзор UB-421: Токсикологические исследования на бабуинах, обеспечивающие регистрацию IND

Патологии по значениям массы тела или температуры, потребления корма, общего анализа крови, клинической биохимии, электрокардиограмм, офтальмологического обследования, массы органов или гистопатологии не обнаружили после 8 еженедельных инфузий низкой дозы (5 мг/кг) или высокой дозы (25 мг/кг) UB-421.
Значимых изменений в относительном количестве CD4+ и CD8+ Т-клеток после инфузий UB-421 не обнаружили; транзиторный (немного повышенный) моноцитоз был отмечен в нескольких образцах крови у контрольных и получавших UB-421 животных.
Продолжительность UB-421 "покрытия" CD4+ Т-клеток бабуина с помощью проточной цитометрии: - 5 мг/кг МТ (низкая доза) ~ от 3 до 7+ дней. - 25 мг/кг МТ (высокая доза) ~ от более чем 7 до 21+ дней.
Ни у одного из бабуинов не обнаружили антитела против UB-421 (ВАНА) после нескольких инфузий.
На экспрессию цитокинов (IL2, IL6, IFN-γ, ФНО-α) не повлияло лечение UB-421, при этом она не была повышена или значимо подавлена.
Супрессии пролиферативной реакции лимфоцитов на митогены Con-A, РНА или PWM не наблюдали у получавших низкую или высокую дозу UB-421 животных в сравнении с реакциями контрольных животных на те же митогены.
Хотя полное покрытие UB-421 сохранялось в течение 8 недель, некоторые бабуины, получавшие высокую дозу UB-421 (Группа 3В), вырабатывали антитела против HBsAg после 2 вакцинаций вакциной против гепатита В производства Merck (Recombivax HB®).
Было установлено, что несколько инфузий низкой и высокой дозой UB-421 были безопасными и хорошо переносились всеми обследованными бабуинами (n=16).

Таблица 18. Ткани, исследованные в анализе перекрестной реактивности при использовании биотинилированного мАт dB4C7

Исследованы ткани взрослых людей; оценивали три или более доноров, за	Надпочечник, костный мозг, грудь (молочная железа), мозг (головной мозг, мозжечок), шейка матки, пищевод, глаз, сердце (миокард), кишечник (тонкий, толстый, толстая
---	--

исключением глаза (n=1)	кишка), почка, печень ⁵ , легкое (мезотелий), мононуклеарные клетки (лимфоциты и макрофаги в тканях) ⁴ , яичник, поджелудочная железа, периферический нерв, гипофиз, плацента, предстательная железа, слюнная железа, кожа, спинной мозг, селезенка ³ , желудок, попечнополосатая мышца, яичко, тимус ¹ , щитовидная железа, миндалина (и лимфатические узлы) ^{1,2} , мочевой пузырь (мочеточник), матка (эндометрий и миометрий), сосудистый эндотелий.
-------------------------	---

¹ Наблюдается сильное положительное окрашивание поверхности мембран

² Преинкубирование с немеченным мАт dB4C7 блокировало окрашивание

³ Наблюдается слабая положительная реактивность

⁴ Наблюдается случайное положительное окрашивание

⁵ Слабое по центру окрашивание клеток Купфера

Таблица 19. Параметры ФК для одной дозы UB-421 в исследовании фазы I

Параметры	UB-421 (одна доза, в/в) ¹	
	1 мг/кг	28,6
C_{MAX} (мкг/мл)	5 мг/кг	81,7
	10 мг/кг	164,5
	25 мг/кг	462,5
	1 мг/кг	201
$AUC_{0-\infty}$ (мкг·ч/мл)	5 мг/кг	4739
	10 мг/кг	12785
	25 мг/кг	51367
	1 мг/кг	14,4
$T_{1/2}$ (ч)	5 мг/кг	25,2
	10 мг/кг	37,0
	25 мг/кг	85,4
	1 мг/кг	21,6
MRT (ч)	5 мг/кг	45,3
	10 мг/кг	62,6
	25 мг/кг	97,4

¹ Результаты являются средним для 3 субъектов

Таблица 20. Снижение вирусной нагрузки после многократного введения UB-421 в исследовании фазы IIa

Конечный показатель	Когорта 1 (10 мг/кг раз в неделю)		Когорта 2 (25 мг/кг раз в две недели)	
	ITT N=14	PP N=7	ITT N=15	PP N=11
Среднее (SD) макс. снижение ВН \log_{10} копий/мл	-2,27 (0,60)	-2,73 (0,34)	2,45 (0,46)	-2,47 (0,45)
Максимальное индивидуальное снижение ВН \log_{10} копий/мл		-3,23		-3,28
n (%) >1 \log_{10} снижение ВН	14 (100%)	7 (100%)	15 (100%)	11 (100%)
n (%) <200 копий/мл	8 (57,1%)	5 (71,4%)	10 (66,7%)	7 (63,6%)
n (%) <50 копий/мл	3 (21,4%)	3 (42,9%)	3 (20,0%)	2 (18,2%)
n (%) <20 копий/мл		3 (42,9%)		2 (18,2%)

ITT: совокупность участников с назначенным лечением

PP: совокупность по протоколу

ВН: вирусная нагрузка

Таблица 21а. Данные по клинической эффективности фазы IIa, демонстрирующие снижение вирусной нагрузки до неподдающегося обнаружению уровня: Большой 1-1-01 (Когорта 1: 10 мг/кг раз в неделю)

Посещение	Вирусная нагрузка (копий/мл)	Ат против UB-421 (мкг/мл)
1	9,570	NQ
2	392	
3	185	NQ
4	27	
5	<20	NQ
6	<20	
7	<20	NQ
8	<20	
9	<20	
10	<20	NQ
11	1,730	NQ

5 NQ: не поддается количественному определению

Косая черта: не оценивали

10 Таблица 21б. Данные по клинической эффективности фазы Па, демонстрирующие снижение вирусной нагрузки до неподдающегося обнаружению уровня: Больной 1-1-02 (Когорта 1: 10 мг/кг раз в неделю)

Посещение	Вирусная нагрузка (копий/мл)	Ат против UB-421 (мкг/мл)
1	34,200	NQ
2	817	
3	143	NQ
4	187	
5	76	NQ
6	63	
7	27	NQ
8	69	
9	<20	
10	30	NQ
11	98,800	NQ

20 NQ: не поддается количественному определению

Косая черта: не оценивали

25 Таблица 21с. Данные по клинической эффективности фазы Па, демонстрирующие снижение вирусной нагрузки до неподдающегося обнаружению уровня: 1-2-03 (Когорта 2: 25 мг/кг раз в две недели)

Посещение	Вирусная нагрузка (копий/мл)	Ат против UB-421 (мкг/мл)
1	2,990	NQ
2	393	
3	31	NQ
4	71	
5	60	NQ
6	20	
7	<20	NQ
8	<20	
9	<20	
10	<20	NQ
11	4,010	NQ

35 NQ: не поддается количественному определению

Косая черта: не оценивали

40 Таблица 22а. Среднее количество CD4 Т-клеток у получавших UB-421 больных из Когорты 1 (10 мг/кг раз в неделю)

Посещение	T 1-1-01 (PP)	T 1-1-02 (PP)	K 2-1-03 (PP)	K 2-1-04 (PP)	K 2-1-05 (PP)	Среднее кол-во CD4
5	1	509	867	526	512	466
	2	1101	655	646	811	455
	3	890	429	619	566	552
	4	890	534	585	735	649
	5	754	304	658	531	592
	6	821	734	617	606	512
	7	877	559	653	600	563
	8	804	650	765	741	685
	9	756	810	657	632	539
	10	918	511	402	377	659
10	11	461	622	725	667	381
	12	507	637	606	589	480
						561

Таблица 22б. Среднее количество CD4 Т-клеток у получавших UB-421 больных из Когорты 2 (25 мг/кг раз в неделю)

Посещение	T 1-2-01 (PP)	T 1-2-02 (PP)	T 1-2-03 (PP)	T 1-2-04 (PP)	K 2-2-01 (PP)	K 2-2-02 (PP)	T 1-2-06 (PP)	Среднее кол-во CD4
15	1	310	466	756	430	806	618	425
	2	458	548	766	600	811	672	558
	3	533	581	569	610	701	662	445
	4	459	591	699	409	902	648	629
	5	392	608	670	506	665	776	539
	6	396	462	640	532	999	646	128
	7	365	388	552	598	756	653	548
	8	397	606	451	557	666	697	662
	9	415	466	481	653	690	619	483
	10	287	470	584	281	784	550	493
20	11	379	404	521	375	771	470	548
	12	345	367	729	393	705	534	511
25								492

Таблица 23. Схема лечения UB-421 при функциональном излечении

30	Потенциальное преимущество UB-421 по сравнению с ВААРТ средствами:	
	<ul style="list-style-type: none"> •UB-421 блокирует межклеточную передачу вирусов ВИЧ-1 •UB-421 перекрестно связывает CDR2-подобную петлю CD4 и активирует клетки и, таким образом, ВИЧ-1 в латентном состоянии 	
	Задачи:	
	<ul style="list-style-type: none"> •Обеспечить эффективную защиту, в дополнение к ВААРТ, при блокировании как бесклеточной, так и межклеточной передачи •Разработать стратегию функционального излечения ВИЧ-инфицированных больных, которые не проходили лечения или находятся на стабильной антиретровирусной терапии 	
35	Цели:	
	<ul style="list-style-type: none"> •Исследовать эффективность курсов лечения UB-421 с непрерывной ВААРТ в отношении уменьшения величины латентного вирусного резервуара и излечения ВИЧ-1-инфицированных больных 	
	Тип исследования:	
	Интервенционное	
	Схема исследования:	
	С оценкой в одной группе; открытое	
40	Назначенные вмешательства:	
	<ul style="list-style-type: none"> •ВИЧ-1-инфицированным больным назначают два курса из 8 доз 25 мг/кг UB-421, вводимых раз в две недели путем внутривенного вливания в дни 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 и 99, в течение периода продолжительностью 4 месяца, с последующими 2 месяцами только фоновой ВААРТ. •По завершении периода исследования продолжительностью один год, дополнительное неэкспериментальное исследование будет проводить и контролировать с учетом следующих условий: <ul style="list-style-type: none"> - Завершение 2 курсов UB-421 в комбинации с ВААРТ в одногодичном исследовании - Значимое уменьшение вирусных резервуаров - Количество CD4+ Т-клеток >500/мм^3 	
	<ul style="list-style-type: none"> •В дополнительном неэкспериментальном исследовании фоновую ВААРТ будут прерывать для оценки: <ul style="list-style-type: none"> - времени до вирусемии >1000 копий/мл - времени, требуемого для удовлетворения критериев по возобновлению ВААРТ 	
45		

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> United Biomedical, Inc.

Wang, Chang-Yi

<120> ЛЕЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗЛЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ
 АНТИТЕЛАМИ К CD4, ОПОСРЕДУЮЩИМИ КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ВХОДА ВИЧ
 <130> 1004263.213WO (2034WO)
 <140> PCT/US2014/065048
 5 <141> 2014-11-11
 <150> US 62/051,200
 <151> 2014-09-16
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Мышиное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(5)
 <223> CDR1 тяжелой цепи мышиного антитела В4
 20 <400> 1
 Asp Tyr Val Ile His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 25 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышиное антитело
 <220>
 30 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR2 тяжелой цепи мышиного антитела В4
 <400> 2
 Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe Lys
 35 1 5 10 15
 Asp
 <210> 3
 <211> 9
 <212> Белок
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышиное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН
 45 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 тяжелой цепи мышиного антитела В4
 <400> 3
 Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr

1 5
 <210> 4
 <211> 15
 <212> Белок
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышиное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН
 10 <222> (1)..(15)
 <223> CDR1 легкой цепи мышиного антитела В4
 <400> 4
 Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15
 15 <210> 5
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Мышиное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR2 легкой цепи мышиного антитела В4
 25 <400> 5
 Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 30 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышиное антитело
 <220>
 35 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 легкой цепи мышиного антитела В4
 <400> 6
 Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Leu Thr
 40 1 5
 <210> 7
 <211> 448
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Гуманизированное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН

RU 2762315 C2

<222> (1)..(448)
 <223> Тяжелая цепь деиммунизированного человеческого антитела B4 [UB421] с
 идентичными CDR 1, 2 и 3, полученными из соответствующих CDR 1, 2
 и 3 из последовательности тяжелой цепи исходного мышного антитела B4
 5 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 10 Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 15 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 20 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 25 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 30 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 35 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 40 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 45 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

	340	345	350
5	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 355	360	365
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 370	375	380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp 385	390	395
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 405	410	415
10	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala 420	425	430
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435	440	445
	<210> 8		
15	<211> 218		
	<212> Белок		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Гуманизированное антитело		
20	<220>		
	<221> ДОМЕН		
	<222> (1)..(218)		
	<223> Легкая цепь деиммунизированного человеческого антитела B4 [UB421] с идентичными CDR 1, 2 и 3, полученными из соответствующих CDR 1, 2 и 3 из последовательности легкой цепи исходного мышевого антитела B4		
25	<400> 8		
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15		
	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp 30 20 25 30		
	Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 35 40 45		
	Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala 50 55 60		
35	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His 65 65 70 75 80		
	Pro Val Glu Glu Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr 85 85 90 95		
	Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 40 100 105 110		
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 115 115 120 125		
	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 130 135 140		
45	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 145 145 150 155 160		
	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 165 165 170 175		

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 5 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 9
 <211> 448
 <212> Белок
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Гуманизированное антитело
 <220>
 <221> ДОМЕН
 15 <222> (1)..(448)
 <223> Тяжелая цепь деиммунизированного человеческого антитела B4 [UB421] с
 заменами M253Y/S255T/T257E
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 20 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 25 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 30 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 35 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 40 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 45 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

RU 2762315 C2

	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg	
	245	250
	Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
	260	265
5	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
	275	280
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Val	
	290	295
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
10	305	310
	315	320
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	325	330
	335	
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	340	345
	350	
15	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
	355	360
	365	
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
	370	375
	380	
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
20	385	390
	395	400
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
	405	410
	415	
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
	420	425
	430	
25	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	435	440
	445	
	<210> 10	
	<211> 448	
	<212> Белок	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированное антитело	
	<220>	
	<221> УЧАСТОК	
35	<222> (253) .. (253)	
	<223> М или Y	
	<220>	
	<221> УЧАСТОК	
	<222> (255) .. (255)	
40	<223> S или T	
	<220>	
	<221> УЧАСТОК	
	<222> (257) .. (257)	
	<223> T или E	
45	<220>	
	<221> УЧАСТОК	
	<222> (298) .. (298)	
	<223> N или H	

RU 2762315 C2

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 5 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
 50 55 60
 10 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 15 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 20 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 25 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 30 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg
 245 250 255
 Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 35 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 40 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 45 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

RU 2762315 C2

	370	375	380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395	400
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
5	405	410	415
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425	430
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440	445
10	<210> 11		
	<211> 118		
	<212> Белок		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
15	<223> Гуманизированное антитело		
	<400> 11		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	20	25	30
	Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45
	Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe		
	50	55	60
25	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
	65	70	75
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
30	100	105	110
	Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 12		
	<211> 330		
35	<212> Белок		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Гуманизированное антитело		
	<220>		
40	<221> УЧАСТОК		
	<222> (135)..(135)		
	<223> М или Y		
	<220>		
	<221> УЧАСТОК		
45	<222> (137)..(137)		
	<223> S или T		
	<220>		
	<221> УЧАСТОК		

<222> (139)..(139)
 <223> Т или Е
 <220>
 <221> УЧАСТОК
 5 <222> (180)..(180)
 <223> Н или Н
 <400> 12
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 10 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 15 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 20 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys
 25 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 30 Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 35 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 40 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 45 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

	325	330		
<210>	13			
<211>	111			
<212>	Белок			
<i>5</i>	<213> Искусственная последовательность			
<220>				
<223>	Гуманизированное антитело			
<400>	13			
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
<i>10</i>	1	5	10	15
	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp			
	20	25	30	
	Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
	35	40	45	
<i>15</i>	Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
	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 Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr			
<i>20</i>	85	90	95	
	Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110	
<210>	14			
<211>	107			
<i>25</i>	<212> Белок			
<213>	Искусственная последовательность			
<220>				
<223>	Гуманизированное антитело			
<400>	14			
<i>30</i>	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
	1	5	10	15
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
	20	25	30	
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
<i>35</i>	35	40	45	
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
	50	55	60	
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
	65	70	75	80
<i>40</i>	Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
	85	90	95	
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	100	105		

45 (57) Формула изобретения

1. Антитело, направленное против молекулы CD4, где антитело содержит: аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающую:

CDR1 SEQ ID NO: 1,
 CDR2 SEQ ID NO: 2 и
 CDR3 SEQ ID NO: 3; и

аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID

5 NO: 12;

аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, включающую:

CDR1 SEQ ID NO: 4,
 CDR2 SEQ ID NO: 5 и
 10 CDR3 SEQ ID NO: 6; и

аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 14.

