



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011117293/10, 31.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.08.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

29.09.2008 GB 0817810.5;

29.09.2008 GB 0817811.3;

29.09.2008 GB 0817809.7;

10.03.2009 EP PCT/EP2009/052811;

10.03.2009 EP PCT/EP2009/052809;

10.03.2009 EP PCT/EP2009/052810

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2012 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 20.10.2014 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: EP1460088 A1, 22.09.2004. (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 29.04.2011(86) Заявка РСТ:  
EP 2009/061210 (31.08.2009)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2010/034590 (01.04.2010)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

ОСТЕРРОТ Франк (DE),

АЙГНЕР Зильке (DE),

УЭРЕК Кристоф (DE),

ВАРТЕНБЕРГ-ДЕМАНД Андреа (DE),

РУДНЕВ Анатолий (DE),

ЗОЛЬДАН Михаэль (DE),

БРЮХЕР Кристоф (DE),

ДЕЛКЕН Бенжамин (DE),

ЦУБЕР Шанталь (DE),

ШУЛЬЦ Грегор (DE),

ЧЕЛОТ Никлас (DE)

(73) Патентообладатель(и):

БИОТЕСТ АГ (DE)

## (54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и представляет собой фармацевтическую комбинацию для лечения ревматического заболевания, содержащую гуманизированное анти-CD4 антитело, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат. Настоящее изобретение также раскрывает набор и способы лечения

ревматического заболевания с использованием указанной фармацевтической комбинации и указанного набора. Изобретение позволяет осуществлять более эффективные способы лечения ревматических заболеваний, в том числе ревматоидного артрита. 6 н. и 51 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл., 2 пр.

(30) (продолжение):

10.03.2009 PCT/EP2009/052809 EP;

(56) (продолжение):

SOUNDARARJAN D., ET AL., Clinical and immunological effects of a primatized anti CD4 antibody used concomitantly with methotrexate in rheumatoid arthritis, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1997, vol.99, N1, part 2, page S193. . LUGGEN M.E., ET AL., Results of a phase II, double-blind, randomized study of a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (Clenoliximab) given in combination with methotrexate (MTX) in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis (RA), Annals of the rheumatic diseases, 01.07.2003, vol.62, no.Suppl.1, p.99. . SOUNDARARJAN D., ET AL., Clinical and immunological effects of a primatized anti CD4 antibody used concomitantly with methotrexate in rheumatoid arthritis, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1997, vol.99, N1, part 2, page S193. . CHOY E.H., ET AL., Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical effects of a humanized IgG1 anti-CD4 monoclonal antibody in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients, Rheumatology, 01.10.2000, p.1139-1146.. RU 2316337 C2, 10.02.2008.

R U 2 5 3 1 5 4 8 C 2

R U 2 5 3 1 5 4 8 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 19/02* (2006.01)*A61P 37/02* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011117293/10, 31.08.2009**(24) Effective date for property rights:  
**31.08.2009**

Priority:

(30) Convention priority:

**29.09.2008 GB 0817810.5;****29.09.2008 GB 0817811.3;****29.09.2008 GB 0817809.7;****10.03.2009 EP PCT/EP2009/052811;****10.03.2009 EP PCT/EP2009/052809;****10.03.2009 EP PCT/EP2009/052810**(43) Application published: **10.11.2012 Bull. № 31**(45) Date of publication: **20.10.2014 Bull. № 29**(85) Commencement of national phase: **29.04.2011**

(86) PCT application:

**EP 2009/061210 (31.08.2009)**

(87) PCT publication:

**WO 2010/034590 (01.04.2010)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**OSTERROT Frank (DE),****AJGNER Zil'ke (DE),****UEhREK Kristof (DE),****VARTENBERG-DEMAND Andrea (DE),****RUDNEV Anatolij (DE),****ZOL'DAN Mikhaehl' (DE),****BRJuKhER Kristof (DE),****DELKEN Benzhamin (DE),****TsUBER Shantal' (DE),****ShUL'Ts Gregor (DE),****ChELOT Niklas (DE)**

(73) Proprietor(s):

**BIOTEST AG (DE)**(54) **COMPOSITION FOR TREATING DISEASE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention refers to biotechnology and represents a pharmaceutical composition applicable for treating a rheumatic disease and containing the humanised anti-CD4 antibody able to activate CD4+CD25+ regulatory T-cells, and methotrexat. The present invention also discloses a kit

and a method of treating the rheumatic disease with using the above pharmaceutical combination and the above kit.

EFFECT: invention enables implementing more effective methods of treating the rheumatic diseases, including rheumatoid arthritis.

57 cl, 8 dwg, 2 tbl, 2 ex

(30) Convention priority:

**10.03.2009 PCT/EP2009/052809 EP;****10.03.2009 PCT/EP2009/052810 EP**

Настоящее изобретение связано с лечением ревматических заболеваний. Изобретение включает высокоэффективную фармацевтическую композицию, содержащую средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, такое как гуманизированное моноклональное антитело, и лекарственное средство метотрексат. Композиция и наборы изобретения являются особенно эффективными при лечении ревматоидного артрита. Изобретение предусматривает фармацевтические композиции или наборы, содержащие средство и метотрексат, а также применения и способы лечения с использованием композиции и наборов.

Ревматические заболевания представляют собой группу заболеваний, поражающих соединительную ткань, особенно, суставы и относящиеся к ним структуры, и характеризуются воспалением, дегенерацией или метаболическим нарушением. Примерами ревматических заболеваний являются ревматоидный артрит, псориатический артрит, ювенильный ревматоидный артрит и анкилозирующий спондилит.

Ревматоидный артрит представляет собой аутоиммунное заболевание, которое вызывает хроническое воспаление суставов и окружающих тканей и может также поражать другие ткани и органы организма. Заболевание происходит, когда Т-клетки, которые в норме являются толерантными по отношению к аутологической ткани, распознают “собственные” молекулы и взаимодействуют с ними, то есть молекулами, вырабатываемыми клетками хозяина. Активация “аутореактивных” Т-клеток посредством представления аутоантигенов, обрабатываемых антиген-представляющими клетками (APC), приводит к их клональной экспансии и миграции в конкретные ткани, где они индуцируют воспаление и разрушение ткани.

Существует широкий диапазон терапий для лечения ревматоидного артрита, которые являются доступными в настоящее время, включающих лекарственные средства первой линии для снятия боли и воспаления, классифицируемые как нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID), например аспирин, ибупрофен, напроксен и т.д. Вторичное лечение артрита включает кортикостероиды (например, преднизон и дексаметазон), которые представляют собой синтетические версии гормона кортизона в организме, медленно действующие противоревматические лекарственные средства (SAARD) или модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства (DMARD), например гидроксихлорохин, сульфасалазин, метотрексат, пенициллинамин, циклофосфамид, соли золота, азотиоприн, лефлуномид и т.д.

Лечение многих пациентов с вновь диагностируемым RA начинают с DMARD, таким как метотрексат (MTX). MTX (4-амино-N10-метилптероилглутаминовая кислота) является аналогом фолиевой кислоты, который, как известно, препятствует выработке формы фолиевой кислоты, важной для активно растущих клеток, таких как клетки, обнаруженные в коже, крови, тканях желудочно-кишечного тракта, и клетки, вовлеченные в иммунную систему. До конца непонятно, как MTX снижает тяжесть RA, однако полагают, что он имеет значение для противовоспалительного действия, и были предложены разнообразные фармакологические механизмы его действия, включающие ингибирование синтеза пуринов, инициацию высвобождения аденозина, ингибирование выработки провоспалительных цитокинов и модуляцию воспаления (Swierkot et al., 2006). Также известно, что MTX ингибирует, например, активность фермента дигидрофолатредуктазы (DHFR) и также взаимодействует с некоторыми другими ферментами.

Еще одну группу лекарственных средств для лечения RA именуют как модификаторы биологического ответа (BRM), которые включают моноклональные антитела. Их примерами являются антагонисты фактора некроза опухолей-альфа (TNF-альфа), такие

как адалимумаб, инфликсимаб и этанерцепт, которые осуществляют свое действие посредством связывания с рецептором TNF-альфа или непосредственно связываясь с самим белком TNF-альфа. Некоторые ингибиторы TNF-альфа были разрешены FDA для лечения ревматоидного артрита, включая адалимумаб (Humira®), Инфликсимаб (Remicade®) и Этанерцепт (Enbrel®). TNF-альфа представляет собой ключевой медиатор при ревматоидном артрите, и он, в основном, продуцируется активированными макрофагами в синовиальной ткани пациентов с РА. Действуя в качестве провоспалительного цитокина, TNF-альфа в большом количестве присутствует в синовиальной ткани пациентов с РА. Он индуцирует выработку и высвобождение хемокинов, которые привлекают лейкоциты из крови в воспаленную ткань (Tracey et al., 2008). Кроме опосредования синовиального воспаления, TNF-альфа вовлечен в разрушение суставов и деградацию хрящевой ткани. Дополнительно, он обладает способностью к ингибированию супрессивной активности CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (Andersson et al., 2008).

