



**СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО МНОЖЕСТВЕННОГО СКЛЕРОЗА**

## Описание

**ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

В настоящей заявке заявлен приоритет в соответствии с предварительной заявкой США с серийным номером No. 61/097464, поданной 16 сентября 2008, которая в полном объеме включена в настоящее описание в виде ссылки.

**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к способам лечения у пациента прогрессирующего множественного склероза (MS или рассеянного склероза, РС]), а также к изделиям промышленного производства, снабженным инструкциями по его применению.

**ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Множественный склероз (МС), или рассеянный склероз (РС), является воспалительным и демиелинизирующим дегенеративным заболеванием центральной нервной системы (ЦНС) человека. Данное заболевание распространено во всем мире, и в Соединенных Штатах Америки им поражено приблизительно 300000 субъектов; данное заболевание поражает взрослых субъектов молодого возраста, при этом в 70%-80% случаев начало заболевания отмечается в возрасте от 20 до 40 лет (Anderson et al. *Ann Neurology* 31(3): 333-6 (1992); Noonan et al. *Neurology* 58: 136-8 (2002)). РС представляет собой гетерогенное расстройство, в том, что касается течения болезни, оценки сканирования методом магнитно-резонансной томографии (МРТ), а также анализа патологии на основе биопсийного и аутопсийного материала (Lucchinetti et al. *Ann Neurol* 47: 707-17 (2000)). Заболевание проявляется всевозможными многочисленными комбинациями явлений дефицита, включая спинномозговой синдром, синдромы, связанные со стволом головного мозга, черепно-мозговым нервом, мозжечком, а также церебральным и когнитивным синдромами. Прогрессирующая нетрудоспособность является судьбой большинства пациентов с РС, в особенности с 25-летней перспективой. Половина пациентов с РС нуждается в помощи палки при ходьбе уже в течение 15-летнего

периода после начала заболевания. РС является основной причиной неврологической нетрудоспособности среди молодых представителей взрослого населения и представителей среднего возраста, и, вплоть до последнего десятилетия, никаких способов, оказывающих благоприятное воздействие, известно не было. РС трудно диагностировать в силу неспецифической клинической картины, что ведет к необходимости развития широко разветвленных диагностических показателей, которые включают несколько технологических достижений, состоящих в изучении МРТ-сканирования, вызванных мозговых потенциалов и спинномозговой жидкости (СМЖ). Все диагностические критерии основаны на общих принципах, связанных с рассеянными очагами поражения (повреждения) в центральном белом веществе головного мозга, возникающими в различное время и не объясняемые другими этиологическими причинами, такими как инфекция, сосудистое заболевание или аутоиммунное расстройство (McDonald et al. *Ann Neurol* 50: 121-7 (2001)). При РС могут наблюдаться четыре характера проявления заболевания: возвратно-ремиттирующий РС (RRMS; 80%-85%), первично прогрессирующий РС (PPMS; 10%-15% случаев в период начала заболевания), прогрессирующе-рецидивирующий РС (PRMS, progressive relapsing MS); 5% в период начала заболевания); и вторично прогрессирующий РС (SPMS) (Kremenutzky et al. *Brain* 122 (Pt 10): 1941-50 (1999); Confavreux et al. *N Engl J Med* 343(20): 1430-8 (2000)). Согласно оценкам, у 50% пациентов с RRMS через 10 лет развивается SPMS, и вплоть до 90% пациентов с RRMS в конечном итоге достигают развития стадии SPMS (Weinshenker et al. *Brain* 112(Pt 1): 133-46 (1989)).

В настоящее время в Соединенных Штатах для лечения RRMS разрешено к применению шесть лекарственных средств из четырех классов, тогда как ни одно лекарственное средство не одобрено для лечения PPMS. Лечение RRMS включает применение следующих лекарственных средств: класс интерферонов, IFN-бета-1a (РЕБИФ<sup>(R)</sup> и АВОНЕКС<sup>(R)</sup>) и IFN-бета-1b (БЕТАЗЕРОН<sup>(R)</sup>); глатирамер-ацетат (КОПАКСОН<sup>(R)</sup>), полипептид; натализумаб (ТИЗАБРИ<sup>(R)</sup>); и митоксантрон (НОВАНТРОН<sup>(R)</sup>), цитотоксическое средство. С

переменным успехом использовались также и другие лекарственные средства, включая кортикостероиды, метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн и внутривенный (в/в) иммуноглобулин. Благоприятность воздействия принятых в настоящее время подходов к лечению является относительно невысокой (~30%) в отношении частоты рецидивов и профилактики нетрудоспособности в случаях RRMS, согласно предположению на основании двух мета-анализов (Filippini et al. *Lancet* 361: 545-52 (2003)).