2. Антитело по п. 1, где антитело:

a) связывается с внеклеточной областью молекулы CD4;

15 b) конкурентно ингибитирует вход ВИЧ в клетку;

c) снижает вирусную нагрузку ВИЧ у ВИЧ-положительного больного до меньше чем 50 копий на миллилитр крови без отдачи вирусной нагрузки при введении антитела ВИЧ-положительному больному в количестве, достаточном для полного покрытия CD4+ клеток, и

20 d) активирует покоящиеся CD4+ клетки при перекрестном связывании.

3. Антитело по п. 1, где антитело связывается с областью вокруг домена 1 молекулы CD4.

4. Антитело по п. 1, где антитело связывается с областью вокруг CDR2 области в домене 1 CD4.

25 5. Антитело по п. 1, где антитело включает участок N-гликозилирования в Fv-области.

6. Антитело по п. 1, где антитело включает участок N-гликозилирования в вариабельной области тяжелой цепи.

7. Антитело по п. 1, где антитело включает остаток аспарагина (Asn), расположенный в CDR вариабельной области тяжелой цепи, который связан с молекулой сахара.

30 8. Антитело по п. 1, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 имеет аминокислоты Tyr (Y), Thr (T), Glu (E) и His (H) в положениях 135, 137, 139 и 180 соответственно.

9. Антитело по п. 1, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 имеет аминокислоты Met (M), Ser (S), Thr (T) и His (H)

35 положениях 135, 137, 139 и 180 соответственно.

10. Антитело по п. 9, где антитело содержит участок N-гликозилирования в вариабельной области тяжелой цепи.

11. Антитело по п. 10, где участком N-гликозилирования является остаток аспарагина (Asn), расположенный в CDR3 вариабельной области тяжелой цепи.

40 12. Антитело по п. 1, где антитело является моноклональным антителом.

13. Антитело по п. 1, где антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

14. Антитело по п. 1, где антитело является гуманизированным моноклональным антителом, включающим:

45 вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

15. Антитело по п. 1, где антитело является гуманизированным моноклональным антителом, включающим:
и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
- 5 легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.
16. Антитело по п. 1, где антитело является гуманизированным моноклональным антителом, включающим:
и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и
легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.
- 10 17. Антитело по п. 1, где антитело является гуманизированным моноклональным антителом, включающим:
и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и
легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.
- 15 18. Антитело по п. 1, обладающее абсолютной аффинностью связывания (Kd) с мембраносвязанным CD4 на клетках HPB-ALL от приблизительно $3,1 \times 10^{-11}$ М до приблизительно $8,1 \times 10^{-11}$ М.
19. Антитело по п. 1, связанное с молекулой CD4 на поверхности Т-клетки.
20. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 200,0 мг/мл антитела по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 25 21. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 200,0 мг/мл антитела по п. 1 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 20 мМ глицина и 0,05% (об./об.) полисорбата 20.
22. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 200,0 мг/мл антитела по п. 11 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 20 мМ глицина, 0,05% (об./об.) полисорбата 20 и 10 мМ гистидина.
- 30 23. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая приблизительно 10,0 мг/мл антитела по п. 1 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 20 мМ глицина и 0,05% (об./об.) полисорбата 20.
24. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая приблизительно 10,0 мг/мл антитела по п. 21 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 20 мМ глицина, 0,05% (об./об.) полисорбата 20 и 10 мМ гистидина.
- 35 25. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 200,0 мг/мл антитела по п. 15 и фармацевтически приемлемый носитель.
26. Фармацевтическая композиция для лечения ВИЧ-инфекции, включающая от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 200,0 мг/мл антитела по п. 17 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 40 27. Способ лечения субъекта после того, как он подвергнут контакту с ВИЧ, включающий:
введение субъекту фармакологически эффективного количества антитела по п. 31.
28. Способ по п. 27, где антитело вводят субъекту после контакта с ВИЧ.
- 45 29. Способ по п. 27, где антитело вводят в течение 48 часов после контакта с ВИЧ.
30. Способ по п. 27, где антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.
31. Способ по п. 30, где антитело вводят субъекту многократно.
32. Способ по п. 31, где антитело вводят субъекту с еженедельным, двухнедельным

или ежемесячным интервалом.

33. Способ по п. 31, дополнительно включающий этап введения субъекту противовирусного средства.

34. Способ по п. 33, где противовирусное средство является высокоактивной

⁵ антиретровирусной терапией (ВААРТ).

35. Способ по п. 34, где ВААРТ включает нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы в комбинации с ингибитором протеазы или ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы.

36. Способ по п. 34, где антитело вводят одновременно с ВААРТ.

¹⁰ 37. Способ по п. 34, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

i) введение антитела субъекту в течение первого периода времени с последующим перерывом в лечении в течение второго периода времени и

ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно в течение первого периода времени и

¹⁵ второго периода времени в (i).

38. Способ по п. 34, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

i) введение антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с еженедельным, двухнедельным или ежемесячным интервалом, с последующим

²⁰ двухмесячным перерывом в лечении и

ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно в течение шестимесячного периода в (i).

39. Способ по п. 37, где субъект проходит лечение в течение двух курсов.

40. Способ по п. 38, где субъект проходит лечение в течение двух курсов.

41. Способ по п. 34, где антитело вводят в момент времени, который не совпадает с

²⁵ моментом применения ВААРТ.

42. Способ по п. 34, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

i) введение антитела субъекту в течение первого периода времени с последующим перерывом в лечении в течение второго периода времени и

³⁰ ii) введение ВААРТ субъекту в течение второго периода времени, а не в течение первого периода времени.

43. Способ по п. 42, где антитело вводят с регулярными интервалами в течение первого периода времени.

³⁵ 44. Способ по п. 42, где антитело вводят с еженедельными, двухнедельными или ежемесячными интервалами в течение первого периода времени.

45. Способ лечения субъекта с ВИЧ-инфекцией, включающий назначение субъекту схемы лечения, включающей:

a) фармакологически эффективное количество антитела по п. 1 и

b) высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ).

⁴⁰ 46. Способ по п. 45, где антитело вводят субъекту в дозе по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела.

47. Способ по п. 45, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

i) введение антитела субъекту в течение первого периода времени с последующим

⁴⁵ перерывом в лечении в течение второго периода времени и

ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно в течение первого периода времени и второго периода времени в (i).

48. Способ по п. 45, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс

включает:

i) введение антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с еженедельными, двухнедельными или ежемесячными интервалами, с последующим двухмесячным перерывом в лечении и

5 ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно в течение шестимесячного периода в (i).

49. Способ по п. 47, где субъект проходит лечение в течение двух или более курсов.

50. Способ по п. 48, где субъект проходит лечение в течение двух или более курсов.

51. Способ по п. 48, где антитело и ВААРТ вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

10 i) введение антитела субъекту в течение периода продолжительностью четыре месяца с еженедельными, двухнедельными или ежемесячными интервалами, с последующим двухмесячным перерывом в лечении и

ii) введение ВААРТ субъекту непрерывно в течение шестимесячного периода в (i).

52. Способ по п. 45, где антитело в (a) вводят в момент времени, который не совпадает 15 с моментом применения ВААРТ в (b).

53. Способ по п. 45, где антитело в (a) и ВААРТ в (b) вводят субъекту в течение курса, где курс включает:

i) введение антитела субъекту в течение первого периода времени с последующим перерывом в лечении в течение второго периода времени и

20 ii) введение ВААРТ субъекту в течение второго периода времени, а не в течение первого периода времени.

54. Способ по п. 53, где антитело вводят с регулярными интервалами в течение первого периода времени.

55. Способ по п. 53, где антитело вводят с еженедельными, двухнедельными или

25 ежемесячными интервалами в течение первого периода времени.

56. Способ ингибирования входа ВИЧ в CD4+ клетку, включающий:

контакт антитела по п. 1 с клеткой.

57. Способ ингибирования связывания gp120 с CD4+ клеткой, включающий:

контакт антитела по п. 1 с клеткой.

30 58. Способ активации покоящейся CD4+ Т-клетки при перекрестном связывании, включающий:

контакт антитела по п. 1 с клеткой.

59. Способ активации латентного резервуара ВИЧ в покоящейся Т-клетке при перекрестном связывании, включающий:

35 контакт антитела по п. 1 с клеткой.

60. Способ уменьшения латентных резервуаров ВИЧ в образце клеток, инфицированных ВИЧ, включающий:

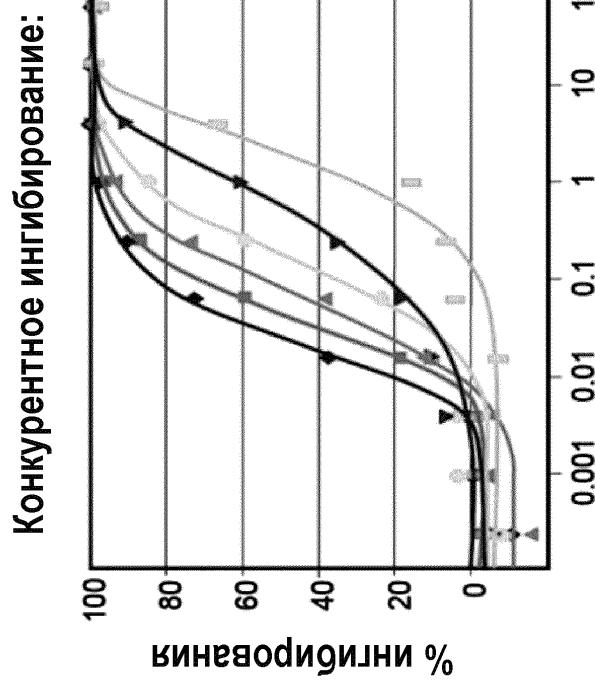
а) контакт антитела по п. 1 с образцом клеток и

б) воздействие ВААРТ на образец клеток.