В некоторых случаях пациентов с РА подвергают лечению комбинацией лекарственных средств, обсуждаемых выше. В частности, DMARD часто применяют в качестве первого лечения. Однако у пациентов, где контроль над заболеванием не достигнут, может быть желательным использовать их в комбинации с терапиями, которые были разрешены к применению совсем недавно, таких как биологические средства, например антагонисты TNF-альфа. Сообщалось, что комбинация MTX с некоторыми моноклональными антителами (этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб и анакирина) приводит к лучшей терапевтической эффективности по сравнению с терапией одним MTX (Swierkot et al., 2006). Однако MTX проявляет разнообразные фармакологические действия и его клинические эффекты могут быть отнесены к множеству целей (Wessels et al., 2008). Соответственно, нельзя легко предсказать, как MTX будет воздействовать на терапевтическую активность, и, следовательно, эффективность лекарственного средства, которое является эффективным как единственное средство.

Несмотря на диапазон доступных в настоящее время лекарственных средств, не все пациенты хорошо реагируют на указанные выше терапии, и существует ряд неблагоприятных побочных эффектов. Например, лечение TNF-альфа подавляет иммунную систему, делая пациентов, проходящих лечение, более подверженными инфекциям и заболеванию. Соответственно, все еще существует необходимость в развитии альтернативных терапий.

В целом, принято считать, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки играют основную роль в инициации и поддержании аутоиммунитета. Соответственно, было предложено применять моноклональные антитела (mAb) против молекул поверхности CD4<sup>+</sup> Т-клеток, и, в частности, анти-CD4 mAb, в качестве иммуносупрессивных средств при лечении заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

Один пример, находящийся на стадии дополнительных исследований, представляет собой анти-CD4 антитело B-F5 (мышинные IgG1 против человеческих CD4), которое тестировали при различных аутоиммунных заболеваниях. У пациентов с ревматоидным артритом результаты, наблюдаемые при испытании с плацебо-контролем с суточной дозой B-F5, не показали значительного улучшения (Wendling et al. J Rheumatol; 25(8): 1457-61, 1998). Однако в WO 2004/083247, было разработано гуманизированное B-F5 (далее именуемое здесь как hB-F5 или BT061) антитело, имеющее сходные свойства связывания CD4 с родительским мышинным B-F5. Предварительная оценка эффекта гуманизированной версии мышинного B-F5 антитела у пациентов, также принимающих

нестероидное противовоспалительное лекарственное средство Диклофенак, предоставила указания на эффективную иммуносупрессию, отраженную положительным клиническим эффектом у пациентов, при использовании в 10-дневном курсе лечения.

Также описано исследование Wijdenes et al., в реферате и постере, представленных на конференции EULAR, Июнь 2005. Эти авторы описали лечение 11 пациентов, страдающих ревматоидным артритом, 5 внутривенными инфузиями по 5 мг hB-F5 через день с сопутствующим лечением 150 мг Диклофенака (Wijdenes et al., Реферат и постер, конференция EULAR, Июнь 2005).

В WO 2004/083247 было отмечено, что антитело обладало способностью к активации конкретной субпопуляции CD4+ Т-клеток, а именно CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток (Treg). Эти клетки составляют 5-10% от периферических CD4+ Т-клеток и при однократной стимуляции являются компетентными для подавления ответа CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, а также ингибирования активации В-клеток и клональной экспансии. Таким образом, эти клетки представляют важный уровень управления в иммунной системе. В частности, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg клетки вовлечены в поддержание иммунного гомеостаза на периферии и регуляцию аутоиммунитета и патогенных иммунных ответов.

Лечение ревматоидного артрита через механизм, который активирует CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки, представляет важное направление исследований, и применение hB-F5 средства на фазе II клинических испытаний на пациентах, страдающих ревматоидным артритом, обсуждается в Международных патентных заявках под номерами PCT/EP2009/052809, PCT/EP2009/052811 и PCT/EP2009/052810.

Однако невозможно с легкостью предсказать, может ли любой новый способ лечения успешно сочетаться с принятыми в настоящее время терапиями с получением благоприятного терапевтического эффекта. Как упомянуто выше, это конкретно относится к случаю с МТХ.

В нескольких исследованиях сообщалось о результатах, которые позволяют предположить, что МТХ обладает отрицательным воздействием на регуляторные Т-клетки, и, следовательно, вероятно, следует предотвращать использование МТХ в комбинационной терапии вместе со средством, действие которого основано на активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток для их терапевтического механизма. Wascher et al., (1994) и Herman et al., (2005) сообщают о результатах, которые позволяют предположить, что МТХ может снижать количество доступных Т-лимфоцитов. Wascher et al. сообщили, что введение высокой дозы МТХ, даваемого внутривенно, через 12 недель значительно ( $P < 0,01$ ) снижало общее количество периферических лимфоцитов крови и приводило к выраженному перераспределению субпопуляций лимфоцитов с предпочтительным подавлением В-лимфоцитов ( $P < 0,005$ ) и Т-лимфоцитов ( $P < 0,05$ ). Herman et al., 2005, сообщили о эффекте МТХ на индуцирование апоптоза в Т-лимфоцитах *in vitro*, при концентрациях, отражающих низкодозовую терапию пациентов с РА (7,5 мг).

Дополнительно, в исследовании *in vitro*, проведенном Porter et al., 2006, сообщалось о влиянии МТХ на жизнеспособность регуляторных Т-клеток. При концентрациях *in vitro*, равных 50 нМ (наивысшая анализируемая концентрация) супрессорная активность Treg клеток значительно снижалась от 94% до 88% ( $p < 0,05$ ). Этот факт позволяет предположить, что присутствие МТХ может ингибировать подавление Treg.

Еще дополнительно, Yamaguchi et al., 2007, сообщали, что природные Treg клетки конститутивно экспрессируют высокие количества фолатного рецептора 4 (FR4). Так как МТХ является аналогом фолата, предполагают, что МТХ может также поглощаться Treg клетками. Такое поглощение, вероятно, приводит к вмешательству в метаболизм

в данной клеточной популяции.

Кроме того, известно, что на терапевтическую активность многих антител оказывают влияние Fc рецепторы на клетках, экспрессирующих Fc рецептор. Для некоторых антител даже является необходимым связаться с Fc рецепторами на клетках, экспрессирующих Fc рецептор, чтобы быть активными. Однако известно, что терапия MTX приводит к уменьшению экспрессии Fc гамма R1 на моноцитах (Wijngaarden et al., 2004, 2005) *in vivo*. Подавляющее влияние MTX на экспрессию Fc рецептора на моноцитах было также продемонстрировано у пациентов, которые проходили лечение MTX и терапевтическим антителом анти-TNF-альфа Инфликсимаб (Wijngaarden et al., 2008). В результате, в целом, считают, что MTX отрицательно влияет на активность антител, связывающихся с Fc рецептором. Соответственно, ожидается, что MTX будет отрицательно влиять на способность антитела к активации Treg.

С учетом вышесказанного, ожидают, что MTX будет иметь отрицательное воздействие на терапевтическую способность средства, которое действует через активацию CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, таких как hB-F5. По существу, очевидно, что клинический результат подходов, связанных с комбинационным лечением, не может быть предсказан.

Имеющая отношение к описанному выше уровню предшествующего уровня техники задача настоящего изобретения состоит в дополнительной разработке и улучшении фармацевтических композиций для лечения ревматоидного артрита.

Соответственно, настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат. Настоящее изобретение дополнительно предоставляет набор, содержащий отдельно средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, с метотрексатом, обладает терапевтическим эффектом и является на удивление более эффективной по отношению к снижению количеству относящихся к антителу побочных эффектов. Данная комбинация также является на удивление более эффективной в плане скорости, при которой достигается высокий уровень терапевтического эффекта.

Соответственно, настоящее изобретение также предоставляет способ лечения ревматического заболевания у пациента, включающий стадию (a) введения средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и стадию (b) введения метотрексата, где стадия (a) и стадия (b) могут быть проведены одновременно, отдельно или последовательно и в любом порядке.

Дополнительно, настоящее изобретение предоставляет способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение метотрексатом, включающий стадию введения средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток. Альтернативно, настоящее изобретение предоставляет способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение средством, способным к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, включающий стадию введения метотрексата.

Еще дополнительно, настоящее изобретение предоставляет способ лечения ревматоидного артрита у пациента, который не реагирует на лечение модифицирующим заболеванием противоревматическим лекарственным средством (DMARD), включающий стадию (a) введения средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и стадию (b) введения метотрексата, где стадия (a) и стадия (b) могут быть проведены одновременно, отдельно или последовательно и в любом порядке.

В дополнение, настоящее изобретение предоставляет средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат в качестве комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в медицине. В одном аспекте, настоящее изобретение предоставляет средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат в качестве комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении ревматического заболевания. В альтернативном аспекте настоящее изобретение предоставляет средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток для применения при лечении ревматического заболевания у пациента, где пациент проходит лечение метотрексатом. В дополнительном альтернативном аспекте, настоящее изобретение предоставляет композицию, содержащую метотрексат, для применения при лечении ревматического заболевания у пациента, где пациент проходит лечение средством, способным к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток.

В еще дополнительном аспекте настоящее изобретение предоставляет средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат, в качестве комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении ревматического заболевания у пациента, который не реагирует на лечение модифицирующим заболевание противоревматическим лекарственным средством (DMARD).

Изобретение будет проиллюстрировано посредством только примера, со ссылкой на следующие фигуры, в которых:

Фиг.1 показывает результаты анализа пролиферации *in vitro*, проведенной с CD4+CD25+ регуляторными Т-клетками, взятыми от двух доноров (Эксп. 1 и Эксп. 2) в

Примере 1.