В других клинических исследованиях РС оценивали другие иммуномодулирующие агенты, включая ингибиторы фактора некроза опухоли- $\alpha$  и измененные пептидные лиганды, которые скорее ухудшают, а не улучшают состояние при РС (Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI *Neurology* 53: 457-65 (1999); Bielekova et al *Nat Med* 2000; 6: 1167-75 (2000), список опечаток приведен в *Nat Med* 6: 1412 (2000)).

Преобладающее мнение в отношении патофизиологии РС связано с тем, что воспаление при данном заболевании принципиально опосредовано CD4<sup>+</sup> Th1-T-клетками. Терапевтические подходы, основанные на указанной теории, такие как применение IFN-бета и глатирамер-ацетата, снижают, но полностью не предотвращают возникновение обострения болезни или накопление явлений, приводящих к нетрудоспособности.

Существование гуморального компонента у человека с РС косвенным образом выявляли в течение десятилетий, и это подтверждено включением в диагностические критерии РС олигоклональных полос в спинномозговой жидкости и повышенного синтеза интратекального IgG (Siden A. *J Neurol* 221: 39-51 (1979); McDonald et al. *Ann Neurol* 50: 121-7 (2001); Andersson et al. *Eur J Neurol* 9: 243-51 (2002); O'Connor, P. *Neurology* 59: S1-33 (2002)). Наличие олигоклональных полос, повышенного уровня свободных легких цепей и повышенного синтеза интратекального IgM коррелирует с активностью заболевания РС и может быть прогностическим фактором в отношении более суровых исходов (Rudick et al. *Mult Scler* 1: 150-5 (1995); Zeman et al.

Acta Cytol 45: 51-9 (2001); Izquierdo et al. Acta Neurol Scand 105: 158-63 (2002); Wolinsky J. J Neurol Sci 206: 145-52 (2003); Villar et al. Ann Neurol 53: 222-6 (2003)).

Противомиелиновые антитела (основной миелиновый белок (МВР) и миелиновый гликопротеин олигодендроцитов (МОГ)) обнаружены в сыворотке пациентов с прогрессирующей и рецидивирующей формами РС (Reindl et al. Brain 122: 2047-56 (1999); Egg et al. Mult Scler 7(5): 285-9 (2001)). Противомиелиновые антитела обнаружены также в СМЖ пациентов с РС (Reindl et al. Brain 122: 2047-56 (1999); Egg et al. Mult Scler 7(5): 285-9 (2001); Andersson et al. Eur J Neurol 9: 243-51 (2002)). У пациентов с РС наблюдались и дополнительные типы антител, такие как антитела против ганглиозидов антител или антитела против нейрофиламентов (Mata et al. Mult Scler 5: 379-88 (1999); Sadatipour et al. Ann Neurol 44: 980-3 (1998)). В сообщении указывалось, что наличие сывороточных анти-МОГ- и анти-МВР-антител является четким прогностическим признаком прогрессии от клинически изолированного явления демиелинизации до дефинитной формы RRMS (Berger et al. N Engl J Med 349: 139-45 (2003)). Установленный относительный риск возникновения обострения составлял 76,5 в случае пациентов, серопозитивных по обоим указанным антителам, и 31,6 в случае пациентов, серопозитивных только в отношении анти-МОГ-антитела.

Международной ассоциацией по патологии установлено, что антитела, связанные с миелином, присутствуют у основной массы пациентов с РС, с плазматическими клетками и В-клетками, также обнаруживаемыми в очагах поражения РС, что является дополнительным свидетельством в пользу роли гуморального фактора при РС (Prineas and Wright, Lab Invest 38: 409-21 (1978); Esiri M. Neuropathol Appl Neurobiol 6: 9-21 (1980); Genain et al. Nat Med 5: 170-5 (1999); Lucchinetti et al. Ann Neurol 47: 707-17 (2000); Wingerchuk et al. Lab Invest 81: 263-81 (2001)). В-клетки детектируются в СМЖ пациентов с РС, и наличие относительно высокой доли В-клеток может служить прогностическим показателем развития более тяжелой степени нетрудоспособности (Серок et al. Brain 124(Pt 11): 2169-76

(2001)).