40

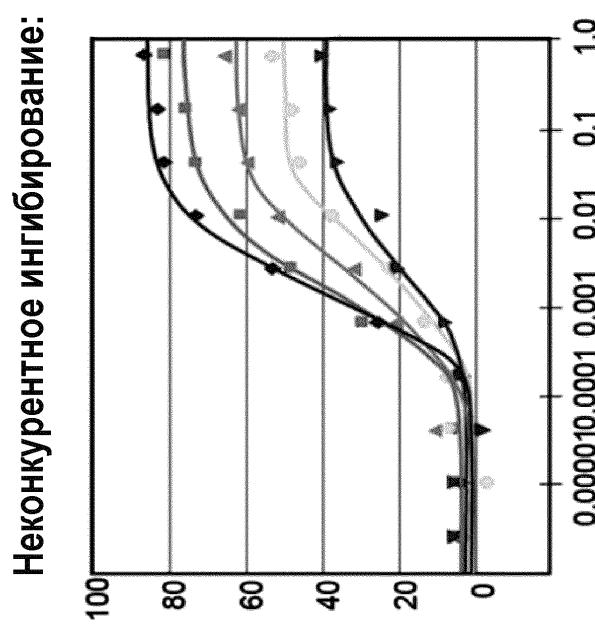
45

ФИГ.1а



например, ингибитор слияния

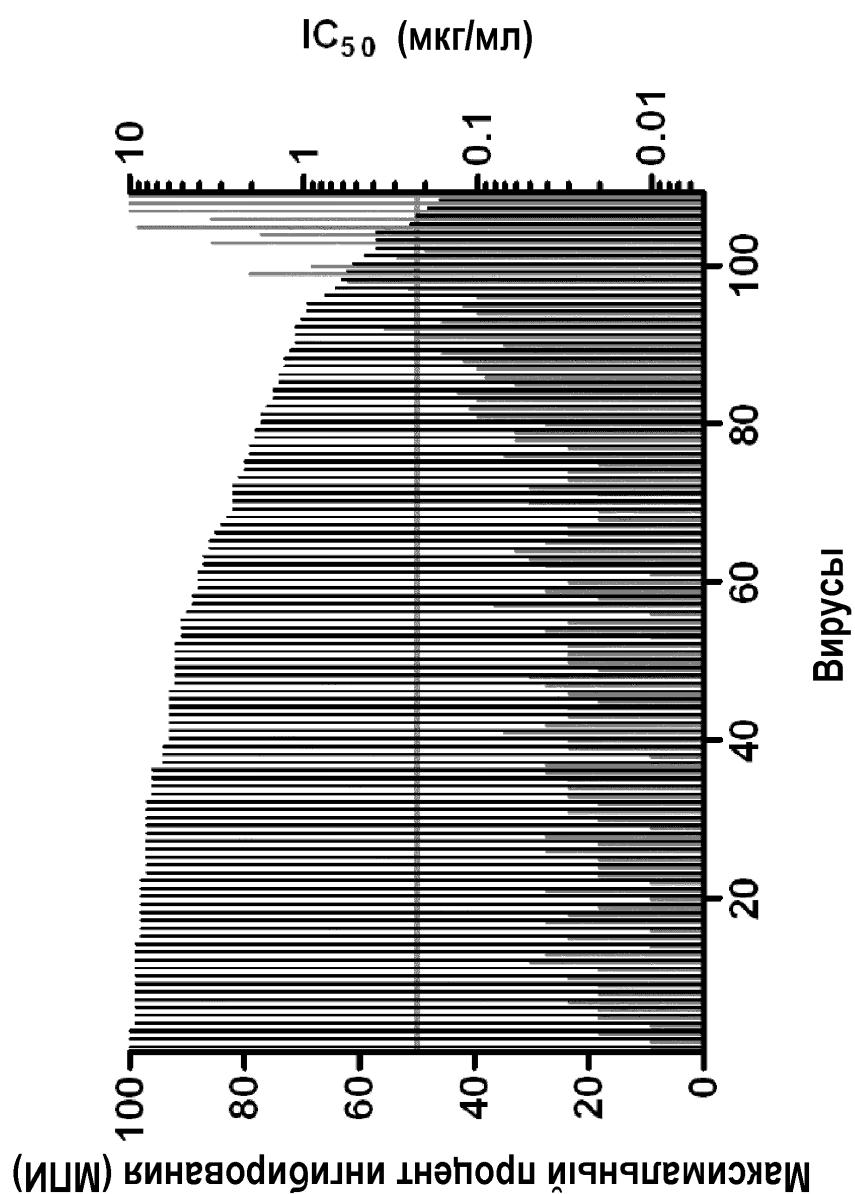
ФИГ.1б



например, антагонист коррецептора

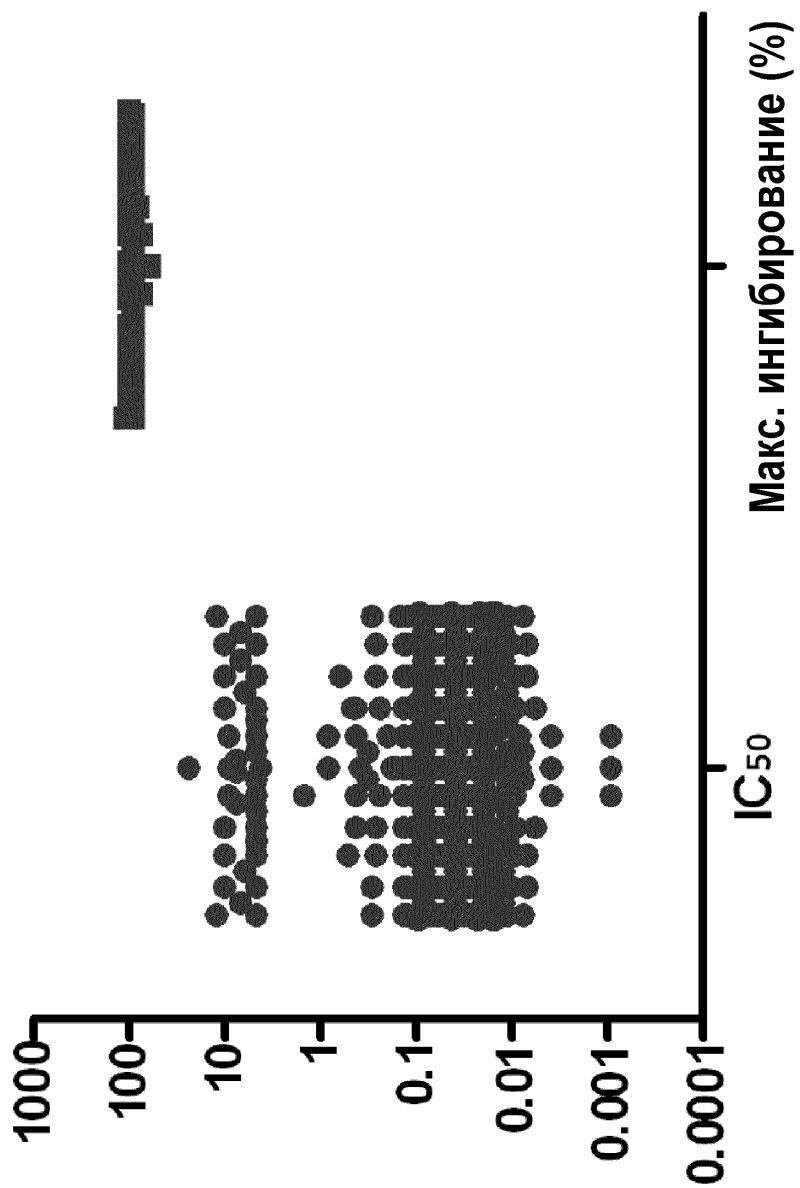
2/36

ФИГ.2



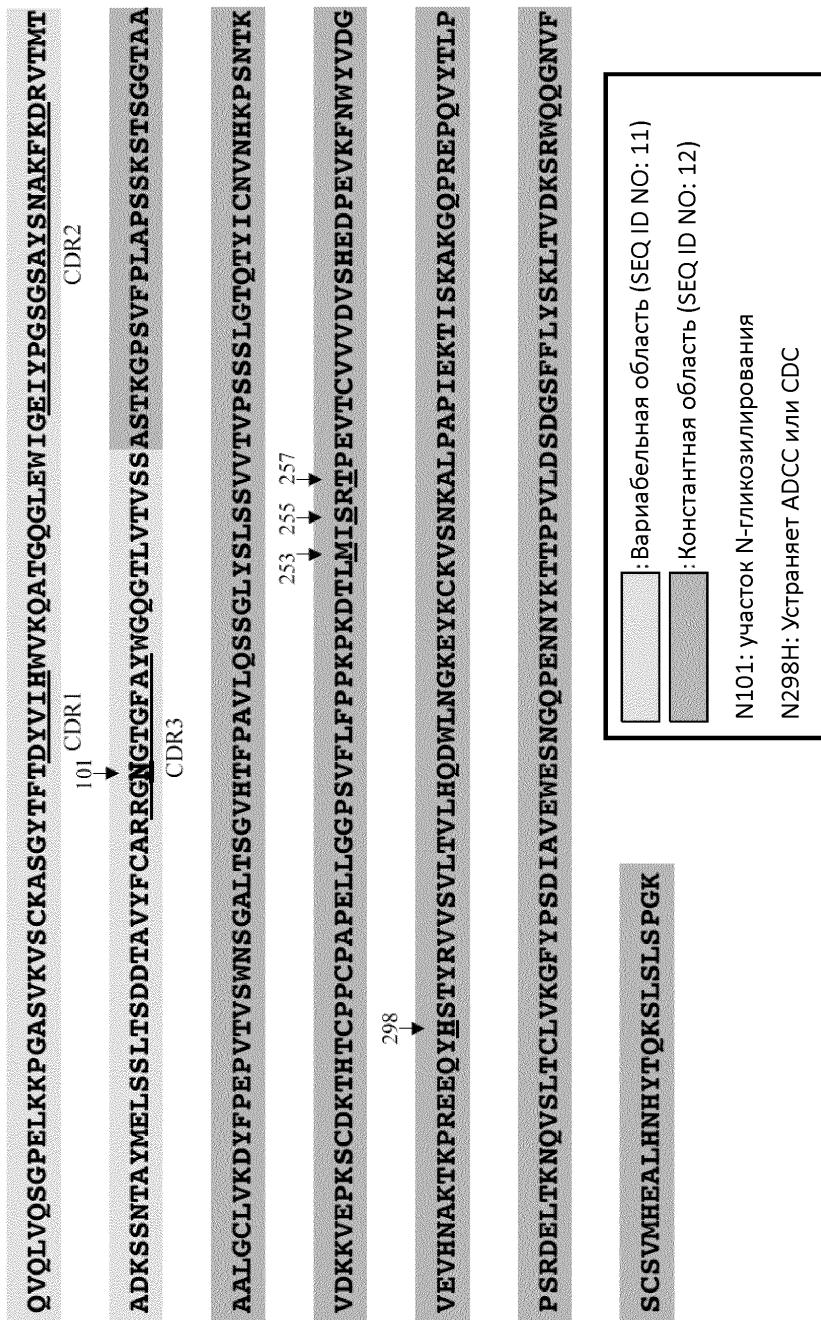
3/36

ФИГ.3



ФИГ.4

Полная Fv-область тяжелой цепи мАТ dB4C7/UB-421 (SEQ ID NO: 7):



5/36

ФИГ.5

Полная Fv-область легкой цепи мАт dB4C7/UB-421 (SEQ ID NO: 8):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATITCKAGOSVVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIIYVASNLESGIPARFSGSGS
CDR1

GTDFTLN1IHPVVEENDAATYYCQOSYKDEPLTFFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASUVCLLNN
CDR2

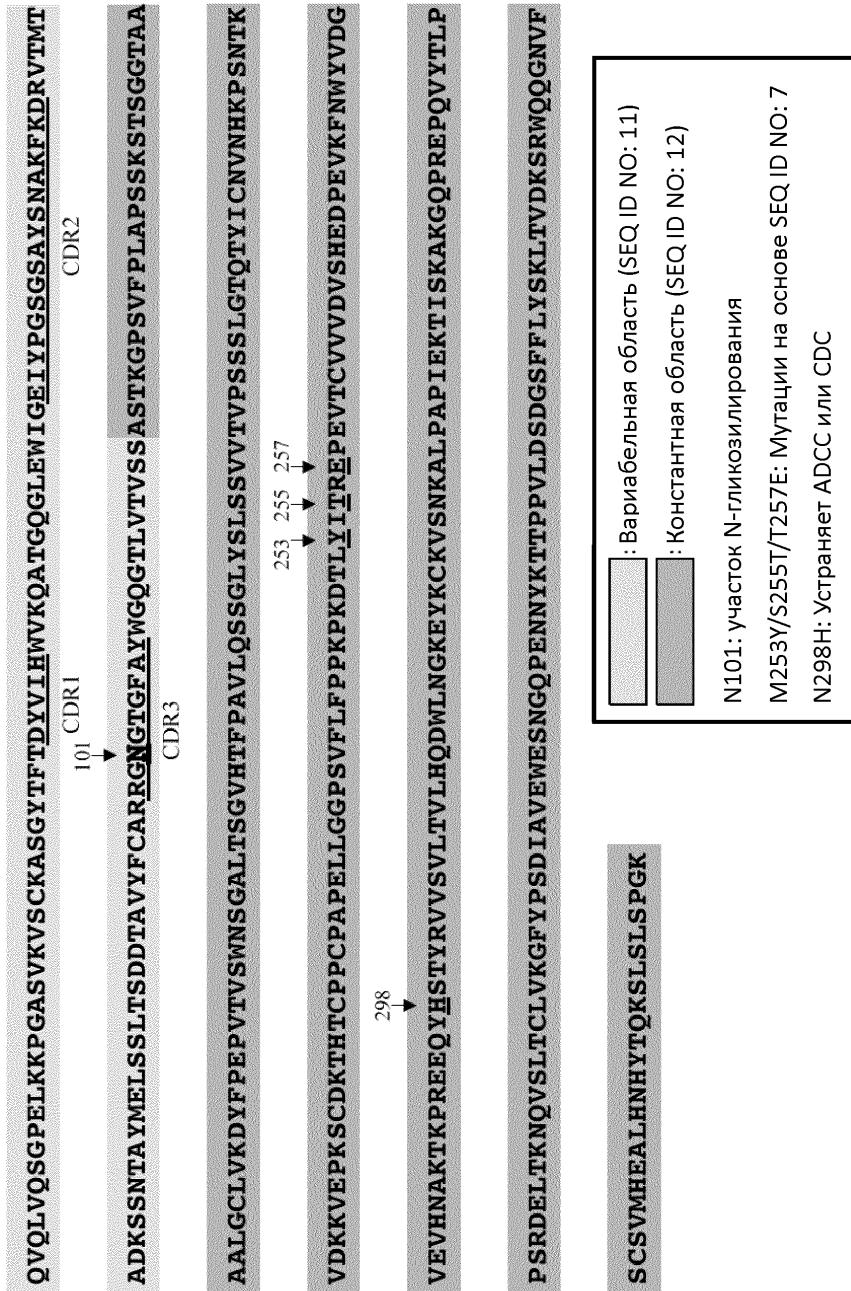
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLTSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSF
CDR3

	: Вариабельная область (SEQ ID NO: 13)
	: Константная область (SEQ ID NO: 14)

NRGEC

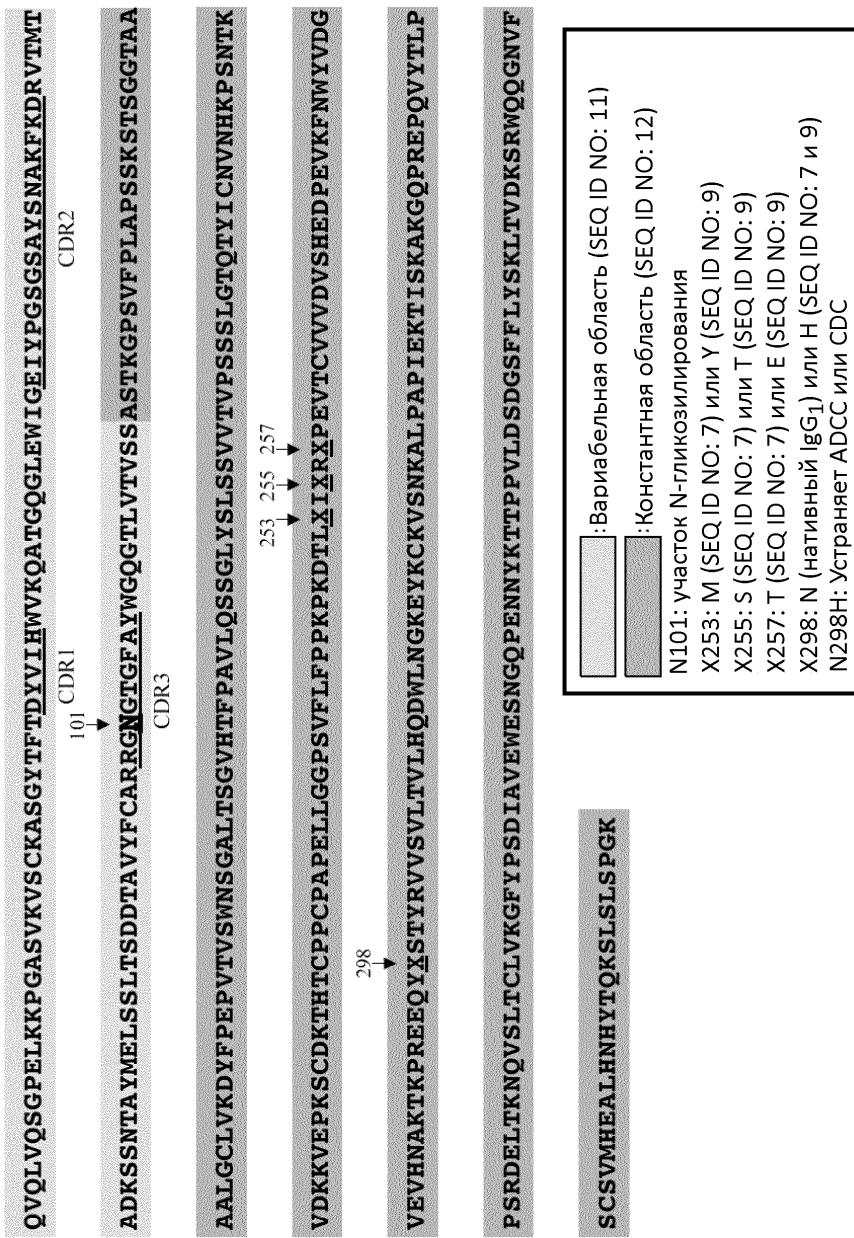
ФИГ. 6

Полная Fv-область тяжелой цепи улучшенного гуманизированного антитела (SEQ ID NO: 9):