Фиг.2А и 2В показывают графики % пациентов, достигающих, по меньшей мере, балльной оценки ACR 20 при прохождении клинического испытания, описанного в Примере 2, по сравнению с пациентами в наиболее эффективных дозовых группах, о которых сообщается на фазе III испытаний, в публикации Keystone et al., (2004) и (2009).

График на Фиг.2В является скорректированным с учетом плацебо.

Фиг.3А и 3В показывают графики % пациентов, достигающих, по меньшей мере, балльной оценки ACR 50 при прохождении клинического испытания, описанного в Примере 2, по сравнению с пациентами в наиболее эффективных дозовых группах, о которых сообщается на фазе III испытаний, в публикации Keystone et al., (2004) и (2009).

График на Фиг.3В является скорректированным с учетом плацебо.

Фиг.4А и 4В показывают графики % пациентов, достигающих, по меньшей мере, балльной оценки ACR 70 при прохождении клинического испытания, описанного в Примере 2, по сравнению с пациентами в наиболее эффективных дозовых группах, о которых сообщается на фазе III испытаний, в публикации Keystone et al., (2004) и (2009).

График на Фиг.4В является скорректированным с учетом плацебо.

Фиг.5 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 3) фрагмента плазмиды, кодирующего V<sub>H</sub> область гуманизированного B-F5. Последовательность, кодирующая V область, подчеркнута, и соответствующая полипептидная последовательность (SEQ ID NO: 15) указана ниже нуклеотидной последовательности;

Фиг.6 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 4) фрагмента плазмиды, кодирующего V<sub>K</sub> области гуманизированного B-F5. Последовательность, кодирующая V область, подчеркнута, и соответствующая полипептидная последовательность (SEQ ID NO: 2) указана ниже нуклеотидной последовательности;



Фиг.7 показывает выравнивание полипептидных последовательностей мышиногo B-F5 V<sub>K</sub> (SEQ ID NO: 6), FK-001 (SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10), L4L (SEQ ID NO: 16) и L4M (SEQ ID NO: 2) в конструкции гуманизированной формы B-F5 (т.е. BT061).

Фиг.8 показывает выравнивание полипептидных последовательностей мышиногo B-F5 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 5), M26 (SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14), H37L (SEQ ID NO: 1) и H37V (SEQ ID NO: 15) в конструкции гуманизированной формы B-F5.

Как описано выше, настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат. Настоящее изобретение дополнительно предоставляет набор, содержащий отдельно средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат.

Средство, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат могут находиться в виде единственной готовой лекарственной формы или в отдельных готовых лекарственных формах. Готовые лекарственные формы могут состоять из средства и/или метотрексата. Альтернативно, готовые формы могут содержать средство и/или метотрексат и дополнительно содержать фармацевтически приемлемые компоненты, такие как носители или эксципиенты.

В одном аспекте изобретения средство и/или метотрексат приспособлены для парентерального введения, предпочтительно внутримышечного, внутривенного или подкожного введения. Наиболее предпочтительно, чтобы средство и/или метотрексат были пригодными для подкожного введения.

В одном варианте осуществления этого аспекта изобретения средство и/или метотрексат приспособлены для внутривенного введения и предоставлены в объеме дозировки от 0,5 до 500 мл или в форме для разведения до объема дозировки от 0,5 до 500 мл. В альтернативном варианте осуществления композиция является пригодной для подкожного или внутримышечного введения и предоставлена в объеме дозировки от 0,1 до 3 мл. Альтернативно, средство и/или метотрексат являются пригодными для предоставления объема дозировки от 0,5 до 1,5 мл или от 15 до 25 мл.

В альтернативном аспекте метотрексат приспособлен для перорального введения и может быть представлен в форме таблетки.

В дополнительных аспектах изобретения композиция или набор могут быть пригодными для применения в виде однократной дозы или пригодными для применения в виде части множества доз, в частности, когда доза должна вводиться еженедельно, однократно каждые две недели, однократно каждые четыре недели, однократно каждые шесть недель или однократно каждые восемь недель.

В одном варианте осуществления этого аспекта набор по изобретению содержит множество отдельных доз средства и метотрексата. В дополнительном варианте осуществления предоставлена упаковка для дозировки, содержащая множество отдельно упакованных доз фармацевтической композиции.

В одном конкретном варианте осуществления средство, необязательно вместе с метотрексатом, является пригодным для подкожного введения и предоставлено в готовой для введения форме, которая не требует разведения, так, чтобы они могли легко вводиться немедицинским персоналом.

Средства, которые являются пригодными для применения в настоящем изобретении, представляют собой такие средства, которые являются способными к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток. Средство может представлять собой полипептид, белок или антитело. Когда средство представляет собой антитело, оно может являться моноклональным антителом. Предпочтительно, антитело представляет собой

моноклональное антитело анти-CD4. Антитело может также предпочтительно являться IgG1 антителом и может быть немодифицированным IgG1 антителом.

Антитела, которые являются наиболее пригодными для применения в настоящем изобретении, являются гуманизированными анти-CD4 антителами или их фрагментами, или производными, которые являются способными к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток. Примеры антител, которые являются способными к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, обсуждаются в Becker *et al.*, (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: стр. 1217-1223) и описаны в WO 2004/083247.

В общем случае, антитело, применяемое в изобретении, содержит один или более переменных доменов, которые способны к связыванию с CD4. Антитело может содержать человеческую константную область (Fc). Эта константная область может быть выбрана среди константных доменов из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE и любой изотип, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительные константные области выбирают среди константных доменов IgG, в частности IgG1.

Настоящее изобретение также включает любой фрагмент антитела. Фрагменты предпочтительно содержат антигенсвязывающие или V области антитела, и представляют собой, конкретно, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv и scFv фрагменты.

В особенно предпочтительном аспекте настоящего изобретения антитело представляет собой гуманизированное анти-CD4 антитело или его фрагмент, или производное, полученное из мышиног моноклонального анти-CD4 антитела B-F5. Антитело может представлять собой гуманизированное антитело анти-CD4, которое содержит последовательность, содержащую области, определяющие комплементарность (CDR) мышиног моноклонального антитела B-F5, необязательно с вариациями в последовательности, которые не оказывают существенного воздействия на специфичность антитела и/или его аффинность.

Примеры антител предоставлены в WO 2004/083247, в которой раскрыто получение некоторых гуманизированных версий мышиног B-F5 антитела. В частности, WO 2004/083247 раскрывает получение гуманизированного антитела BT061 (hB-F5), имеющего V домены, определяемые следующими полипептидными последовательностями:

- Н цепь V домен:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA

PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVY

YCSAS YYRYDVGAWFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L цепь V домен:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYWYQQ

KPGQPPKLLIYLAILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTW

FG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

Производные этого антитела также являются пригодными для применения в настоящем изобретении. Производные включают производные с V доменами, определяемые полипептидными последовательностями, имеющими, по меньшей мере, 80%, предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Особенно предпочтительными антителами являются такие, которые содержат области, определяющие комплементарность (CDR) мышиног B-F5 mAb, и сохраняют способность hB-F5 активировать CD4+ CD25+ регуляторные Т-клетки. Расположение

CDR внутри  $V_H$  и  $V_K$  доменов показано на Фиг.7 и 8. Такие антитела могут необязательно иметь вариации в последовательности CDR, которые не оказывают существенного воздействия на специфичность и/или сродство к связыванию.

В целом, антитело, используемое в изобретении, дополнительно содержит 5 человеческую константную область (Fc). Эта константная область может быть выбрана из константных доменов, указанных выше.

Настоящее изобретение также включает любой фрагмент hB-F5 антитела или его производного, содержащий его V области. Этот фрагмент содержит, в частности, Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, Fv и scFv фрагменты.

10 Чтобы получить hB-F5 антитело, полинуклеотид, кодирующий V домены H цепи или L цепи антитела BT061, может быть гибридизирован с полинуклеотидом, кодирующим константную область человеческой H или L цепи. С целью экспрессии полных H и L цепей, полученных таким образом, может также быть добавлена последовательность, кодирующая сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию белка.

15 Полинуклеотид, как описано выше, связан в векторе экспрессии с соответствующими контрольными последовательностями, обеспечивающими регуляцию его транскрипции и трансляции в выбранной клетке-хозяине. Эти конструкции рекомбинантной ДНК могут быть получены и внедрены в клетки-хозяева посредством хорошо известных методов рекомбинантных ДНК и генной инженерии.

20 Применимые клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические или эукариотические клетки. Среди пригодных эукариотических клеток можно упомянуть посредством примера растительные клетки, клетки дрожжей, таких как *Saccharomyces*, клетки насекомых, таких как *Drosophila* или *Spodoptera*, и клетки млекопитающих, таких как HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS и т.д.

25 BT061 (hB-F5) антитело, используемое в изобретении, может быть получено посредством культивирования клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанное антитело, при условиях, пригодных для его экспрессии, и извлечения указанного антитела из культуры клетки-хозяина.

30 Дополнительным аспектом изобретения является способ, включающий набор или фармацевтическую композицию, содержащие средство и метотрексат.