У пациентов с RRMS или с опсоклонус-миоклонус-синдромом, согласно сообщениям, ритуксимаб способствовал истощению периферических В-клеток у всех пациентов, а у некоторых пациентов снижал число В-клеток в СМЖ (Pranzatelli et al. *Neurology* 60(Suppl1) PO5.128: A395 (2003); Cross et al. "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" (Abstract) *Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis ACTRIMS* 20-1 (October, 2003); Cross et al. *J. Neuroimmunol.* 180: 63-70 (2006)). См. также Cree et al. "Tolerability and Effects of Rituximab "Anti-CD20-antibody" in Neuromyelitis Optica and Rapidly Worsening Multiple Sclerosis" *Meeting of the Am. Acad. Neurol.* (April, 2004); Cree et al. *Neurology* 64: 1270-2 (2005).

#### **Антитела против CD20 и терапия с их использованием**

Лимфоциты являются одним из многих типов клеток белой крови, продуцируемых в костном мозге в процессе гематопоеза. Существует две основные популяции лимфоцитов: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-лимфоциты (Т-клетки). Лимфоцитами, которые в данном случае представляют особый интерес, являются В-клетки.

В-клетки созревают в костном мозге и покидают костный мозг, экспрессируя на своей поверхности антиген-связывающее антитело. Когда интактная В-клетка впервые встречается с антигеном, в отношении которого ее мембрано-связанное антитело является специфичным, такая клетка начинает быстро делиться, и потомки указанной клетки дифференцируются в В-клетки памяти и эффекторные В-клетки, называемые "плазматическими клетками". В-клетки памяти имеют более длительное время жизни и продолжают экспрессировать мембрано-связанное антитело с той же самой специфичностью, что и исходная родительская клетка. Плазматические клетки не продуцируют мембрано-связанное антитело, но вместо этого они продуцируют антитело в такой форме, которая может быть секретирована. Секретируемые антитела являются основной эффекторной молекулой гуморального иммунитета.

Антиген CD20 (называемый также дифференцировочным

антигеном, ограниченным человеческими В-лимфоцитами, Вр35) является гидрофобным трансмембранным белком с молекулярной массой, приблизительно составляющей 35 кДа, локализованным на пре-В-клетках и на зрелых В-лимфоцитах (Valentine et al. *J. Biol. Chem.* 264(19): 11282-11287 (1989); и Einfeld et al. *EMBO J.* 7(3): 711-717 (1988)). Указанный антиген экспрессируется также более чем на 90% В-клеток неходжкинских лимфом (НХЛ) (Anderson et al. *Blood* 63(6): 1424-1433 (1984)), но не обнаруживается на гематопоэтических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или клетках других тканей (Tedder et al. *J. Immunol.* 135(2): 973-979 (1985)). CD20 регулирует раннюю стадию(стадии) в процессе активации инициации клеточного цикла и дифференцировки (Tedder et al., выше) и, возможно, функционирует в качестве канала для ионов кальция (Tedder et al. *J. Cell. Biochem.* 14D: 195 (1990)).

Принимая во внимание экспрессию CD20 в В-клеточных лимфомах, можно использовать указанный антиген в качестве кандидата для "нацеливания" на такие лимфомы. По существу, такое нацеливание может быть генерализовано следующим образом: антитела, специфичные в отношении антитела CD20 поверхности В-клеток, вводят пациенту. Указанные анти-CD20-антитела специфически связываются с CD20-антигеном (по всей видимости) как нормальных, так и злокачественных В-клеток; связывание антитела с поверхностным антигеном CD20 может приводить к деструкции и истощению неопластических В-клеток. Кроме того, химические агенты или радиоактивные метки, обладающие разрушительным потенциалом в отношении опухолевых клеток, могут быть конъюгированы с анти-CD20-антителом, с тем, чтобы указанный агент специфически "доставлялся" к неопластическим В-клеткам. Независимо от конкретного приложения, первичной целью является разрушение опухоли; специфическое приложение может быть определено в зависимости от конкретно используемого анти-CD20-антитела, и, таким образом, подходы к нацеливанию на антиген CD20 могут значительно варьировать.