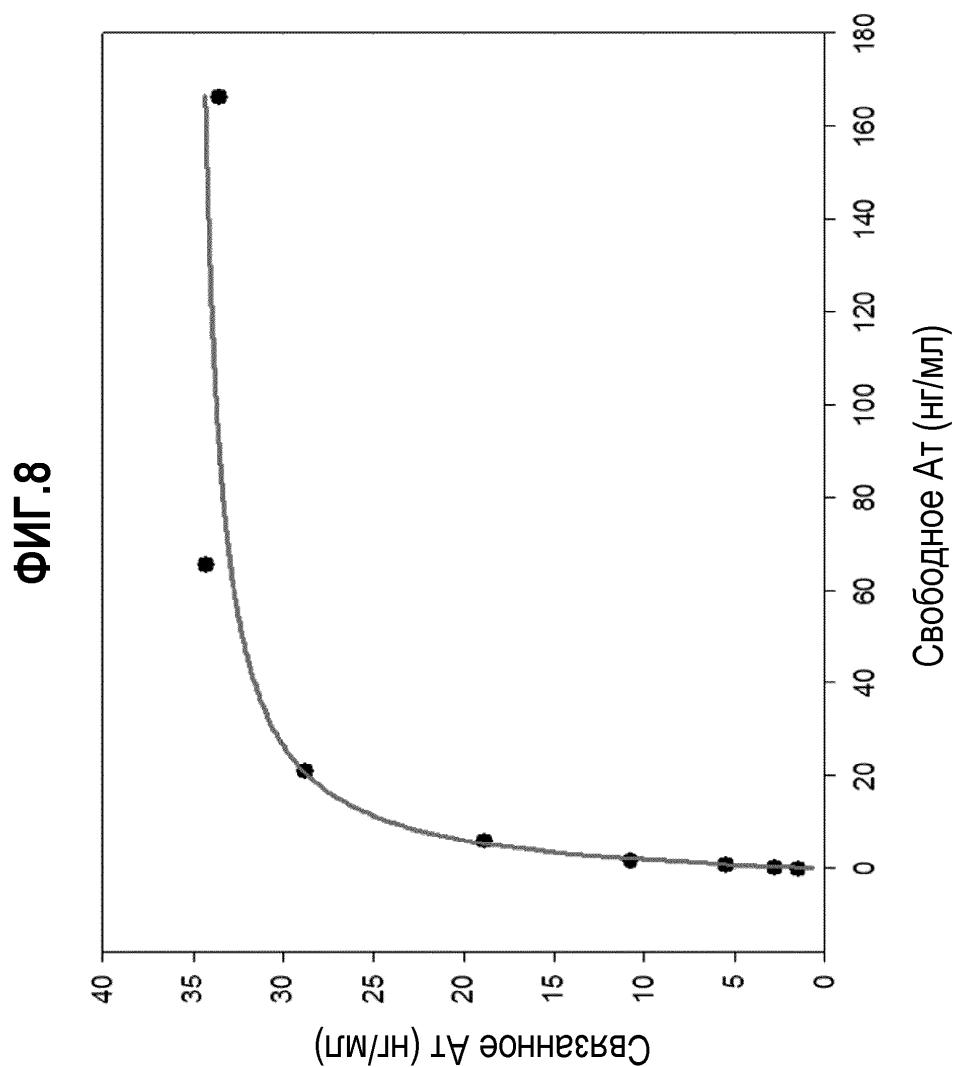


ФИГ.7

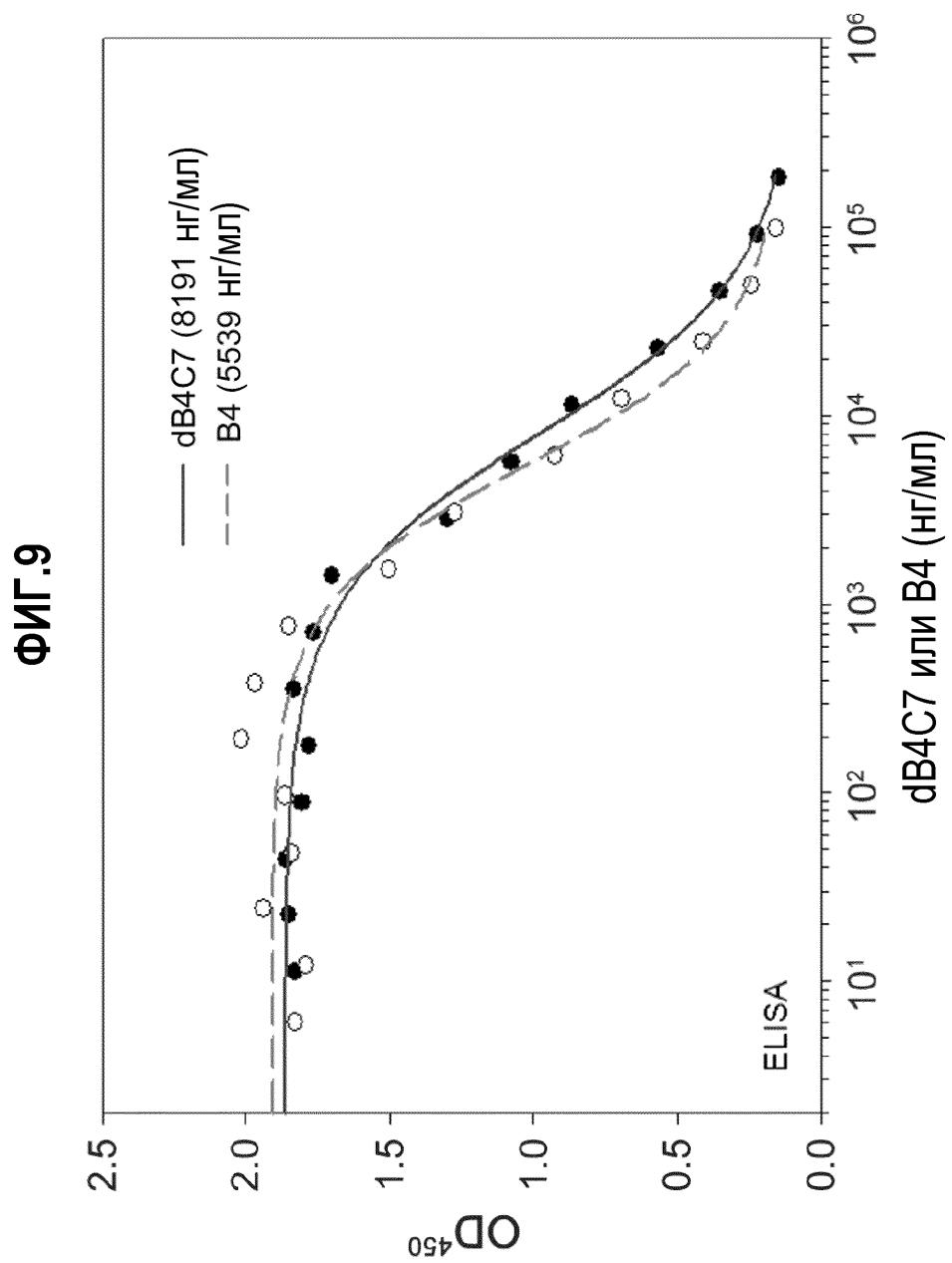
Полная Fv-область тяжелой цепи мАт dB4 (SEQ ID NO: 10):