Как указано выше, настоящее изобретение дополнительно предоставляет медицинские применения и способы лечения пациентов, страдающих от ревматических заболеваний или подверженных им. В частности, в одном аспекте предоставлен способ лечения 35 ревматического заболевания у пациента, включающий стадию (a) введения средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и стадию (b) введения метотрексата, где стадия (a) и стадия (b) могут быть проведены одновременно, отдельно или последовательно и в любом порядке. В одном варианте осуществления этого аспекта стадию (a) и стадию (b) проводят в один и тот же день. В альтернативном варианте 40 осуществления этого аспекта стадию (a) и стадию (b) проводят в пределах одной и той же недели.

В альтернативных аспектах, настоящее изобретение предоставляет способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение метотрексатом, 45 включающий стадию введения средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение средством, способным к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, включающий стадию введения метотрексата.

Ревматические заболевания определяют как заболевания, поражающие

соединительную ткань, особенно суставы и относящиеся к ним структуры, конкретно, характеризующиеся воспалением, дегенерацией или метаболическим нарушением. В предпочтительном аспекте изобретения ревматическое заболевание представляет собой ревматоидный артрит, псориатический артрит, ювенильный ревматоидный артрит или анкилозирующий спондилит.

Лечение ревматоидного артрита является предпочтительным. В случае ревматоидного артрита клиническую эффективность лечения можно оценить с использованием балльной оценки по шкале ACR.

Балльная оценка по шкале ACR представляет собой метод оценки ревматоидного артрита, проявляемого пациентом, проходящим лечение, предложенный Американским Колледжем Ревматологии (ACR) и осуществляемый посредством измерения базового набора параметров (Felson et al, Arthritis & Rheumatism, 1995, 38(6), 727-735). Эта система определяет значение ACR, равное 20 как, по меньшей мере, 20% улучшение по результатам подсчета болезненности и набухания сустава и, по меньшей мере, 20% улучшение в 3 из 5 остающихся измерений из базового набора ACR: глобальные оценки пациента и терапевта, боль, потеря трудоспособности и реагент острой фазы, такие как С-реактивный белок (CRP) или Скорость Осаждения Эритроцитов (СОЭ). Подобным образом, балльные оценки ACR 50 и ACR 70 определяют, по меньшей мере, 50% и, по меньшей мере, 70% улучшение, соответственно.

В дополнительном аспекте изобретения лечение может назначаться пациенту, который не реагирует на лечение модифицирующим заболевание противоревматическим лекарственным средством (DMARD). Субъект, не реагирующий на лечение, представляет собой пациента, который проявляет неадекватный ответ на лечение DMARD. В частности, пациент показывает неадекватный ответ, если он/она имеет продолжительный клинически активный ревматоидный артрит, например, если лекарственное средство не позволяет достичь ACR20 у пациента или не позволяет достичь ингибирования развития структурного повреждения в суставах, или если первоначальный ответ на лекарство потерян в течение времени лечения.

Примеры DMARD представляют собой, например, гидроксихлорохин, сульфасалазин, метотрексат, пенициллинамин, циклофосфамид, соли золота, азотиоприн, лефлуномид и т.д.

Как указано выше, средство и метотрексат могут вводиться пациенту любым пригодным образом. В частности, они могут вводиться парентерально, например, посредством внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции. Для введения средства внутривенное или подкожное введение является особенно предпочтительным. Дополнительно, метотрексат может вводиться перорально.

Объем, в котором дозируют средство и/или метотрексат, будет варьировать в зависимости от способа введения. Когда доза должна вводиться посредством внутривенной инфузии, объем дозировки может составлять от 0,1 или 0,5 мл вплоть до 500 мл, предпочтительно между 15 и 25 мл и обычно приблизительно 20 мл. Когда доза должна вводиться посредством подкожной или внутримышечной инъекции, объем дозировки может составлять между 0,1 и 3 мл, предпочтительно между 0,5 и 1,5 мл и обычно приблизительно 1 мл.

Частоту введения не ограничивают конкретно, при условии, что это не влияет на эффективность лечения. Лечение может включать в себя единичную дозу или множество доз. Является предпочтительным, чтобы множество доз вводилось на, по меньшей мере, следующих основаниях: еженедельно, каждые две недели, каждые 4 недели, каждые 6 недель, каждые 12 недель, каждые 24 недели, каждый календарный месяц, каждые 6

календарных месяцев или ежегодно. Таким образом, дозы могут быть разделены на, по меньшей мере, одну неделю, или на, по меньшей мере, две недели, на, по меньшей мере, один месяц, или на, по меньшей мере, 3 месяца, или на, по меньшей мере, 6 месяцев, или на, по меньшей мере, один год (что означает, что дозы принимают каждую неделю, каждые две недели, или каждый месяц, или каждые 6 месяцев, или каждый год). Особенно предпочтительно, чтобы дозы вводились, по меньшей мере, каждые две-три недели.

Продолжительность лечения особенно не ограничивают, и, что является обычным при лечении аутоиммунных заболеваний, лечение протекает неопределенно долго или до тех пор, пока симптомы не снизятся до управляемого уровня для пациента. В общем случае, лечение назначают субъекту на, по меньшей мере, 1 месяц.

Следует понимать, что средство и метотрексат должны вводиться в терапевтически эффективных количествах, т.е. в количествах, которые являются эффективными для улучшения протекания, предотвращения или лечения ревматического заболевания.

В частности, когда заболевание представляет собой ревматоидный артрит, средство и метотрексат предпочтительно вводят в количестве, которое является эффективным для предоставления ACR50 ответа, более предпочтительно ACR70 ответа.

В одном аспекте изобретения средство должно вводиться субъекту в дозе от 0,2 до 10 мг и, более предпочтительно, в дозе от 0,2 до 6,25 мг и, наиболее предпочтительно, в дозе от 0,2 до 3 мг. Эти дозы являются особенно предпочтительными, когда дозу вводят внутривенно.

Когда средство представляет собой гуманизированное антитело BT061, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что значения эффективной  $St_{\text{max}}$  антитела, циркулирующего в плазме здоровых добровольцев через 3 часа после окончания внутривенной инфузии, являются намного более низкими, чем ожидалось, как показано в Таблице 1, ниже. Считают, что это отражает более быстрый опосредованный мишенью клиренс.

Таблица 1 Ожидаемые и эффективные уровни BT061 в плазме после внутривенного введения. Указан интервал уровней в плазме, измеренных у трех здоровых добровольцев на дозовую группу.			
Дозировка (мг)	Уровень в плазме (мкг/мл)		
	Теоретическая $St_{\text{max}}$	Эффективная $St_{\text{max}}$ (после окончания инфузии)	Концентрация через 3 ч после окончания инфузии
2,5	0,71	0,06-0,14	0
5	1,43	0,32-0,44	0,09-0,16
10	2,86	0,8-2,0	0,46-1,4
20	5,71	2,3-4,1	1,7-3,3
40	11,43	5,9-6,5	4,4-6,1
60	17,14	8,9-15,1	7,7-11,08

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления изобретения от 0,2 до 10 мг средства вводят внутривенно, и максимальная концентрация средства в плазме пациента через три часа после введения составляет меньше чем 2,5 мкг/мл.

Предпочтительно, от 0,2 до 5 мг средства вводят внутривенно, и максимальная концентрация средства в плазме пациента через три часа после введения составляет меньше чем 0,3 мкг/мл. Еще более предпочтительно, от 0,5 до 3 мг средства вводят внутривенно, и максимальная концентрация средства в плазме пациента через три часа после введения составляет меньше чем 0,1 мкг/мл. Эти значения получают после любого введения и/или после первого и/или второго введения средства.

Доза может также быть рассчитана на основании площади поверхности тела (BSA) субъекта. Площадь поверхности тела (BSA) может быть рассчитана в соответствии с любым известным методом. Примеры методов расчета BSA представляют собой:

Формула Mosteller ( $BSA (m^2) = ([\text{Рост(см)} \times \text{Масса тела(кг)}]/3600)^{1/2}$ ) (Mosteller RD., *N Engl J Med* 1987 Oct 22;317(17):1098); DuBois и формула DuBois  $BSA (m^2) = 0,20247 \times \text{Рост(м)}^{0,725} \times \text{Масса тела(кг)}^{0,425}$  (DuBois D; DuBois EF., *Arch Int Med* 1916 17:863-71); формула Haycock  $BSA (m^2) = 0,024265 \times \text{Рост(см)}^{0,3964} \times \text{Масса тела(кг)}^{0,5378}$  (Haycock G.B., et al, *Journal of Pediatrics* 1978 93:1:62-66); формула Gehan и George  $BSA (m^2) = 0,0235 \times \text{Рост(см)}^{0,42246} \times \text{Масса тела(кг)}^{0,51456}$  (Gehan EA и George SL, *Cancer Chemother Rep* 1970 54: 225-35); и формула Boyd:  $BSA (m^2) = 0,0003207 \times \text{Рост(см)}^{0,3} \times \text{Масса тела(грамм)}^{(0,7285 - (0,0188 \times \text{LOG(грамм)})}$ .

Соответственно, средство может быть введено субъекту в дозе от 0,1 до 5 мг/м<sup>2</sup> площади поверхности тела пациента, предпочтительно от 0,1 до 2,5 мг/м<sup>2</sup> и, наиболее предпочтительно, от 0,25 до 1,5 мг/м<sup>2</sup>. Альтернативно, доза может быть рассчитана на основании массы тела субъекта, таким образом, что в дополнительном аспекте изобретения средство должно вводиться субъекту в дозе от 2 до 150 мкг/кг, предпочтительно от 2 до 75 мкг/кг и, наиболее предпочтительно, от 5 до 45 мкг/кг. Как указано выше, особенно предпочтительно, чтобы эти дозировки применялись, когда средство вводят внутривенно.