Антитело ритуксимаб (РИТУКСАН<sup>(R)</sup>) является полученным генно-инженерным путем моноклональным химерным

мышиним/человеческим антителом, направленным на антиген CD20. Ритуксимаб является антителом, называемым "C2B8" в патенте США No. 5736137, опубликованном 7 апреля 1998 (Anderson et al.). РИТУКСАН<sup>(R)</sup> показан при лечении пациентов с рецидивирующей или рефрактерной низкодифференцированной или фолликулярной, CD20-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомой. Исследования механизма действия *in vitro* показали, что РИТУКСАН<sup>(R)</sup> связывается с человеческим комплементом и лизирует лимфоидные В-клеточные линии в результате комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) (Reff et al. *Blood* 83(2): 435-445 (1994)). Кроме того, он обладает существенной активностью в анализах на антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Позже в анализах по включению меченого по тритию тимидина было показано, что РИТУКСАН<sup>(R)</sup> оказывает антипролиферативные эффекты и напрямую индуцирует апоптоз, тогда как другие анти-CD19- и анти-CD20-антитела таким действием не обладают (Maloney et al. *Blood* 88(10): 637a (1996)). Экспериментально наблюдали также синергизм между препаратом РИТУКСАН<sup>(R)</sup> и воздействием химиотерапии и токсинов. В частности, РИТУКСАН<sup>(R)</sup> сенсibiliзирует линии клеток человеческой В-клеточной лимфомы, резистентные к лекарственному средству, к цитотоксическим эффектам доксорубицина, CDDP, VP-16, дифтерийного токсина и рицина (Demidem et al. *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3): 177-186 (1997)). Предклинические исследования *in vivo* показали, что РИТУКСАН<sup>(R)</sup> способствует истощению В-клеток из периферической крови, лимфатических узлов и костного мозга макак-крабоедов, преимущественно в результате комплемент-зависимых и клеточно-опосредованных процессов (Reff et al. *Blood* 83(2): 435-445 (1994)).

Ритуксимаб был одобрен в Соединенных Штатах в ноябре 1997 для применения при лечении пациентов с рецидивирующей или рефрактерной низкодифференцированной или фолликулярной, CD20<sup>+</sup>-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомой (НХЛ) в режиме четырех еженедельных доз в количестве 375 мг/м<sup>2</sup>. В апреле 2001 года Комиссия по контролю за лекарствами и питательными

веществами (FDA) одобрила дополнительные пункты в связи с лечением низкодифференцированной НХЛ: повторное лечение (четырьмя еженедельными дозами) и дополнительную схему дозирования (восемью еженедельными дозами). Более 300000 пациентов подверглись действию ритуксимаба либо в виде монотерапии, либо в сочетании с иммунодепрессантами или с химиотерапевтическими средствами. Пациентов лечили также ритуксимабом в качестве поддерживающей терапии вплоть до двухлетнего периода (Hainsworth et al. *J Clin Oncol* 21: 1746-51 (2003); Hainsworth et al. *J Clin Oncol* 20: 4261-7 (2002)).

Действие ритуксимаба исследовали также при различных незлокачественных аутоиммунных расстройствах, в отношении которых считается, что В-клетки и антитела играют определенную роль в патофизиологии заболевания (Edwards et al. *Biochem Soc Trans* 30: 824-8 (2002)).

Сообщалось, что ритуксимаб потенциально облегчает признаки и симптомы ревматоидного артрита (РА) (Leandro et al. *Ann Rheum Dis*. 61: 883-8 (2002); Emery et al. *Arthritis Rheum* 48(9): S439 (2003)), волчанки (Eisenberg R. *Arthritis Res Ther* 5: 157-9 (2003); Leandro et al. *Arthritis Rheum* 46: 2673-7 (2002)), иммунной тромбоцитопении (D'Arena et al. *Leuk Lymphoma* 44: 561-2 (2003)), аутоиммунной анемии (Zaja et al. *Haematologica* 87: 189-95 (2002) (опечатка издана в *Haematologica* 87: 336 (2002)), аутоиммунной невропатии (Pestronk et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 485-9 (2003)), паранеопластического опсоклонус-миоклонус-синдрома (Pranzatelli et al. *Neurology* 60 (Suppl) P05.128: A395 (2003)) и возвратно-ремиттирующего рассеянного склероза (RRMS) (Cross et al. (Реферат) Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1 (2003)).