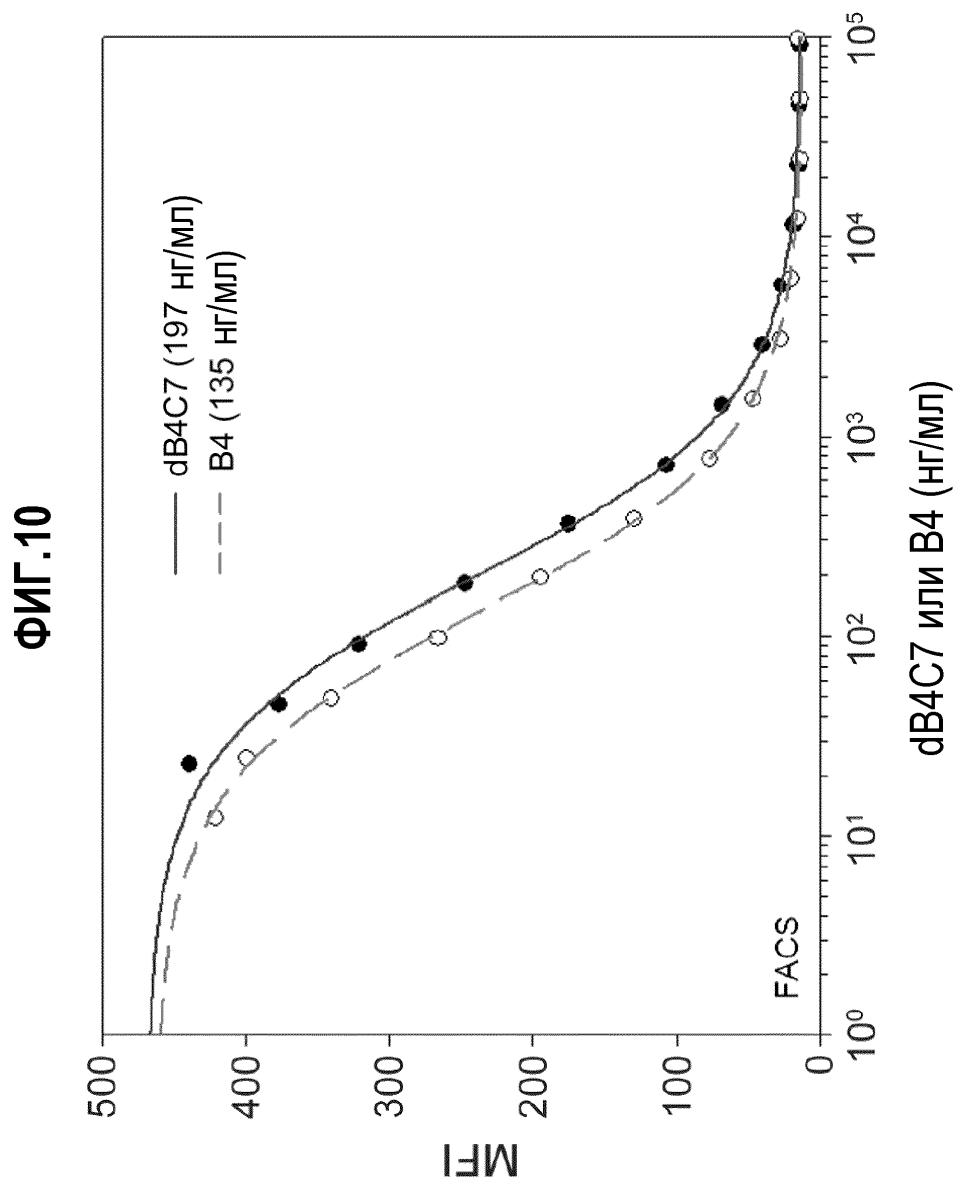
8/36



9/36

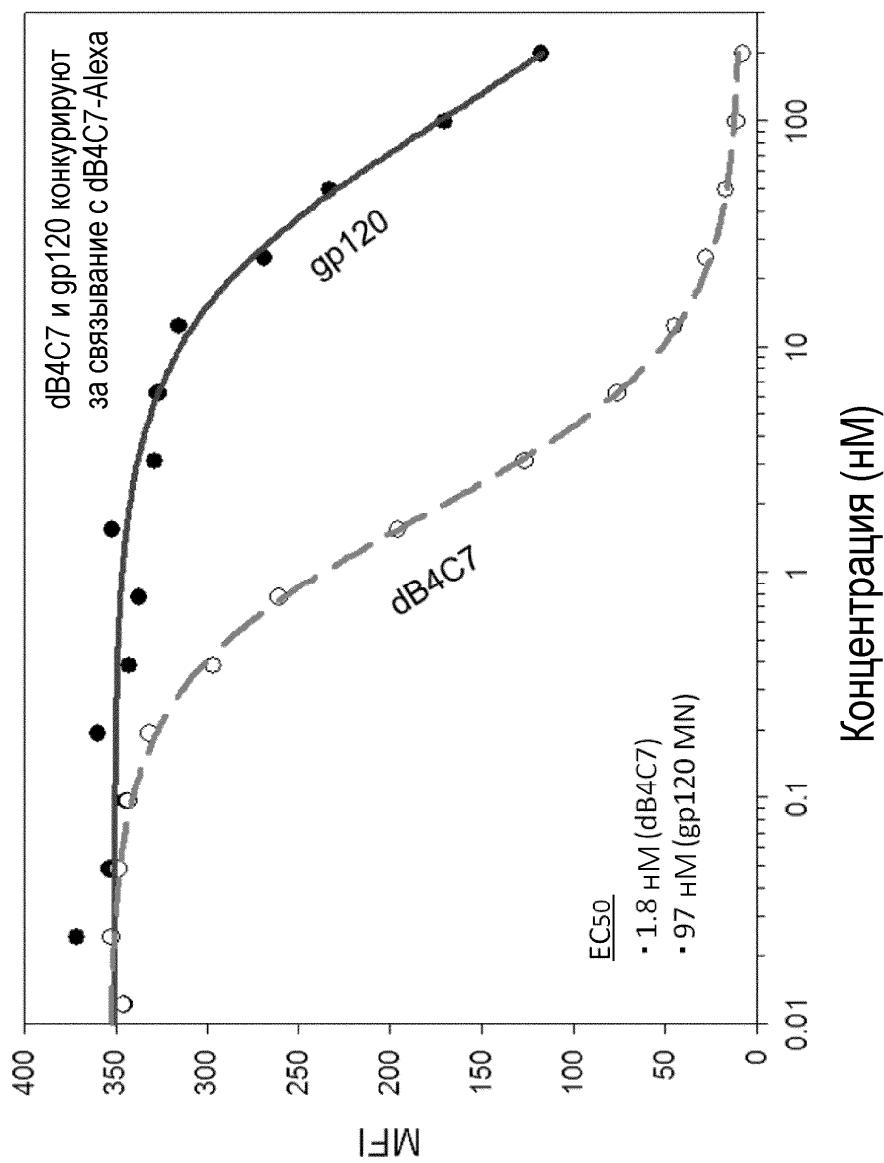


10/36



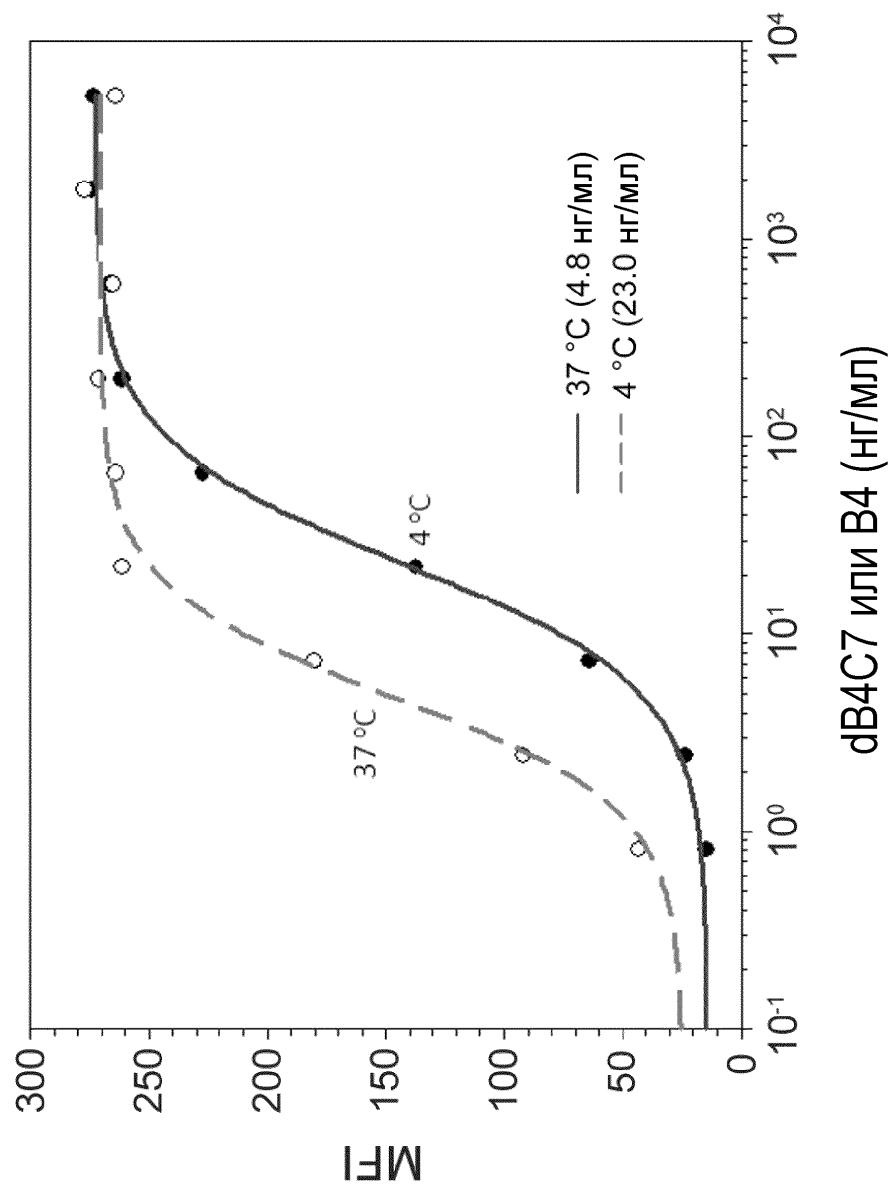
11/36

ФИГ.11



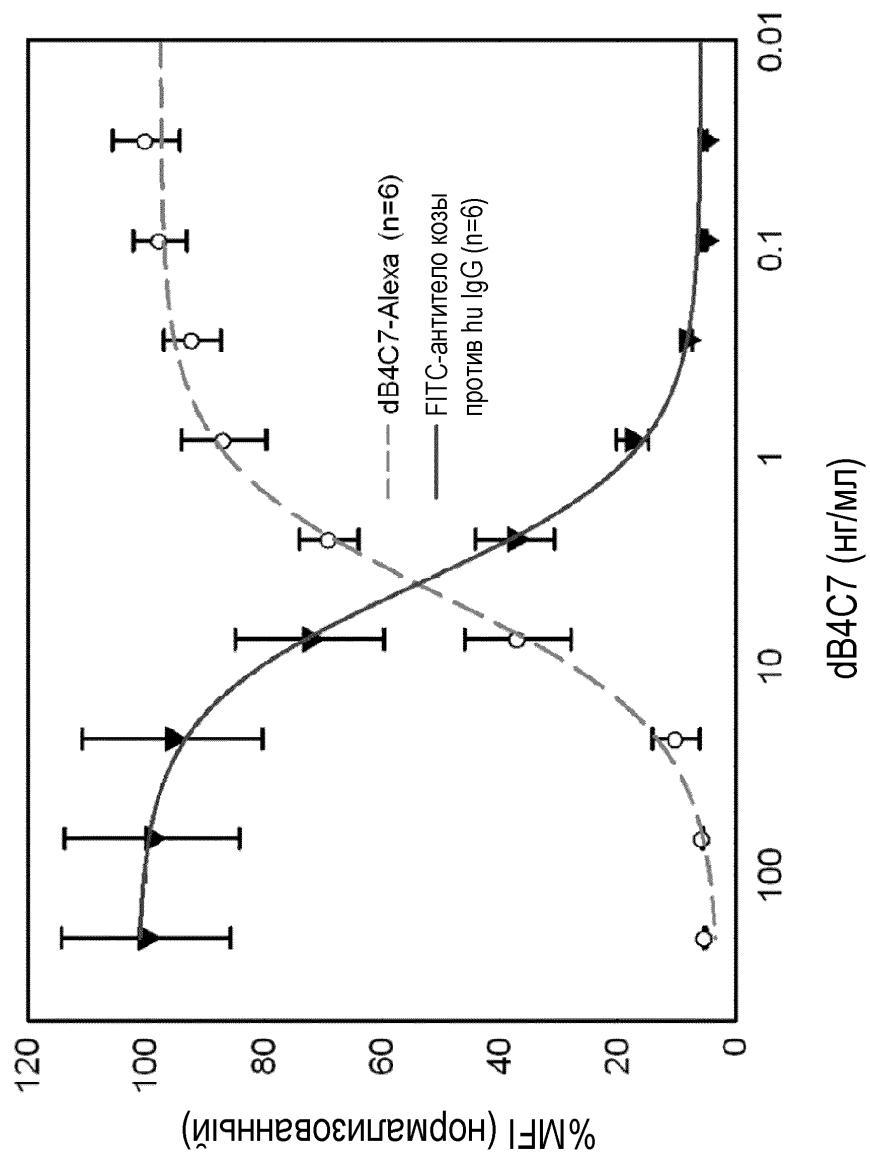
12/36

ФИГ.12



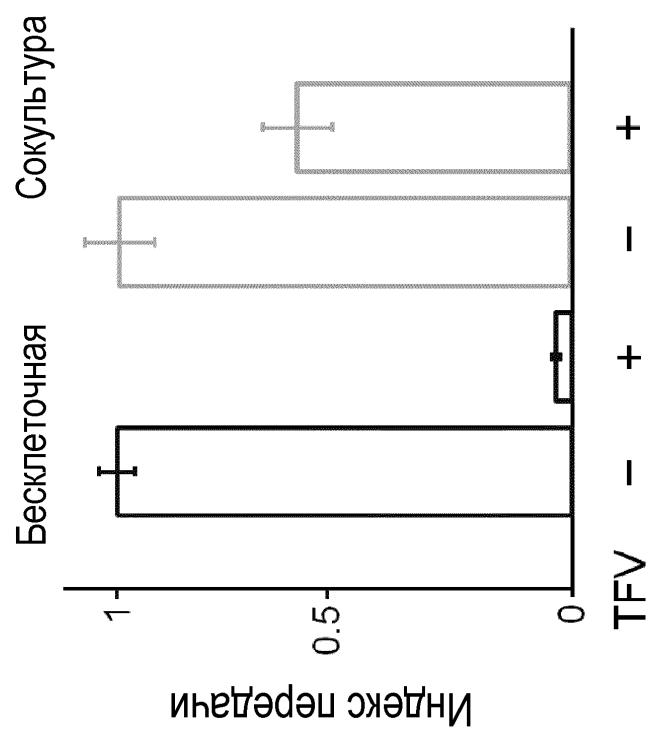
13/36

ФИГ.13



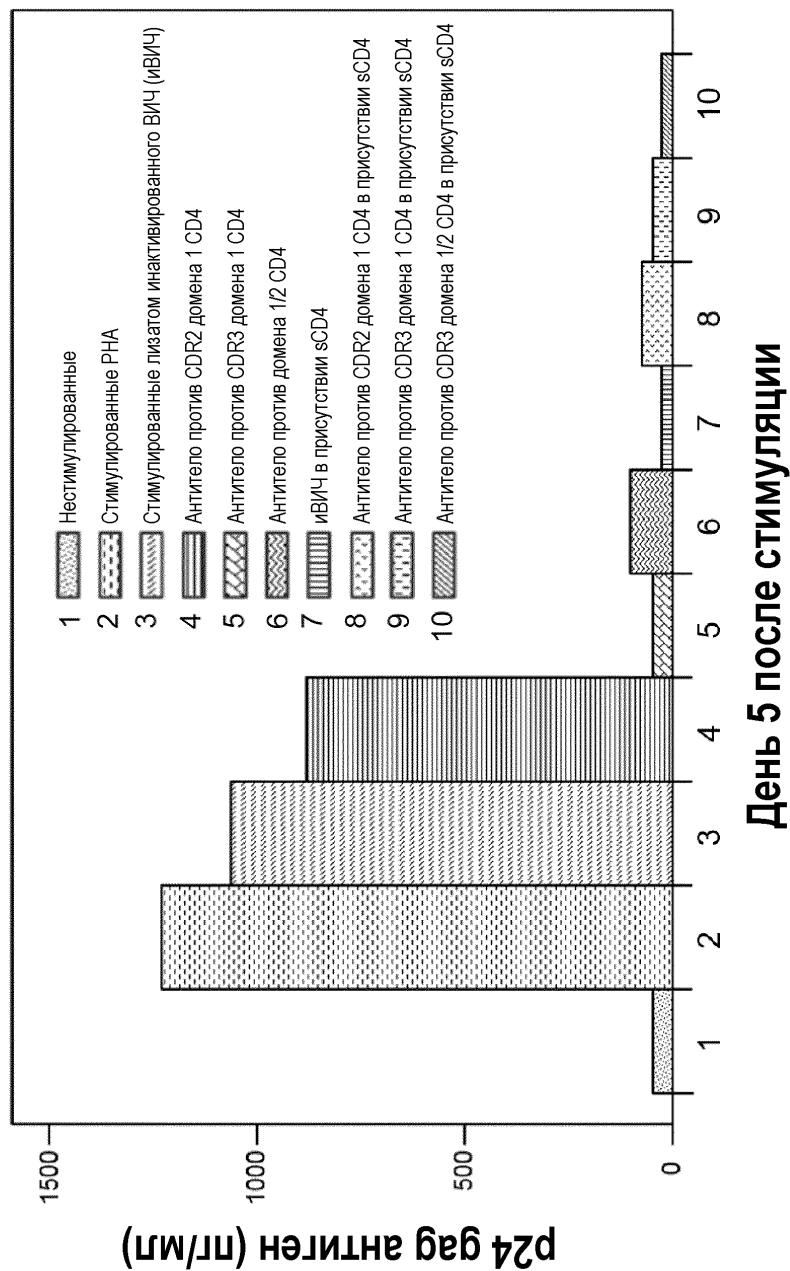
14/36

ФИГ.14



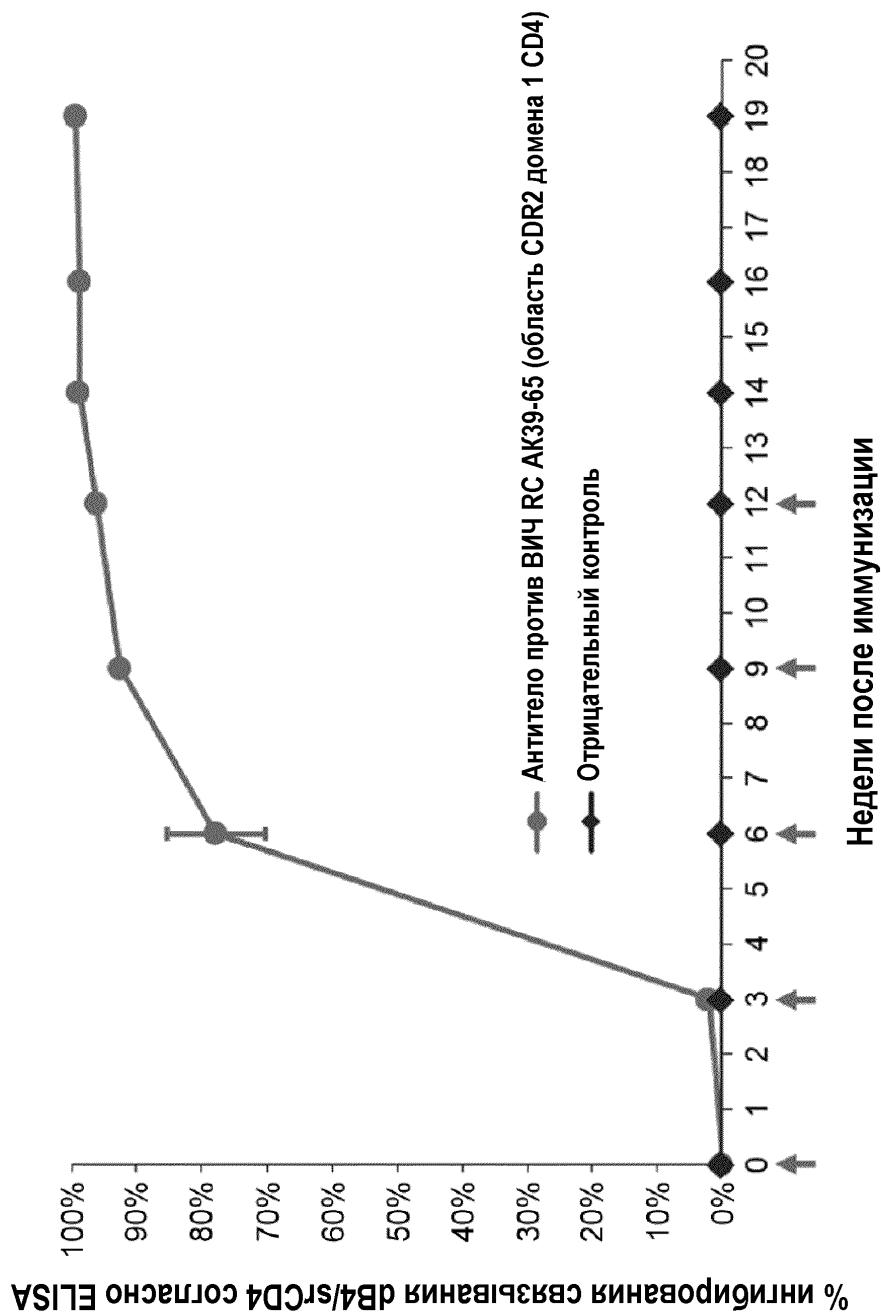
МКПК с различными источниками инфекции в
присутствии (+) или в отсутствие (-) тенофовира

15/36

ФИГ.15

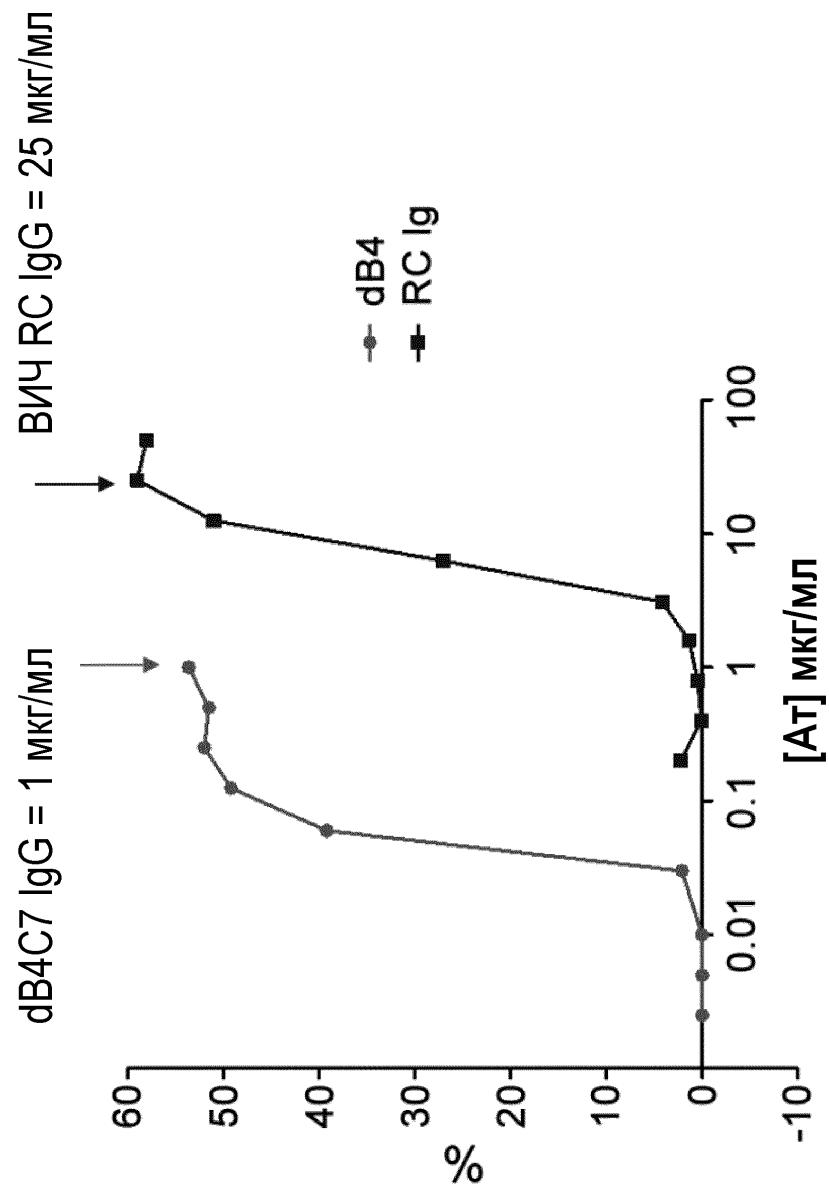
16/36

ФИГ.16

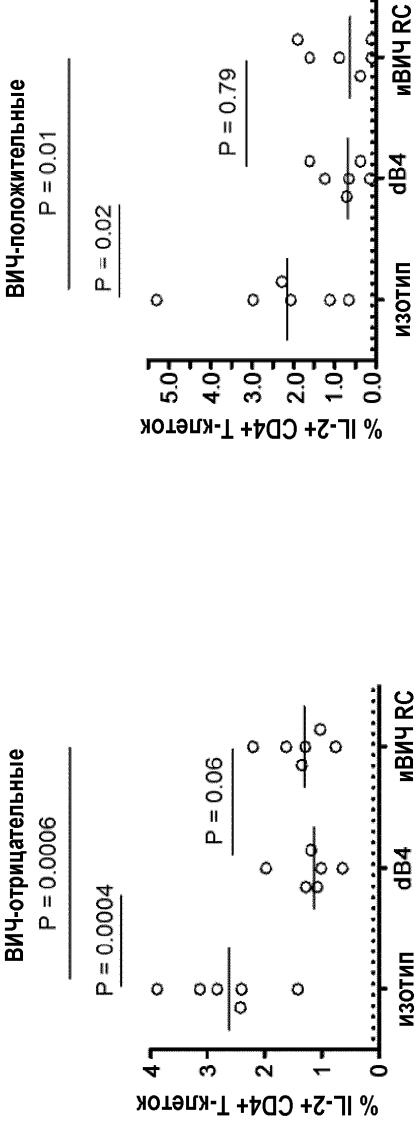
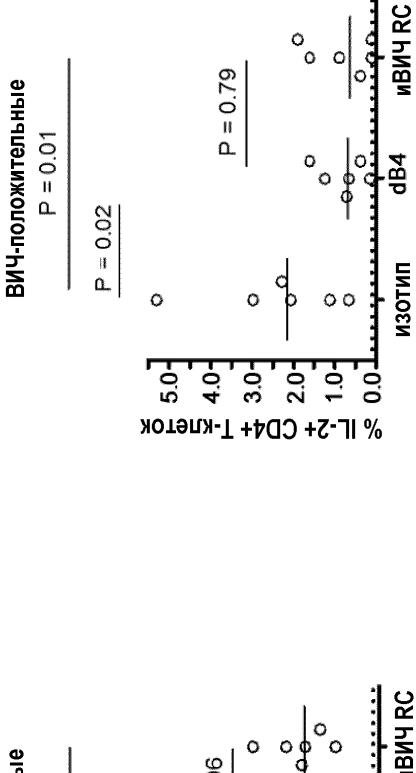
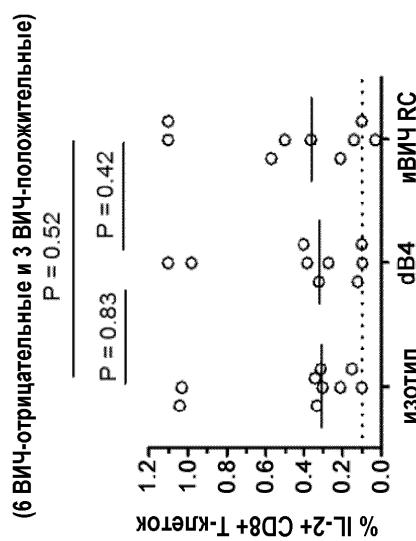