Как указано выше, в одном аспекте изобретения средство и/или метотрексат вводят подкожно. В целом, как известно в данной области, подкожные дозы должны быть больше, чем внутривенные дозы, чтобы достичь эквивалентного терапевтического эффекта. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали при испытаниях монотерапии на пациентах с ревматоидным артритом с антителом VT061, что терапевтический эффект, достигаемый после 2 мг внутривенного введения приблизительно эквивалентен эффекту, достигаемому после 50 мг подкожного введения. Эти результаты представлены ниже в Таблице 2.

Таблица 2			
Процент пациентов с ревматоидным артритом, показавших ACR улучшения на неделе 7 после лечения однократными еженедельными дозами VT061 (2 мг внутривенно или 50 мг подкожно) в течение полного периода лечения, равного шести неделям. Результаты представляют данные, полученные слепым методом от 8 индивидуумов, 2 получавших плацебо и шести, получавших VT061.			
Неделя 7	ACR20(%)	ACR50(%)	ACR70(%)
2 мг внутривенно	50	25	12,5
50 мг подкожно	50	25	12,5

Соответственно, в дополнительном предпочтительном аспекте изобретения средство вводят пациенту подкожно или внутримышечно в дозе от 20 мг до 80 мг и, более предпочтительно от 30 мг до 70 мг. Альтернативно, средство может быть введено в дозировке от 8 до 50 мг/м<sup>2</sup> или от 0,2 до 1,5 мг/кг. В данном аспекте изобретения особенно предпочтительным является, чтобы введение осуществляли, по большей мере, приблизительно однократно каждые две недели. Отмечают, что аспекты изобретения, описанные в этом параграфе, могут сочетаться с другими аспектами и предпочтительными признаками изобретения, изложенными в данной заявке.

В соответствии с настоящим изобретением фармацевтическая композиция или набор дополнительно содержат метотрексат (MTX). Лечение РА с помощью MTX является хорошо известным в данной области и предусмотрено, что в настоящем изобретении MTX должен вводиться в дозировках, описанных прежде. В частности, в изобретении MTX обычно вводят в дозе в интервале от 5 до 30 мг, предпочтительно в интервале от 7,5 мг до 30 мг и, наиболее предпочтительно, от 10 до 25 мг. В некоторых случаях доза будет зависеть от предварительного лечения пациента с помощью MTX или переносимости для данного лекарственного средства.

В еще одном аспекте способ изобретения включает дополнительную стадию введения дополнительного терапевтического средства, пригодного для лечения ревматического заболевания. Дополнительные терапевтические средства содержат одно или более из следующих средств: нестероидного противовоспалительного лекарственного средства, противовоспалительного стероида, соединения золота, противомаларийного лекарственного средства, фолиевой кислоты, циклоспорина, лефлуномида, азатиоприна, сульфасалазина, d-пеницилламина, циклофосфамида, микофенолата, миноциклина и хлорамбуцила. Эти дополнительные терапевтические средства могут вводиться раздельно, одновременно или последовательно со средством, способным к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток и MTX.

Как упомянуто выше, авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что фармацевтическая композиция и набор настоящего изобретения обладают способностью к лечению ревматических заболеваний. В частности, как показано ниже в Примере 2, лечение ревматоидного артрита приводит к значительному улучшению протекания заболевания. Соответственно, в еще дополнительном аспекте изобретения, когда заболевание представляет собой ревматоидный артрит, лечение предоставляет улучшение протекания заболевания у пациента, равное, по меньшей мере, ACR20, предпочтительно, по меньшей мере, ACR 50 и, более предпочтительно, по меньшей мере, ACR 70, в соответствии с балльной системой оценки Американского Колледжа Ревматологии. Другими словами, лечение предоставляет, по меньшей мере, 20%, предпочтительно, по меньшей мере, 50% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 70% улучшение параметров заболевания в соответствии с балльной оценкой пациента Американского Колледжа Ревматологии (ACR).

Наиболее предпочтительно, лечение предоставляет, по меньшей мере, ACR 70 ответ у пациента в интервале от 6 до 8 недель после начала лечения.

Как также можно увидеть из Примера 2 и относящихся к нему фигур, лечение настоящего изобретения обладает способностью к улучшению ревматоидного артрита у ряда пациентов. Соответственно, способ лечения настоящего изобретения обладает способностью к лечению ревматоидного артрита, предоставляя, по меньшей мере, улучшение состояния заболевания, равное ACR 20, для, по меньшей мере, 20% пациентов. Дополнительно, способ лечения настоящего изобретения обладает способностью к лечению ревматоидного артрита, предоставляя, по меньшей мере, улучшение состояния заболевания, равное ACR 50, более предпочтительно ACR 70, для, по меньшей мере, 10% пациентов.

Изобретение теперь будет описано дополнительно с использованием следующих примеров.

**ПРИМЕР 1: Исследование пролиферации in vitro с антителом BT061, с использованием свежевыделенных CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток**

Способ

Выделение человеческих CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток

Образцы крови по 50 мл с ЭДТА получали от здоровых контрольных доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), регуляторные Т-клетки (Treg) и Т-хелперные клетки в как Т-респондерные клетки (Tresp) выделяли из образцов периферической крови, как описано ранее (Naas et al., 2007).

#### Исследования пролиферации *in vitro*

Свежевыделенные Treg предварительно инкубировали в течение 48 часов с 1 мкг/мл антитела, связанного с плашкой (BT061), 1 мкг/мл растворимого BT061 или средой.

Свежевыделенные Treg ( $2,5 \times 10^4$ , донор А), полученные от 2 доноров (Эксп. 1 и Эксп. 2), предварительно инкубировали в течение 48 часов с 1 мкг/мл либо растворимого или связанного с плашкой BT061. Для достижения аллогенной стимуляции,  $2,5 \times 10^4$  предварительно инкубированных Treg далее переносили к  $1 \times 10^5$  Т-клеток, как клеток-респондеров (Tresp) от второго донора (донор В) в присутствии  $2 \times 10^5$  очищенных от Т-клеток и облученных (30 Грэй) РВМС (донор А). Через 4 дня после стимуляции добавляли 1 мкКи [3Н]-тимидина на лунку и пролиферацию измеряли через дополнительные 16 часов.

#### Результаты

Процент Treg-опосредованного ингибирования пролиферации показан на Фиг.1, как процент подавления пролиферации Tresp, инкубированных РВМС в отсутствие Treg. Результаты показаны для Treg, полученных от двух доноров (Эксп. 1 и Эксп. 2). Заштрихованные столбцы представляют результаты, полученные с Treg клетками, предварительно инкубированными с растворимым антителом, в то время как зачерненные столбцы представляют результаты, полученные с Treg клетками, предварительно инкубированными с антителом, связанным с плашкой. В качестве контроля показана супрессивная активность обработанных средой Treg (полые столбцы). Числа сверху столбцов представляют процент ингибирования пролиферации Tresp.

Как показывает Фиг.1, Treg, предварительно инкубированные со связанным с плашкой или растворимым антителом, обладали способностью понижать средние пролиферативные ответы от аллогенных стимулированных Tresp в отличие от Treg, инкубированных только со средой. Дополнительно, подавление, полученное со связанным с плашкой антителом, было сильнее по сравнению с подавлением, полученным с растворимым антителом.

В физиологических условиях *in vivo* ожидают, что BT061 как IgG1 антитело будет связываться с Fc рецепторами на клетках, экспрессирующих Fc рецептор. Это взаимодействие будет приводить к рекрутингу гомогенно распределенного BT061 (связанного с CD4) в локальный участок взаимодействия клеток-мишеней и клеток, экспрессирующих Fc рецептор, приводя к сшивке BT061 и, таким образом, CD4. Ожидают, что взаимодействие BT061 с клетками, экспрессирующими Fc рецептор, обеспечивает передачу сходного сигнала Treg клеткам-мишеням, как наблюдается с антителом, связанным с плашкой, так как оба механизма рекрутируют несколько молекул мишеней (CD4) в тесную близость на поверхности клетки.

#### ПРИМЕР 2: Клиническое испытание у пациентов с ревматоидным артритом

Способность фармацевтических композиций и наборов по настоящему изобретению предоставлять эффективное лечение RA было продемонстрировано у пациентов, страдающих от RA.

Комбинационное испытание, в котором BT061 исследовали в комбинации с МТХ, включало в себя рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое на фазе II исследование, проводимое на пациентах с RA от умеренного до тяжелого. Все



пациенты принимали стабильные дозы МТХ в течение, по меньшей мере, 3 месяцев перед началом испытания, и эти дозы были продолжены у всех пациентов в интервале от 15 до 20 мг в неделю во время прохождения испытания, при пероральном или внутримышечном введении.

- 5 Пациенты были разделены на три группы. Пациенты в группе I (14 пациентов) получали 0,5 мг внутривенной дозы ВТ061 и дозу МТХ в интервале от 15 до 20 мг. Пациенты в группе II (42 пациента) получали 2,0 мг внутривенной дозы ВТ061 и дозы МТХ в интервале от 15 до 20 мг. Пациенты в группе III (14 пациентов) получали дозы МТХ в интервале от 15 до 20 мг. Пациенты принимали дозы один раз в неделю в течение
- 10 периода, равного восьми неделям.