Среди пациентов с ревматоидным артритом (РА) проводили Фазу II испытания (WA 16291), обеспечившую 48-недельный дополнительный учет данных по безопасности и эффективности ритуксимаба (Emery et al. *Arthritis Rheum* 48(9): S439 (2003); Szczepanski et al. *Arthritis Rheum* 48(9): S121 (2003)). В общей сложности 161 пациента равномерно рандомизировали по четырем

группам, получавшим следующие препараты: отдельно метотрексат, отдельно ритуксимаб, ритуксимаб плюс метотрексат, ритуксимаб плюс циклофосфамид (СТХ). Режим лечения ритуксимабом соответствовал внутривенному введению 1 г в дни 1-й и 15-й. Инфузии ритуксимаба пациентам с РА хорошо переносились большей частью пациентов, при этом 36% пациентов испытывали по меньшей мере одно побочное действие в течение первой инфузии (по сравнению с 30% пациентов, получавших плацебо). В целом было сделано заключение, что побочные эффекты имели выраженность от слабой до умеренной и были равномерно распределены по всем группам. Всего было 19 серьезных побочных эффектов во всех четырех группах в течение 48 недель, которые проявлялись несколько чаще в группе ритуксимаб/СТХ. Встречаемость инфекций была равномерно сбалансирована во всех группах. Средняя частота возникновения серьезных инфекций в данной популяции пациентов с РА составляла 4,66 на 100 пациентов в год, что ниже частоты возникновения инфекций, требующих госпитализации, среди пациентов с РА (9,57 на 100 пациентов в год), согласно опубликованным данным эпидемиологического исследования по месту жительства (Doran et al. *Arthritis Rheum* 46: 2287-93 (2002)).

Был опубликован профиль безопасности ритуксимаба на малом количестве пациентов с неврологическими расстройствами, включая аутоиммунную невропатию (Pestronk et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 485-9 (2003)), опсоклонус-миоклонус-синдром (Pranzatelli et al. *Neurology* 60(Suppl1) P05.128: A395 (2003)) и RRMS (Cross et al. Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS (abstract) Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1 (2003)). В продолжающемся в настоящее время спонсируемом исследователем испытании (IST) ритуксимаба в сочетании с интерфероном-бета (IFN-бета) или глатирамер-ацетатом у субъектов с RRMS (Cross et al., выше), 1 из 10 принимающих лечение субъектов был госпитализирован на всю ночь для непрерывного контроля его состояния после перенесенной им умеренной температуры и озноба после первой инфузии ритуксимаба, тогда как остальные 9 субъектов завершили курс из

четыре инфузий без каких-либо заметных побочных явлений.

Патенты и патентные публикации относительно CD20-антител, CD20-связывающих молекул и аутоантигенных вакцин включают патенты США 5776456, 5736137, 5843439, 6399061 и 6682734, а также патентные заявки US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885, US 2005/0186205 и WO 1994/11026 (Anderson et al.); патент США 6455043, патентные заявки US 2003/0026804, US 2003/0206903 и WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez and White); US 2004/0213784 и WO 2000/27433 (Grillo-Lopez and Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO 2001/10461 (Rastetter White); WO 2001/10460 (White and Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, US 2002/0028178, WO 2001/34194 и WO 2002/22212 (Hanna and Hariharan); US 2002/0006404 и WO 2002/04021 (Hanna and Hariharan); US 2002/0012665, US 2005/0180975, WO 2001/74388 и патент США 6896885 (Hanna, N.); патентные заявки US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan and Hanna); US 2005/0123540 (Hanna et al.); US 2002/0009444 и WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858; US 2005/0112060, US 2002/0039557 и патент США 6846476 (White, C); патентные заявки US 2002/0128448 и WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); WO 2002/096948 (Braslawsky et al.); WO 2002/079255 (Reff and Davies); патенты США 6171586 и 6991790, и патентные заявки WO 1998/56418 (Lam et al); US 2004/0191256 и WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, патенты США 6194551, 6242195, 6528624 и 6538124 (Idusogie et al.); 7122637, патентные заявки US 2005/0118174, US 2005/0233382, US 2006/0194291, US 2006/0194290, US 2006/0194957 и WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd et al.); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al.); US 2002/0004587, US 2006/0025576 и WO 2001/77342 (Miller and Presta); US 2002/0197256 и WO 2002/078766 (Grewal, L); US 2003/0157108 и WO 2003/035835 (Presta, L.); патенты США 5648267, 5733779, 6017733 и 6159730, и патентные заявки WO 1994/11523 (Reff et al. по технологии экспрессии); патенты США