17/36

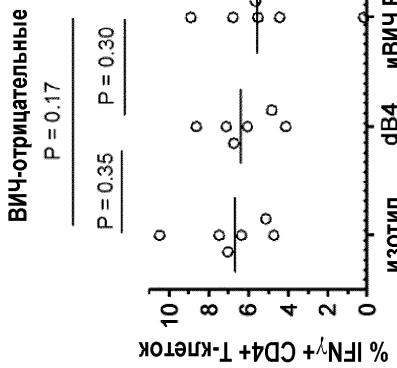
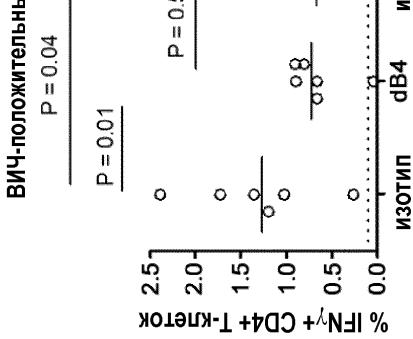
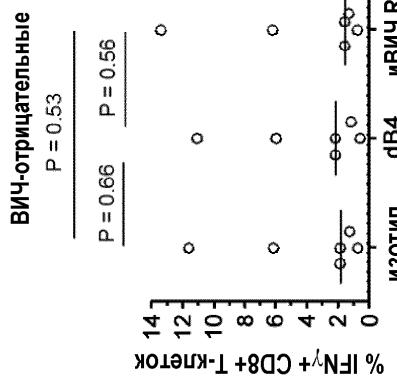
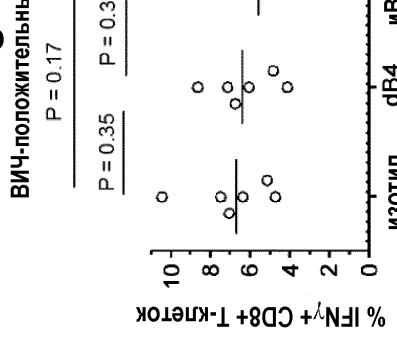
ФИГ.17



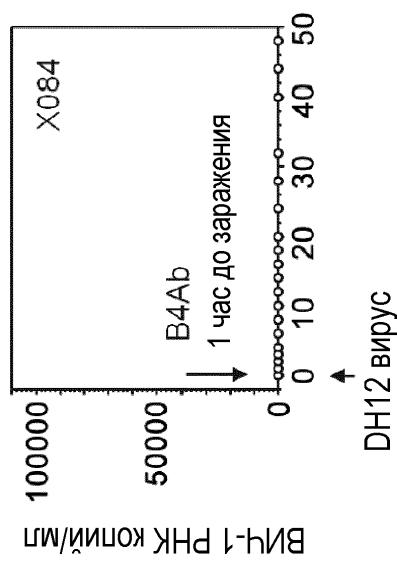
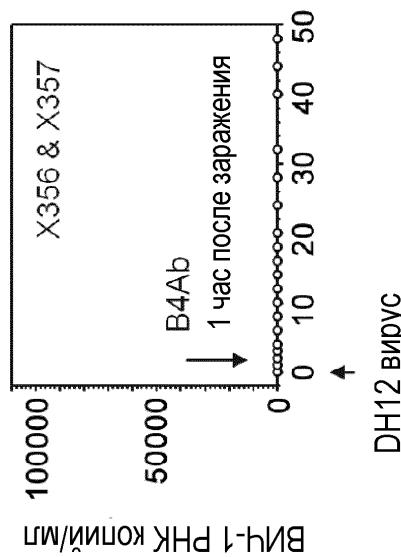
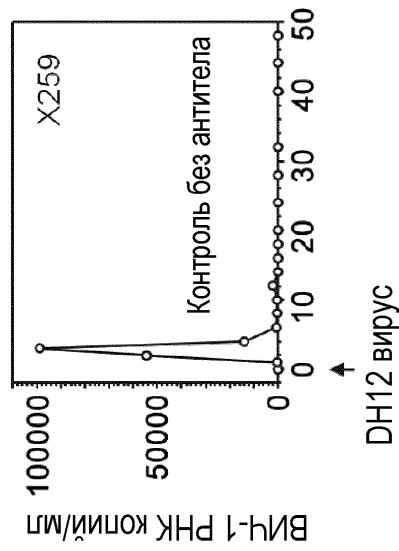
18/36

ФИГ. 18а**ФИГ. 18б****ФИГ. 18с**

19/36

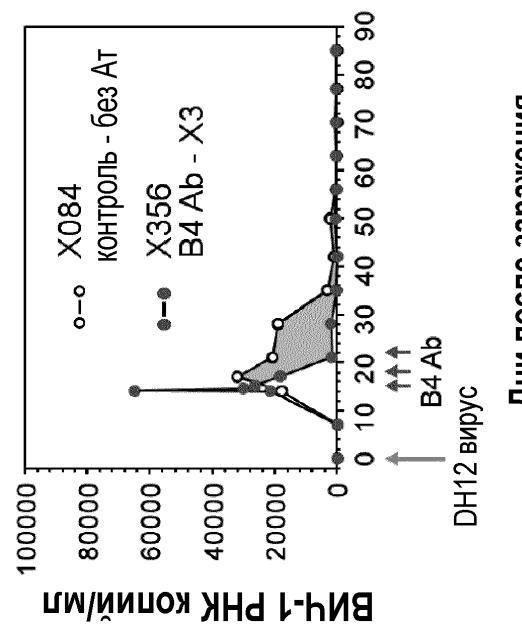
ФИГ. 18d**ФИГ. 18e****ФИГ. 18f****ФИГ. 18g**