Для внутривенного введения средство вводили посредством инфузии в вену предплечья в соответствии с принятыми медицинскими процедурами.

- Эффективность лечения оценивали еженедельно в течение периода дозирования и в течение ряда недель после завершения дозирования, посредством оценки параметров
- 15 ACR (Американское Общество Ревматологии, домашняя страница ACR), и, конкретно, исследуя число болезненных и набухших суставов и определяя уровни С-реактивного белка (CRP) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Эти параметры также оценивали перед испытанием для получения значения "базовой линии" в день 0.

- Результаты испытания показаны на Фиг.2-4, на которых данные, полученные от
- 20 пациентов в дозовой группе II, получавшей дозы 2 мг ВТ061+МТХ, сравнивают с наиболее эффективными дозовыми группами, полученными в двух испытаниях с опубликованной фазой III, включающей антитела анти-TNF-альфа, Humira (адалимумаб), Keystone et al., (2004 - испытание DE019) и Simponi (голимумаб), Keystone et al., (2009 - продолженное испытание). Наиболее эффективные дозовые группы показаны для всех
- 25 исследований.

Следует отметить, что результаты из предшествующего уровня техники, включенные для сравнительных целей, представляют собой испытания фазы III, в которой дозы фармацевтических композиций были оптимизированы.

- В частности, Фиг.2 показывает процентное соотношение пациентов из группы 2 мг,
- 30 достигающих балльной оценки ACR20, в то время как Фиг.3 и 4 показывают процентное соотношение пациентов из группы 2 мг, достигающих балльных оценок ACR50 и ACR70, соответственно.

- Как можно видеть на фигурах, в клинических испытаниях с терапевтическими антителами анти-TNF-альфа, достижение пика терапевтической активности, как
- 35 измеряют по улучшению балльной оценки ACR, обычно требует нескольких месяцев. В целом, процент пациентов, показывающих ACR20 ответ, является максимальным и достигает плато через 3 месяца. Для ACR50 плато достигается через 4 месяца, и для ACR70 плато достигается через 6 месяцев.

- Однако результаты комбинационной терапии настоящего изобретения показывают
- 40 ряд различий. В частности, на фигурах, показывающих плацебо-корректированные результаты, можно видеть, что наступление терапевтического эффекта является замедленным; процент пациентов, достигающих балльной оценки ACR20, не поднимается выше 5% до недели 8. Однако после наступления терапевтический эффект быстро нарастает, так что на неделе 9 процент пациентов, достигающих ACR50, является
- 45 сравнимым с процентом, достигнутым на фазе III испытаний с антителами к TNF-альфа, Humira и Simponi. Процент пациентов, достигающих ACR20, ACR50 и ACR70, возрастает быстро в интервале между неделями от 7 до 9 таким образом, что на неделе 9 процент ACR20, ACR50 и ACR70 пациентов составляет приблизительно 25%, 18% и 17%,

соответственно. Отмечают, что это процентное соотношение пациентов с ACR70 не достигается в испытаниях с Humira и Simponi до наступления 24-26 недель после начала лечения.

В дополнение авторы настоящего изобретения отмечают, что количество неблагоприятных побочных эффектов, наблюдаемых при комбинационной терапии с VT061 и MTX, является более низким, чем наблюдают в испытаниях, осуществляемых с VT061 по отдельности, и, следовательно, MTX обладает способностью снижать побочные эффекты терапевтических антител, которые активируют CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки.

Эти результаты демонстрируют эффективность и удивительные преимущества комбинации средства, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток и MTX по настоящему изобретению при лечении ревматического заболевания.

#### Формула изобретения

1. Фармацевтическая комбинация для лечения ревматического заболевания, содержащая гуманизированное анти-CD4 антитело, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат, где гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при этом (а) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (b) V домен Н цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

2. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное анти-CD4 антитело является пригодным для парентерального введения.

3. Фармацевтическая комбинация по п.2, где гуманизированное анти-CD4 антитело является пригодным для внутримышечного, внутривенного или подкожного введения.

4. Фармацевтическая комбинация по п.1, где метотрексат является пригодным для перорального, внутримышечного, внутривенного или подкожного введения.

5. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное антитело анти-CD4 имеет V домены, определяемые следующими полипептидными последовательностями:

- Н цепь V домен:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMVWLRQAPGKGLEWIGVISVKSE  
NYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNLSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAY  
WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L цепь V домен:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYWYQQKPGQPPKLLIYLASIL  
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 2).

или V домены, содержащие полипептидные последовательности, имеющие, по меньшей мере, 95%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

6. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное анти-CD4 антитело предназначено для внутривенного введения и предоставлено в объеме дозировки от 0,5 до 500 мл.

7. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное анти-CD4 антитело предоставлено в объеме дозировки от 0,5 до 1,5 мл.

8. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное анти-CD4 антитело предоставлено в объеме дозировки от 15 до 25 мл.

9. Фармацевтическая комбинация по п.1, где гуманизированное анти-CD4 антитело пригодно для подкожного или внутримышечного введения и предоставлено в объеме дозировки от 0,1 до 3 мл.

10. Способ лечения ревматического заболевания у пациента, включающий стадию (а) введения гуманизированного анти-CD4 антитела, способного к активации CD4+ CD25+ регуляторных Т-клеток, и стадию (b) введения метотрексата, где стадия (а) и стадия (b) могут быть проведены одновременно, отдельно или последовательно и в любом порядке и проводятся в пределах одной и той же недели, где гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен H цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при этом (i) V домен H цепи содержит последовательности DCRMVY, VISVKSEN YGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (ii) V домен H цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

11. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.10, где ревматическое заболевание выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного ревматоидного артрита и анкилозирующего спондилита.

12. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.11, где ревматическое заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

13. Способ лечения по п.10, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят парентерально.

14. Способ лечения по п.13, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно.

15. Способ лечения по п.10, где метотрексат вводят перорально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

16. Способ лечения по п.10, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,2 до 10 мг.

17. Способ лечения по п.16, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,2 до 5 мг.

18. Способ лечения по п.17, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,5 до 3 мг.

19. Способ лечения по п.16, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца введения составляет меньше, чем 2,5 мкг/мл.

20. Способ лечения по п.17, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца введения составляет меньше, чем 0,3 мкг/мл.

21. Способ лечения по п.18, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца введения составляет меньше, чем 0,1 мкг/мл.

22. Способ лечения по п.16, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация

гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца второго введения составляет меньше, чем 2,5 мкг/мл.

23. Способ лечения по п.17, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца второго введения составляет меньше, чем 0,3 мкг/мл.

24. Способ лечения по п.18, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца второго введения составляет меньше, чем 0,1 мкг/мл.

25. Способ лечения по п.16, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца любого введения составляет меньше, чем 2,5 мкг/мл.

26. Способ лечения по п.17, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца любого введения составляет меньше, чем 0,3 мкг/мл.

27. Способ лечения по п.18, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят внутривенно однократно каждую неделю, и где максимальная концентрация гуманизированного анти-CD4 антитела в плазме пациента через 3 часа после конца любого введения составляет меньше, чем 0,1 мкг/мл.

28. Способ лечения по п.10, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 2 до 150 мкг/кг.

29. Способ лечения по п.28, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 2 до 75 мкг/кг.

30. Способ лечения по п.29, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 5 до 45 мкг/кг.

31. Способ лечения по п.10, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,1 до 5 мг/м<sup>2</sup> площади поверхности тела пациента.

32. Способ лечения по п.31, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,1 до 2,5 мг/м<sup>2</sup> площади поверхности тела пациента.

33. Способ лечения по п.32, где гуманизированное анти-CD4 антитело вводят пациенту в количестве от 0,25 до 1,5 мг/м<sup>2</sup> площади поверхности тела пациента.

34. Способ лечения по п.10, где пациенту вводят однократную дозу гуманизированного анти-CD4 антитела.

35. Способ лечения по п.10, где пациенту вводят множество доз гуманизированного анти-CD4 антитела.

36. Способ лечения по п.35, где гуманизированное анти-CD4 антитело и/или метотрексат вводят, по большей мере, каждую неделю.

37. Способ лечения по п.36, где гуманизированное анти-CD4 антитело и/или метотрексат вводят каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели.

38. Способ лечения по п.10, который включает дополнительную стадию введения дополнительного терапевтического средства, пригодного для лечения заболевания, выбранного из нестероидного противовоспалительного лекарственного средства, противовоспалительного стероида, соединения золота, противомаларийного лекарственного средства, фолиевой кислоты, циклоспорина, лефлуномида, азатиоприна,

сульфасалазин, d-пенициллина, циклофосфамида, микофенолата, миноциклина и хлорамбуцила.

39. Способ лечения по п.10, где лечение предоставляет улучшение заболевания у пациента, равное, по меньшей мере, ACR50, в соответствии с системой балльной оценки Американского Колледжа Ревматологии (ACR).

40. Способ лечения по п.39, где лечение предоставляет улучшение заболевания у пациента, равное, по меньшей мере, ACR70, в соответствии с системой балльной оценки Американского Колледжа Ревматологии (ACR).

41. Способ лечения по п.40, где лечение предоставляет ответ у пациента, равный, по меньшей мере, ACR 70 в интервале от 6 до 8 недель после начала лечения.