20/36

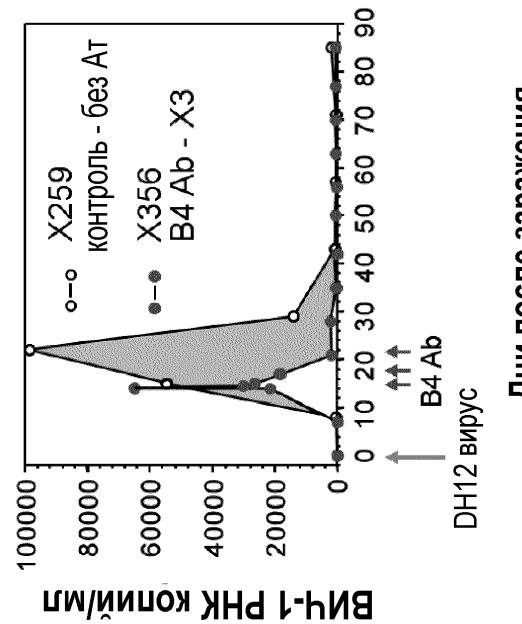
ФИГ.19а**ФИГ.19б****ФИГ.19с**

21/36

ФИГ.20а

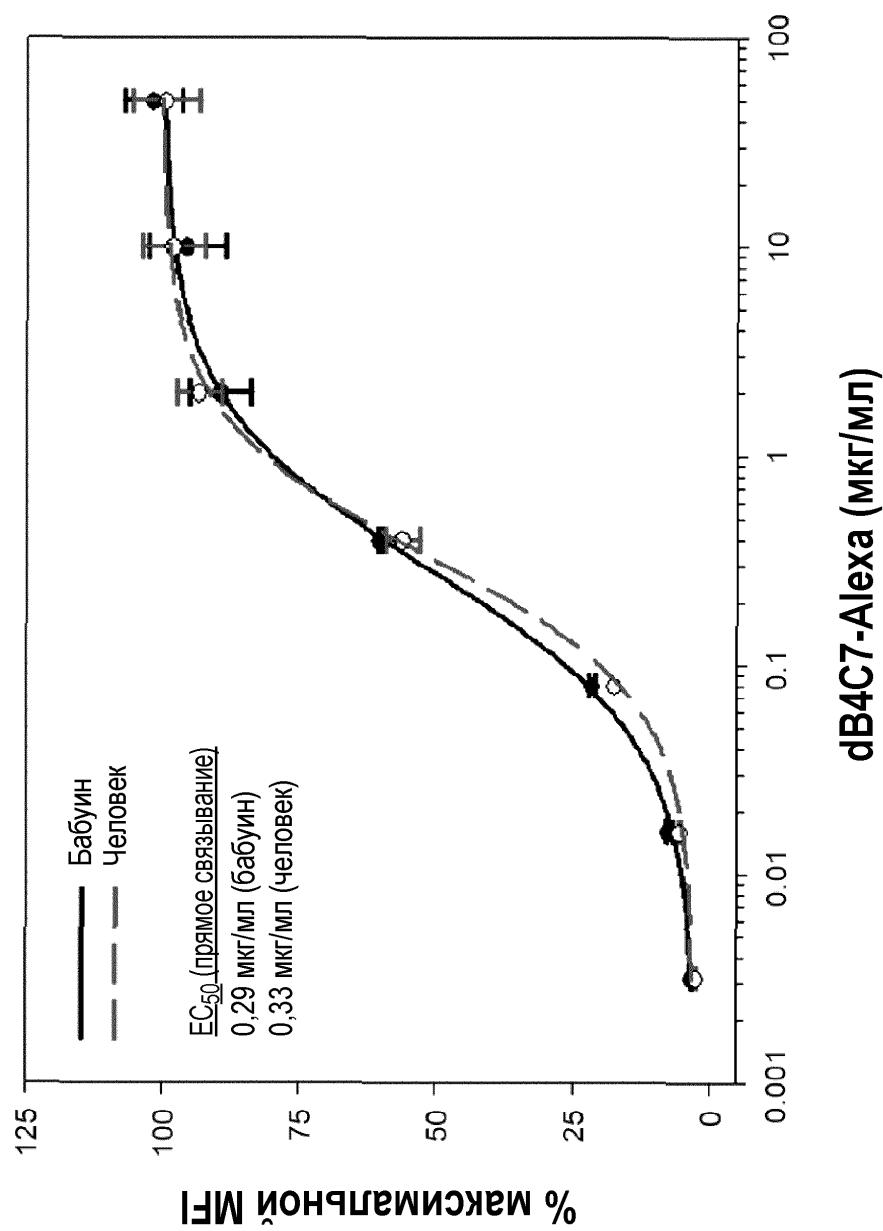


ФИГ.20б



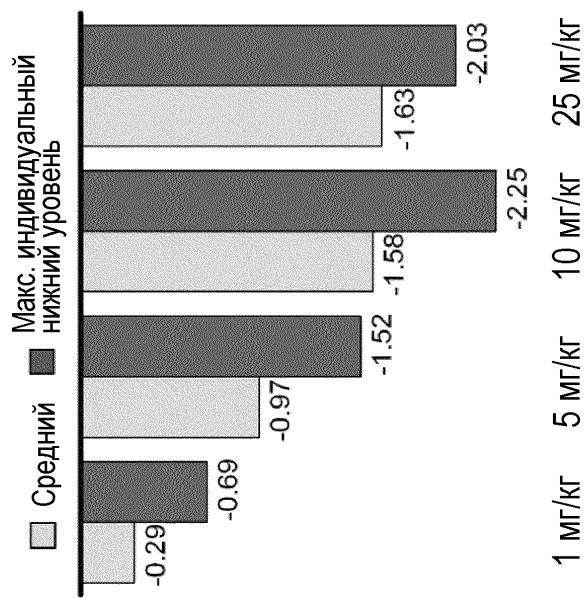
22/36

ФИГ.21

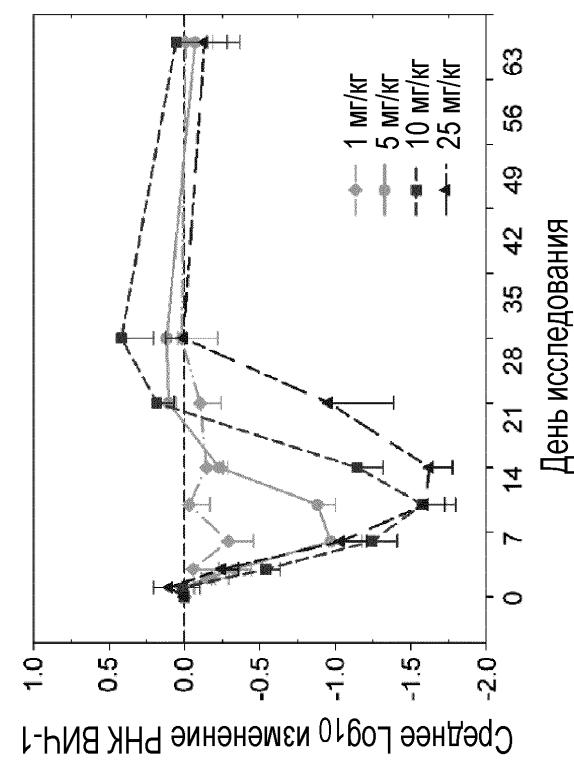


23/36

ФИГ.22б

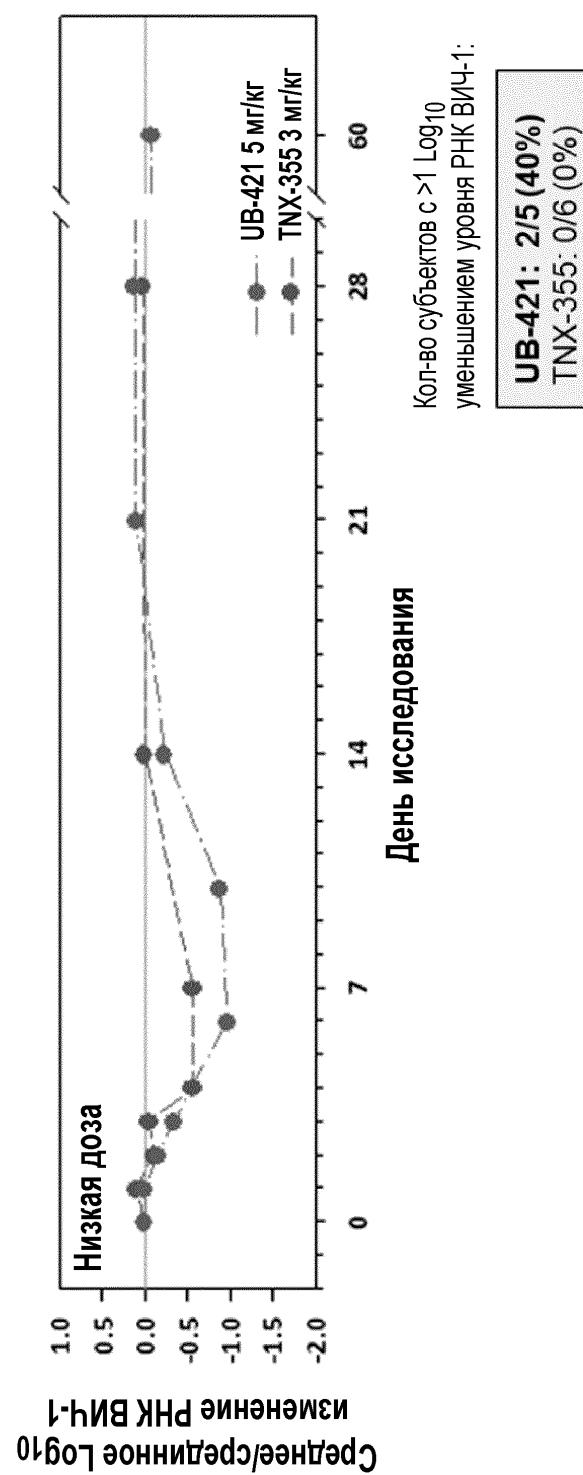


ФИГ.22а



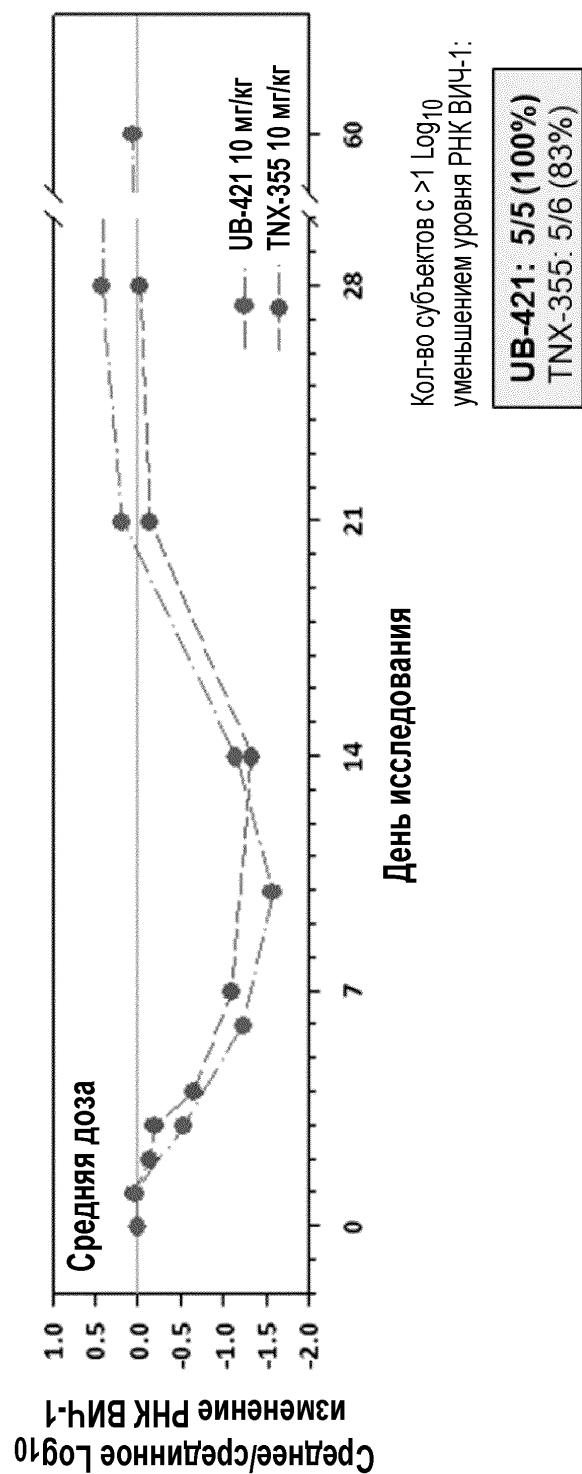
24/36

ФИГ.23а

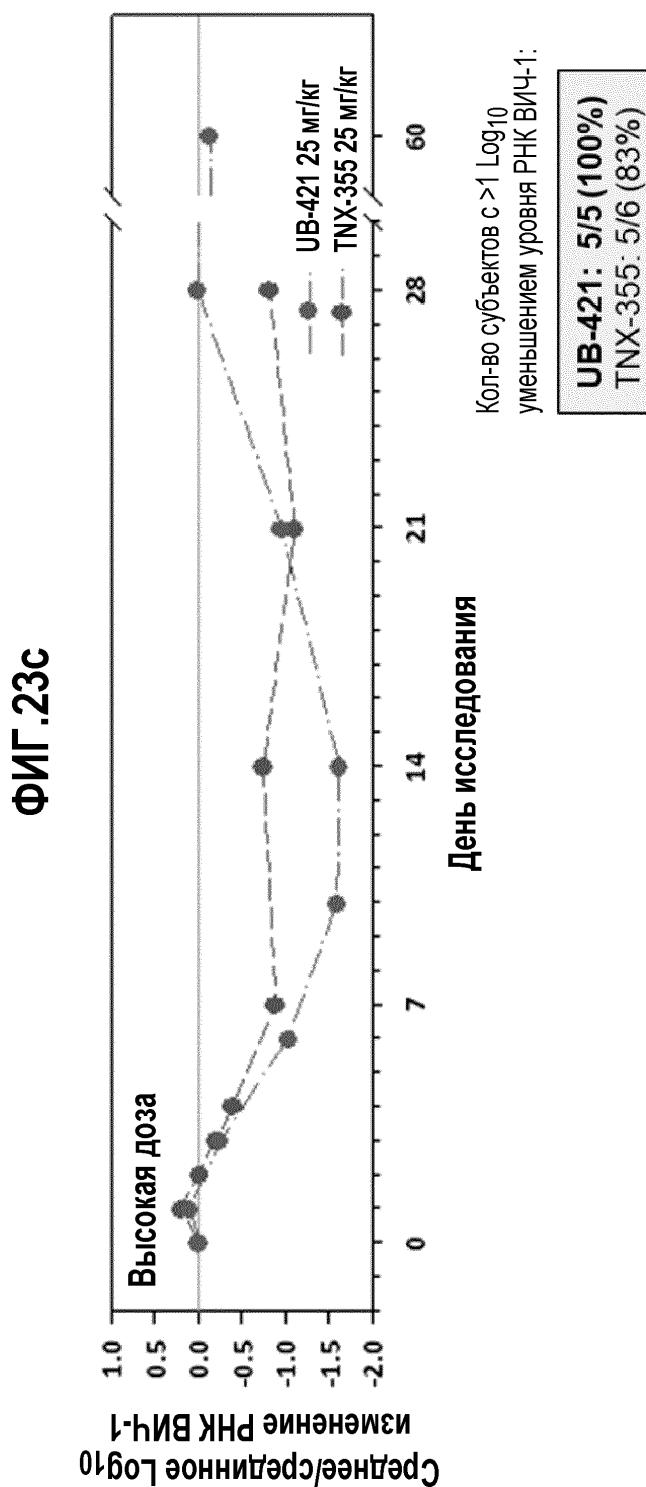


25/36

ФИГ. 23б

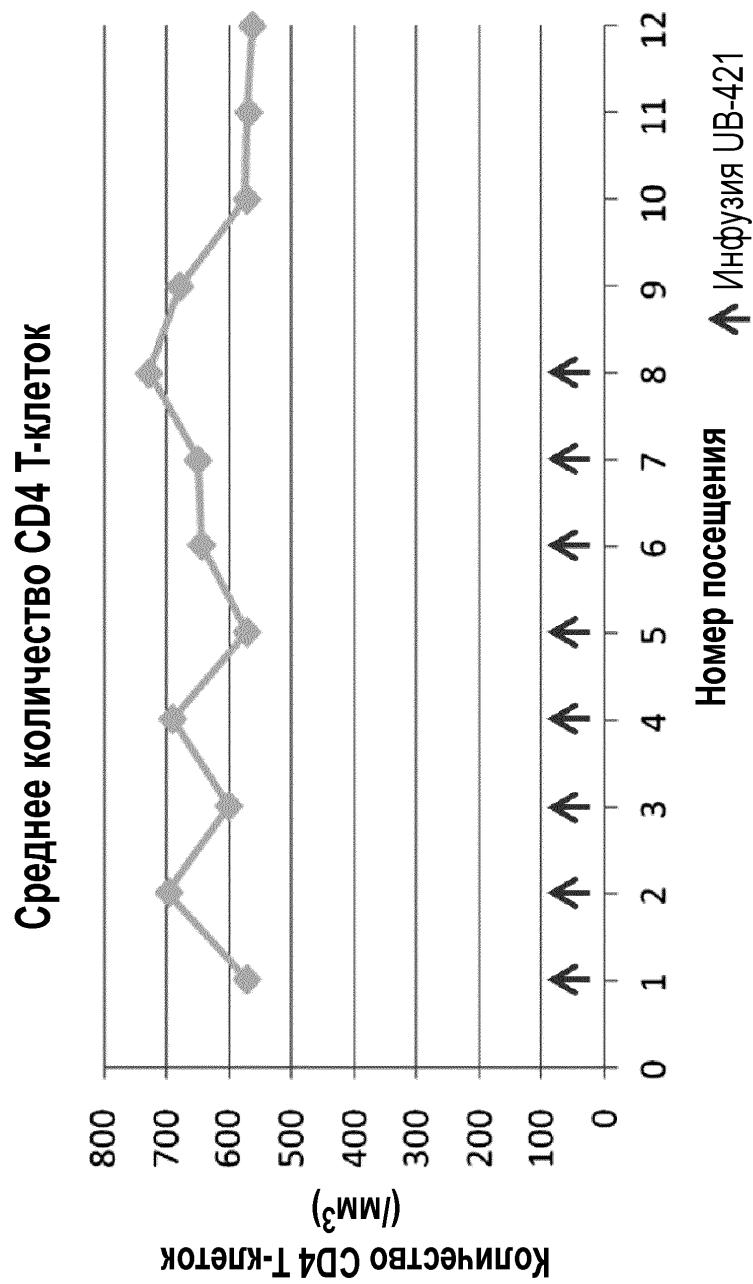


26/36



27/36

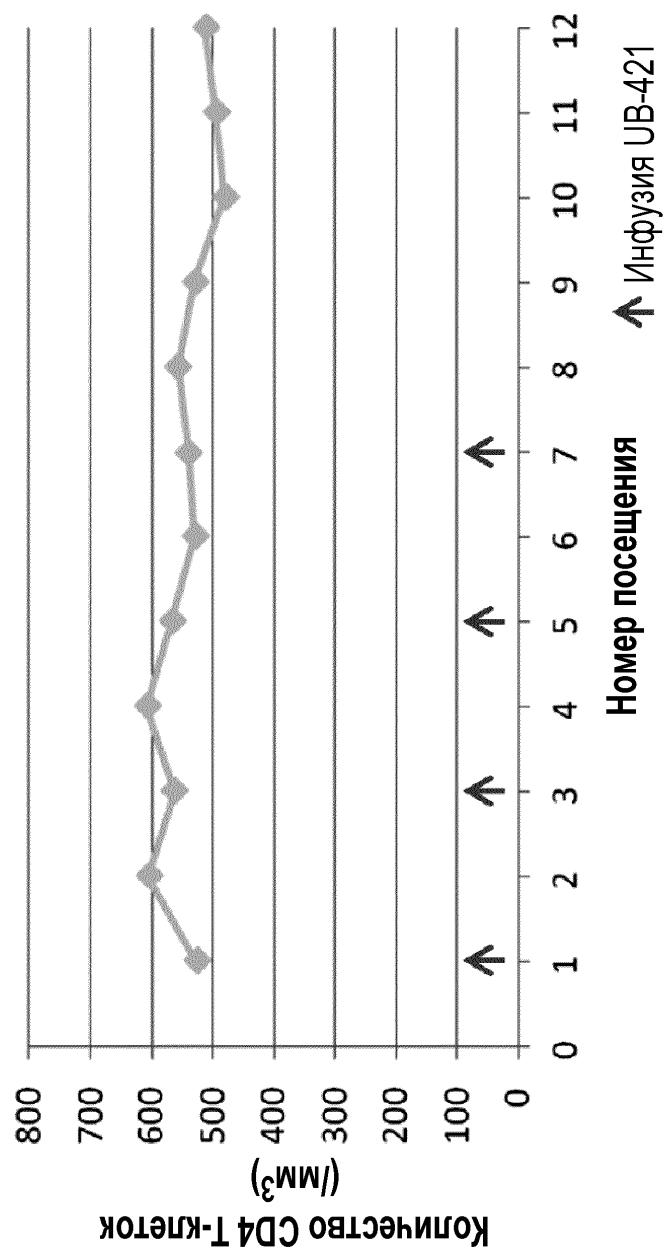
ФИГ.24а



28/36

ФИГ. 24б

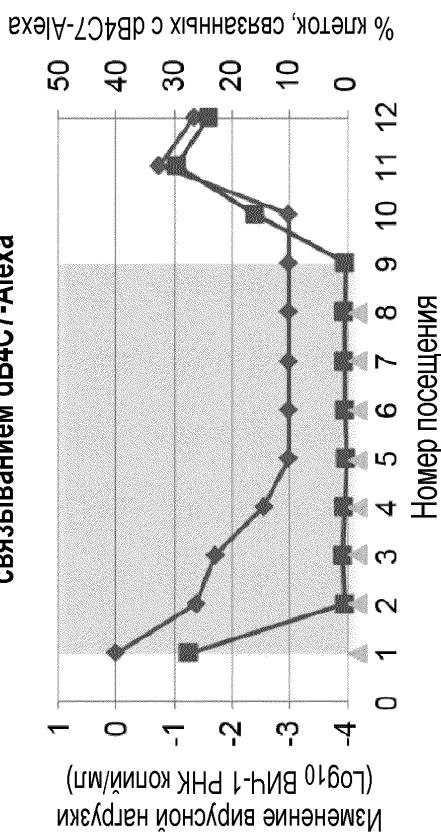
Среднее количество CD4 Т-клеток



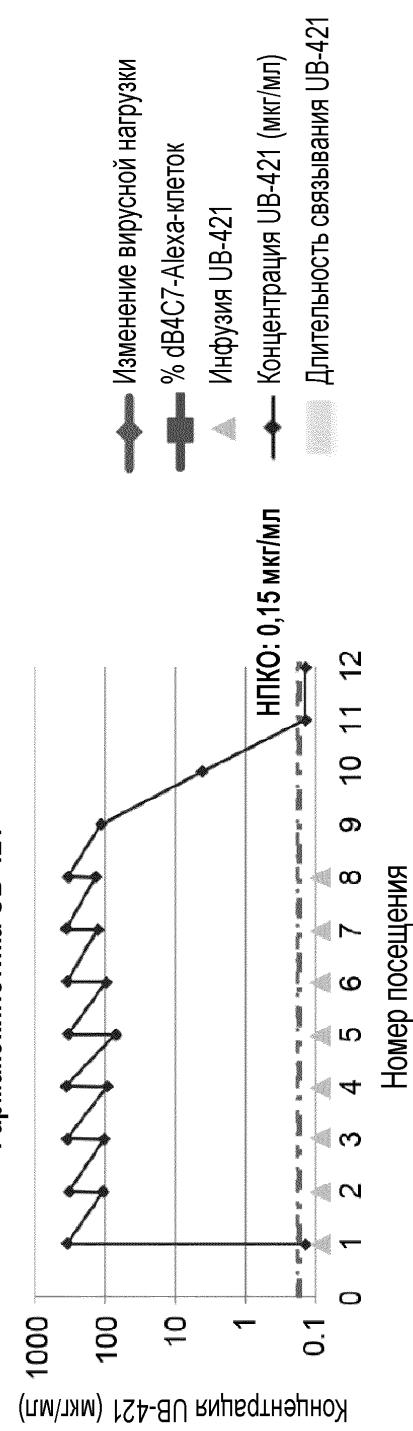
29/36

ФИГ. 25а

Снижение вирусной нагрузки в сравнении со связыванием dB4C7-Alexa

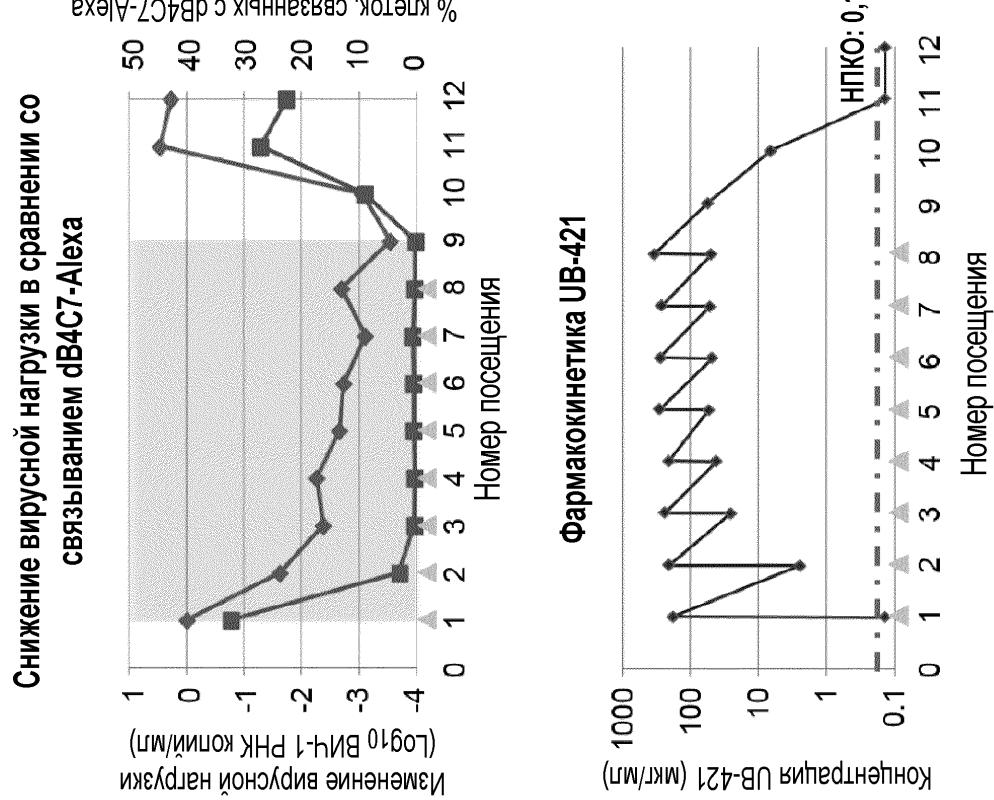


Фармакокинетика UB-421



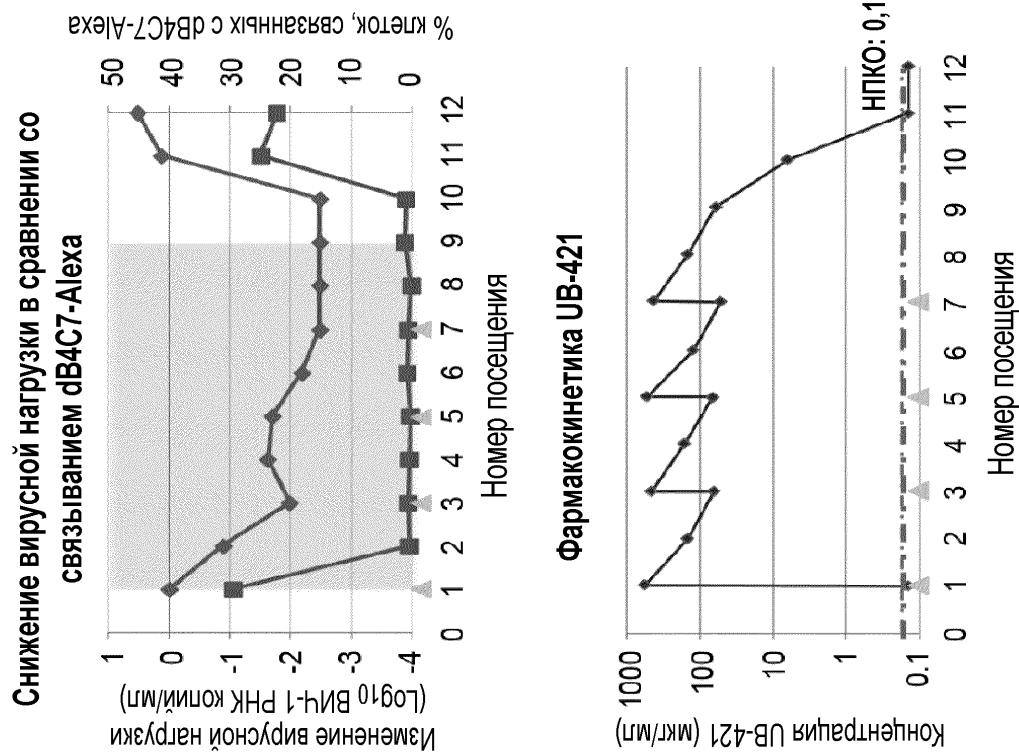
30/36

ФИГ. 25б



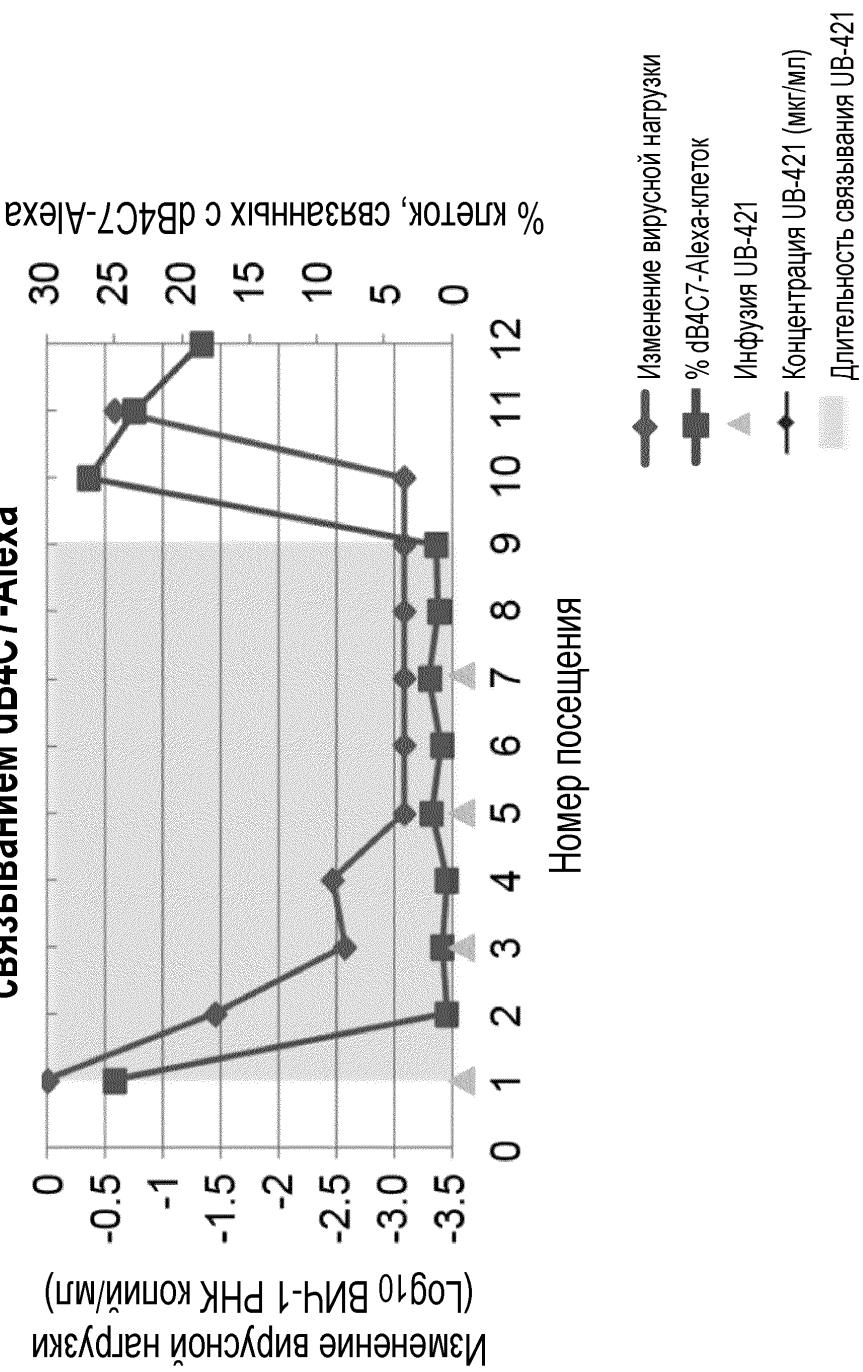
31/36

ФИГ.25с



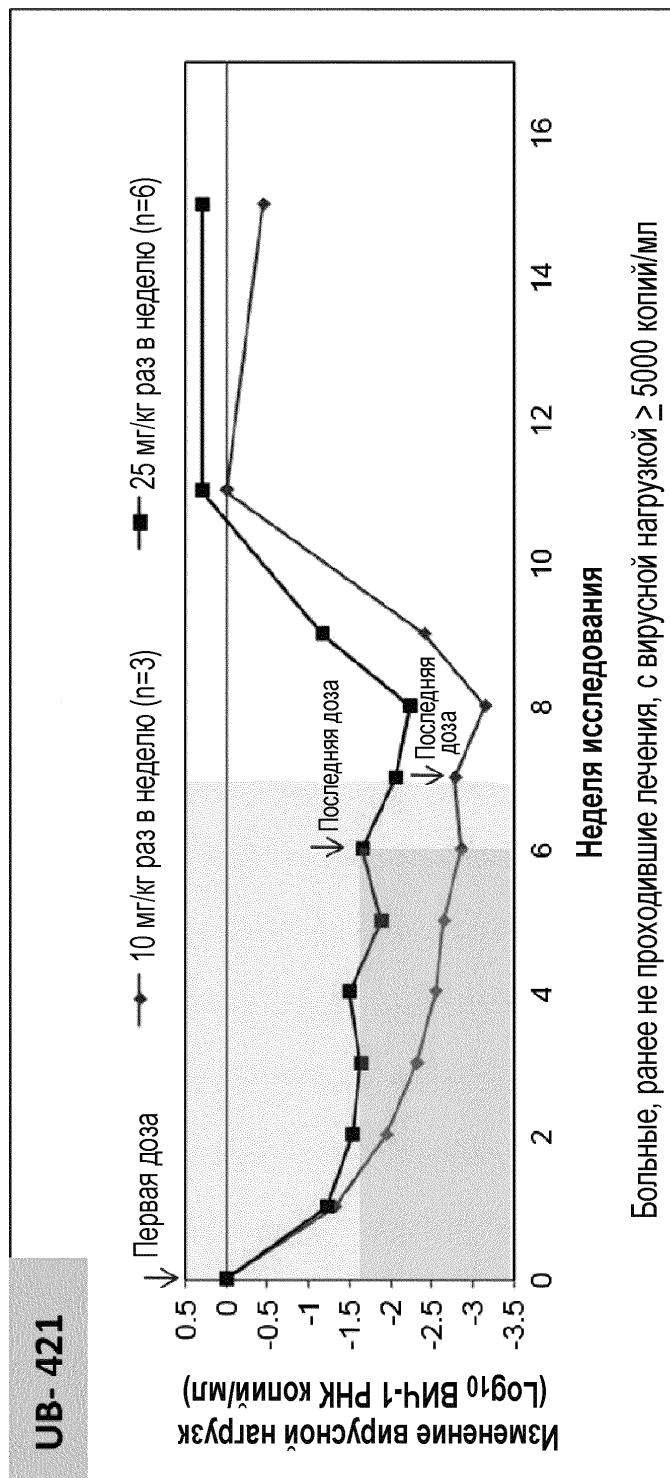
32/36

ФИГ. 25d
Снижение вирусной нагрузки в сравнении со связыванием dB4C7-Alexa

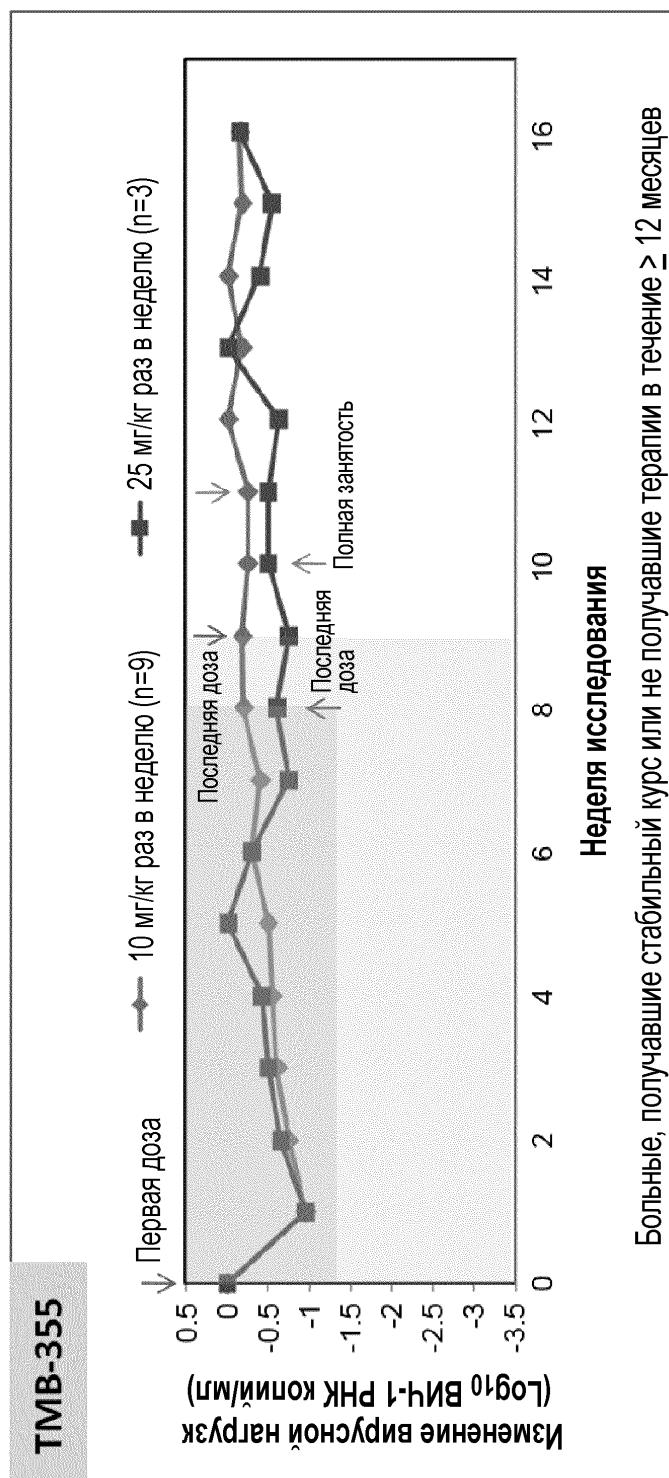


33/36

ФИГ.26а



34/36

ФИГ.26б

ФИГ.27

Монотерапия UB-421 в качестве замещающей ВААРТ терапии

Схема 1 (10 мг/кг UB-421 раз в неделю, в течение 8 недель, примерно 10 субъектов)

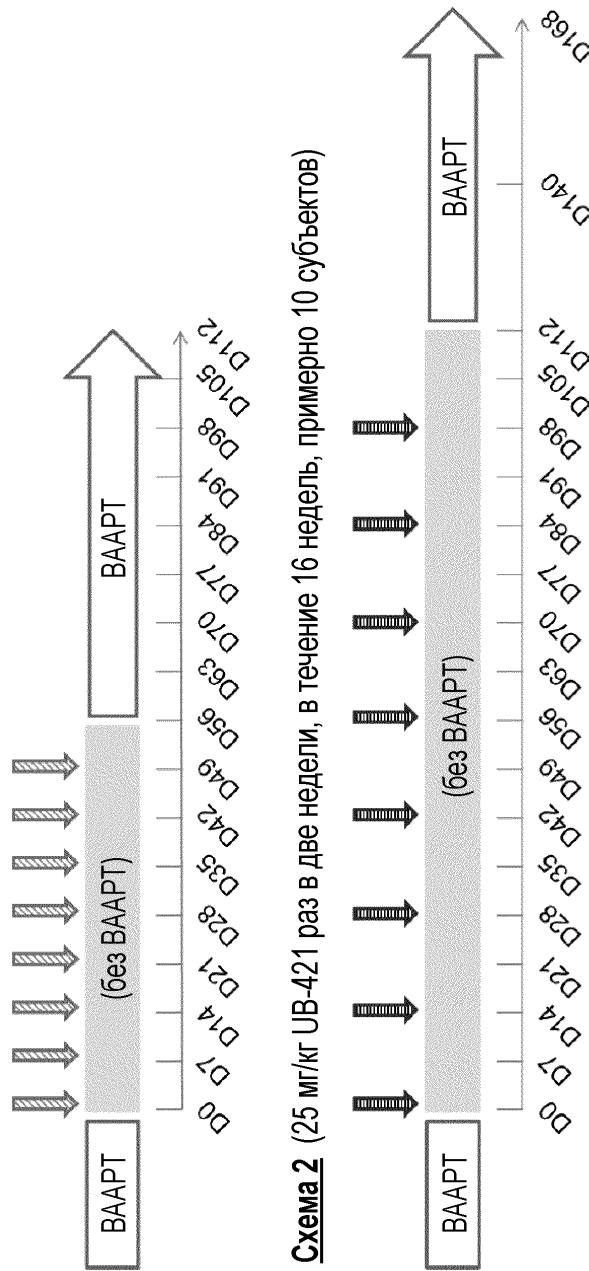
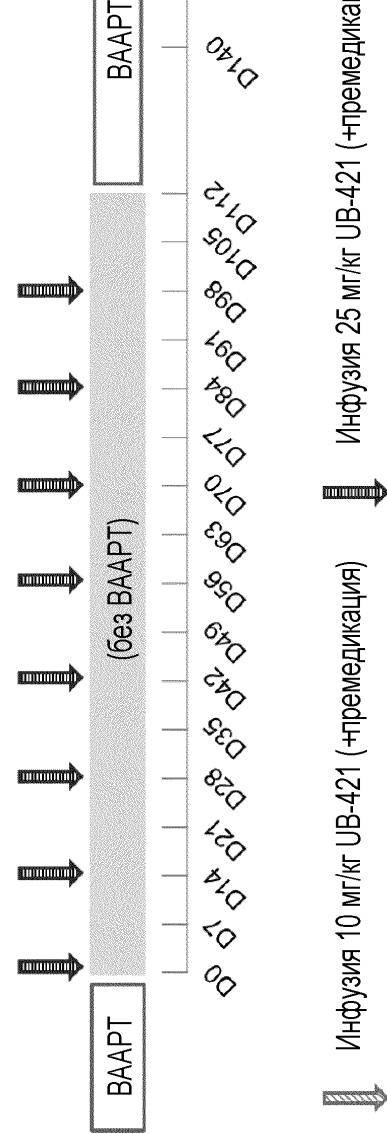


Схема 2 (25 мг/кг UB-421 раз в две недели, в течение 16 недель, примерно 10 субъектов)



36/36

ФИГ.28**Комбинация UB-421 и ВААРТ для функционального излечения ВИЧ-инфекции**