42. Способ лечения по любому из пп.10-41, где гуманизированное антитело анти-CD4 имеет V домены, определяемые следующими полипептидными последовательностями:

- Н цепь V домен:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMWLRQAPGKGLEWIGVISVKSE  
NYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAY  
WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L цепь V домен:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASIL  
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 2).

или V домены, содержащие полипептидные последовательности имеющие, по меньшей мере, 95%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

43. Способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение метотрексатом, включающий стадию введения гуманизированного антитела анти-CD4, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, где гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при этом: (i) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMW, VISVKSEN YGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSYIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (ii) V домен Н цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

44. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.43, где ревматическое заболевание выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного ревматоидного артрита и анкилозирующего спондилита.

45. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.44, где ревматическое заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

46. Способ лечения по любому из пп.43-45, где гуманизированное анти-CD4 антитело имеет V домены Н цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 1, и V домены L цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 2,

или имеет V домены, содержащие полипептидные последовательности, имеющие, по меньшей мере, 95%-ную идентичность с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

47. Способ лечения ревматического заболевания у пациента, проходящего лечение гуманизированным антителом анти-CD4, способным к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, включающий стадию введения метотрексата, где гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и

константный домен IgG1, при этом: (i) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (ii) V домен Н цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

48. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.47, где ревматическое заболевание выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного ревматоидного артрита и анкилозирующего спондилита.

49. Способ лечения ревматического заболевания у пациента по п.48, где ревматическое заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

50. Способ лечения по любому из пп.47-49, где гуманизированное анти-CD4 антитело имеет V домены Н цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 1, и V домены L цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 2,

или имеет V домены, содержащие полипептидные последовательности, имеющие, по меньшей мере, 95%-ную идентичность с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

51. Способ лечения ревматоидного артрита у пациента, который не реагирует на лечение модифицирующим заболеванием противоревматическим лекарственным средством (DMARD), включающий стадию (a) введения гуманизированного анти-CD4 антитела, способного к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и стадию (b) введения метотрексата, где стадия (a) и стадия (b) могут быть проведены одновременно, раздельно или последовательно и в любом порядке и проводятся в пределах одной и той же недели, при этом гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при этом (i) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (ii) V домен Н цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

52. Способ лечения ревматоидного артрита у пациента по п.51, где DMARD представляет собой метотрексат.

53. Способ лечения ревматоидного артрита у пациента по п.51 или 52, где гуманизированное анти-CD4 антитело имеет V домены Н цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 1, и V домены L цепи, определенные посредством SEQ ID NO: 2,

или имеет V домены, содержащие полипептидные последовательности, имеющие, по меньшей мере, 95%-ную идентичность с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

54. Набор для лечения ревматического заболевания, содержащий раздельно гуманизированное анти-CD4 антитело, способное к активации CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток, и метотрексат, где гуманизированное анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при этом (a) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности RASKSVSTSGYSIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (b) V домен Н цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

55. Набор по п.54, где гуманизированное антитело анти-CD4 содержит V домены, определяемые следующими полипептидными последовательностями:

- Н цепь V домен:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSE  
 NYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFA  
 YWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 1)

5 - L цепь V домен:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASIL  
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID  
 NO:2).

10 или V домены, содержащие полипептидные последовательности, имеющие, по  
 меньшей мере, 95%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID  
 NO: 2.

56. Способ получения фармацевтической комбинации по любому из пп.1-9,  
 включающий стадию комбинирования гуманизированного антитела анти-CD4 и  
 метотрексата, с получением фармацевтической комбинации, где гуманизированное  
 15 анти-CD4 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен  
 IgG1, при этом (а) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMY, VISVKSEN  
 YGANYAESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности  
 RASKSVSTSGYSYIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (b) V домен Н цепи имеет, по  
 меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен  
 20 L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID  
 NO: 2.

57. Способ получения набора по п.54 или 55, включающий стадию комбинирования  
 отдельной части, содержащей гуманизированное анти-CD4 антитело, и отдельной части,  
 содержащей метотрексат, с получением набора, где гуманизированное анти-CD4  
 25 антитело содержит V домен Н цепи, V домен L цепи и константный домен IgG1, при  
 этом (а) V домен Н цепи содержит последовательности DCRMY, VISVKSENYGANYA  
 ESVRG и SYRYDVGAWFAY, и V домен L цепи содержит последовательности  
 RASKSVSTSGYSYIY, LASILES и QHSRELPWT; и/или (b) V домен Н цепи имеет, по  
 меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и V домен  
 30 L цепи имеет, по меньшей мере, 80%-ную идентичность последовательности с SEQ ID  
 NO: 2.

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

&lt;110&gt; Biotest AG

&lt;120&gt; КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

&lt;130&gt; 322248.WO/JND/CJS

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; V домен H цепи гуманизированного антитела hB-F5H37L

&lt;400&gt; 1

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

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

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; V домен K цепи гуманизированного антитела hB-F5L4M

&lt;400&gt; 2



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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 550

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Часть плазмиды, кодирующей V домен Н цепи гуманизированного антитела hB-F5

<400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcatcttcc tgcccgtgct gggcctccca 60  
tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120  
cactttgctg tttccttttg tctccaggtg tctgtcaga ggaacagctt gtggagtctg 180  
ggggaggctt ggtgaaaccc ggaggttctc tgaggctctc ctgtgcagcc tcgggtttca 240  
gtttcagtga ctgccgatg tactgggttc gccaggctcc aggggaagggg ctggagtgga 300  
ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360  
gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctatctgcag atgaacagct 420  
tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgcttc ctattatagg tacgacgtgg 480  
gggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540  
gccaagcttg 550

<210> 4

<211> 498

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Часть плазмиды, кодирующей V домен Н цепи гуманизированного антитела hB-F5

&lt;400&gt; 4

```

ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat      60
ttcaattata tctgagacag cgtgtataag tttatgtata atcattgtcc attcctgact      120
acaggtgcct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actccctggc tgtgtctctg      180
ggcgagaggg ccaccatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctacagt      240
tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat ttaccttgca      300
tccatcctag aatctggggg ccctgaccga ttcagtggca gggggctctgg gacagatttc      360
actctacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag tttattactg tcagcacagt      420
aggggaacttc cgtggacggt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg tgagtagaat      480
ttaaatttta agcttctt                                     498

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 5

Gln Glu Tyr Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

<210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> V домен H цепи гуманизированного антитела hB-F5H37V

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> V домен K цепи гуманизированного антитела hB-F5L4L

<400> 16

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

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

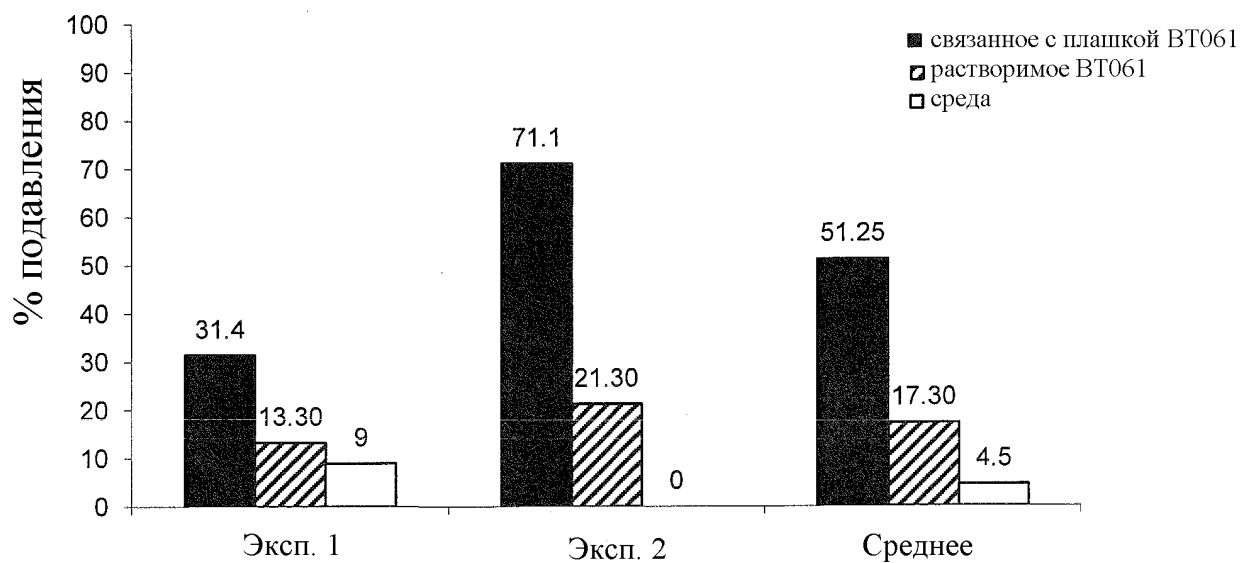
Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

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

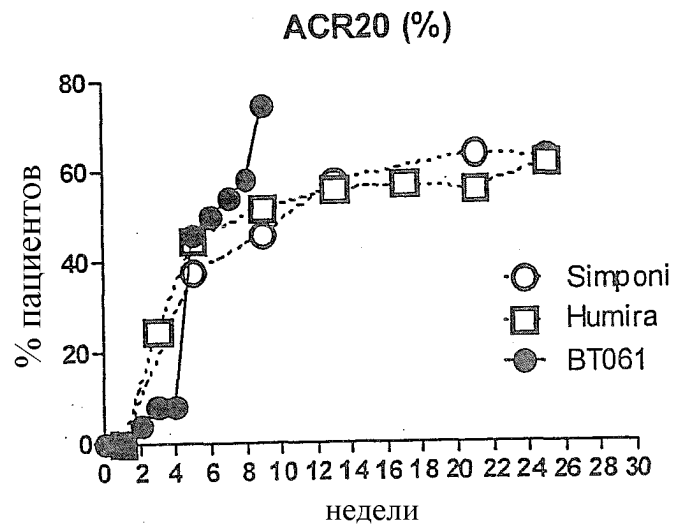
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

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

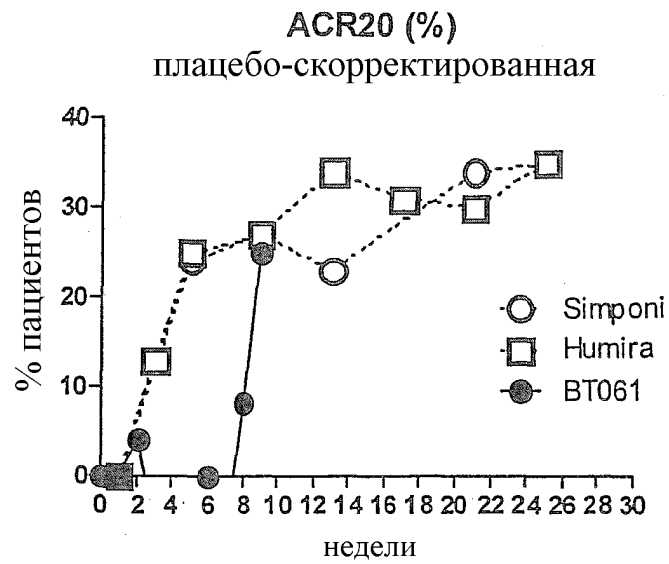
Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110



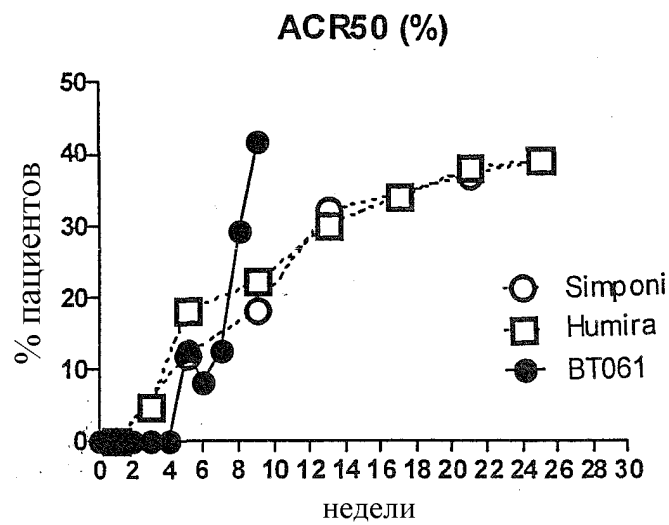
Фиг. 1



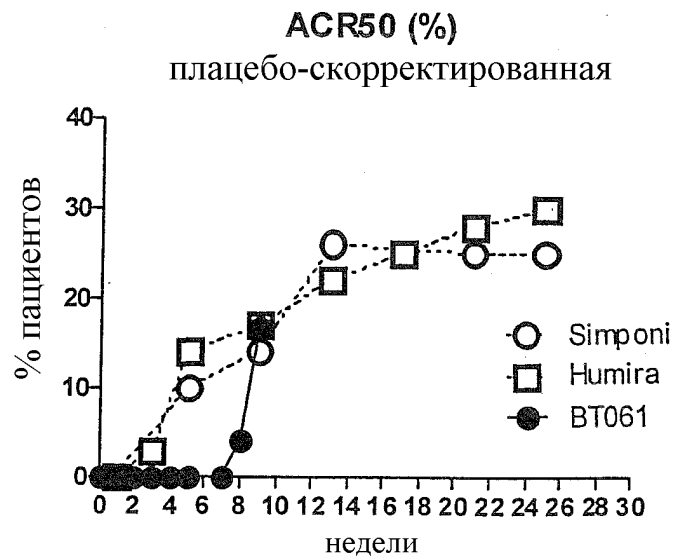
Фиг. 2А



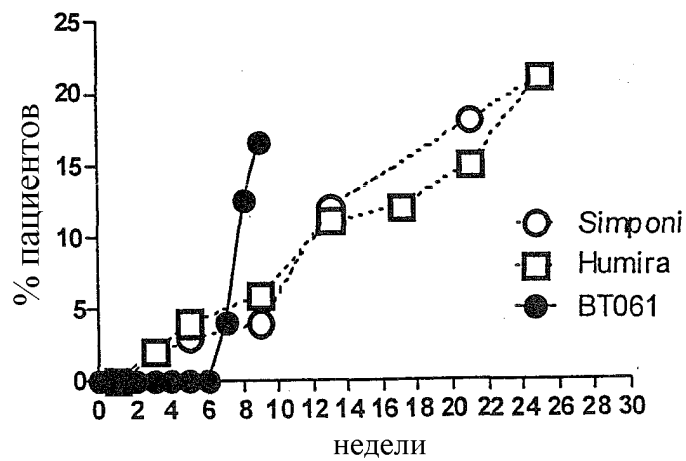
Фиг. 2В



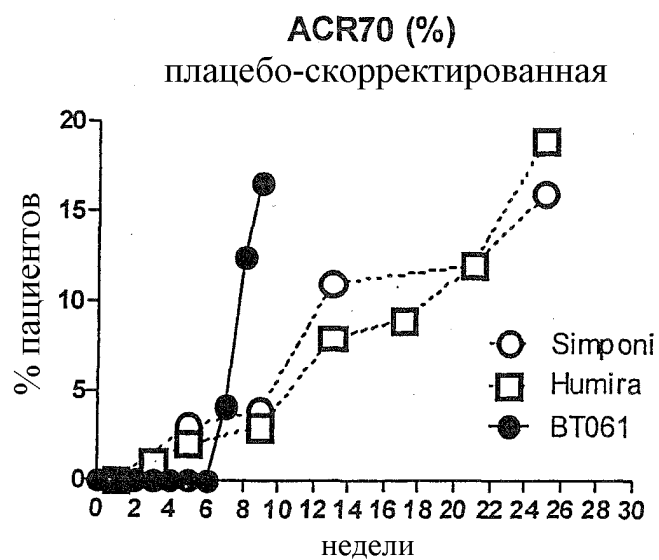
Фиг. 3А



Фиг. 3В  
**ACR70 (%)**



Фиг. 4А



Фиг. 4В



GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT CCT GCC CGT GCT GGG CCT  
CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG  
GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT  
E E Q L  
GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA  
V E S G G G L V K P G G S L R L S C A  
GCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG  
A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G  
AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT  
K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N  
TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG  
Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T  
GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT  
V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C...S...  
GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT  
A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T  
CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG  
L V T V S S

Фиг. 5

GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA  
TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC  
CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT  
D I V M T Q S P D S L A  
GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA  
V S L G E R A T I N C R A S K S V S T  
TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG  
S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L  
CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC  
L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S  
GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA  
G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A  
GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG  
V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K  
GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT  
V E I K

Фиг. 6

	FR1		CDR1		FR2
	1	2	3	4	
	12345678901234567890123	456777778901234	567890123456789		
	ABCD				

mB-F5	DIVLTQSPSSLVVS LGQRATISC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQIPGQPPKLLIY
hB-F5L4M	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQKPGQPPKLLIY
hB-F5L4L	-----	-----	-----
FK-001	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC		WYQQKPGQPPKLLIY

	CDR2		FR3
	5	6	7 8
	0123456	78901234567890123456789012345678	

mB-F5	LASILES	GVPCRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC
hB-F5L4M	LASILES	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
hB-F5L4L	-----	-----
FK-001		GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

	CDR3		FR4
	9	10	
	901234567	8901234567	

mB-F5	QHSRELPWT	FGGGTKLEIK
hB-F5L4M	QHSRELPWT	FGQGTKVEIK
hB-F5L4L	-----	-----
FK-001		FGQGTKVEIK

## Фиг. 7

	FR1		CDR1		FR2
	1	2	3	4	
	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789		

mB-F5	QEYLVETGGGLVRPGNSLKLSCVTS	GFSFS	DCRMV	WLRQPPGKGLEWIG
hB-F5H37V	EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFSFS	DCRMV	WVRQAPGKGLEWIG
hB-F5H37L	-----	-----	-----	-----
M26	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFS		WVRQAPGKGLEWVG

	CDR2		FR3
	5	6 7 8 9	
	0122223456789012345	67890123456789012222345678901234	
	ABC	ABC	

mB-F5	VISVKSENYGANYAESVRG	RFITISRDDSKSSVYLQMSRLREEDTATYYCSA
hB-F5H37V	VISVKSENYGANYAESVRG	RFITISRDDSKNTVYLQMNLSLKTEDTAVYYCSA
hB-F5H37L	-----	-----
M26		RFITISRDDSKNTVYLQMNLSLKTEDTAVYYCTT

	CDR3		FR4
	10	11	
	5678900000012	34567890123	
	ABCDE		

mB-F5	SYRYDVGAWFAY	WGQGLVTVSA
hB-F5H37V	SYRYDVGAWFAY	WGQGLVTVSS
hB-F5H37L	-----	-----
M26		WGQGLVTVSS

## Фиг. 8