6565827, 6090365, 6287537, 6015542, 5843398 и 5595721 (Kaminski et al); 5500362, 5677180, 5721108, 6120767, 6652852 и 6893625, а также международная заявка WO 1988/04936 (Robinson et al); патенты США 6410391 (Zelsacher); 6224866 и международные заявки WO 2000/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); патенты США 7074403 (Goldenberg and Hansen); 7151164 (Hansen et al); патентные заявки US 2003/0133930; WO 2000/74718 и US 2005/0191300A1 (Goldenberg and Hansen); US 2003/0219433 и WO 2003/68821 (Hansen et al); WO 2004/058298 (Goldenberg and Hansen); WO 2000/76542 (Golay et [alpha]/.); WO 2001/72333 (Wolin and Rosenblatt); патенты США 6368596 (Ghetie et al); 6306393 и патентные заявки US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner and Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar et al); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US 2002/0009427 и US 2003/0185796 (Wolin et al); WO 2003/061694 (Sing and Siegall); US 2003/0219818 (Bohen et al); US 2003/0219433 и WO 2003/068821 (Hansen et al); US 2003/0219818 (Bohen et al); US 2002/0136719 (Shenoy et al); WO 2004/032828 и US 2005/0180972 (Wahl et al); и WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter). См. также патент США 5849898 и EP 330191 (Seed et al); EP 332865A2 (Meyer and Weiss); патент США 4861579 (Meyer et al); патентные заявки US 2001/0056066 (Bugelski et al); WO 1995/03770 (Bhat et al); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al); WO 2004/035607 и US 2004/167319 (Teeling et al); WO 2005/103081 (Teeling et al); US 2006/0034835, US 2006/0024300 и WO 2004/056312 (Lowman et al); US 2004/0093621 (Shitara et al); WO 2004/103404 (Watkins et al); WO 2005/000901 (Tedder et al); US 2005/0025764 (Watkins et al); US 2006/0251652 (Watkins et al.); WO 2005/016969 (Carr et al); US 2005/0069545 (Carr et al); WO 2005/014618 (Chang et al.); US 2005/0079174 (Barbera-Guillem and Nelson); US 2005/0106108 (Leung and Hansen); US 2005/0123546 (Umana et al.); US 2004/0072290 (Umana et al.); US 2003/0175884 (Umana et al.); и WO 2005/044859 (Umana et al.); WO 2005/070963 (Allan et al.); US 2005/0186216 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0202534 (Hayden-Ledbetter and

Ledbetter); US 2005/136049 (Ledbetter et al.); US 2003/118592 (Ledbetter et al.); US 2003/133939 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0202012 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0175614 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0180970 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0202028 (Hayden-Ledbetter and Ledbetter); US 2005/0202023 (Hayden-Ledbetter and Ledbetter); WO 2005/017148 (Ledbetter et al.); WO 2005/037989 (Ledbetter et al.); патенты США 6183744 (Goldenberg); 6897044 (Braslawski et al.); патентные заявки WO 2006/005477 (Krause et al.); US 2006/0029543 (Krause et al.); US 2006/0018900 (McCormick et al.); US 2006/0051349 (Goldenberg and Hansen); WO 2006/042240 (Iyer and Dunussi-Joannopoulos); US 2006/0121032 (Dahiyat et al.); WO 2006/064121 (Teillaud et al.); US 2006/0153838 (Watkins), CN 1718587 (Chen et al.); WO 2006/084264 (Adams et al.); US 2006/0188495 (Barren et al.); US 2004/0202658 и WO 2004/091657 (Benynes, K.); US 2005/0095243, US 2005/0163775, WO 2005/00351 и WO 2006/068867 (Chan, A.); US 2006/0135430 и WO 2005/005462 (Chan et al.); US 2005/0032130 и WO 2005/017529 (Beresini et al.); US 2005/0053602 и WO 2005/023302 (Brunetta, P.); US 2006/0179501 и WO 2004/060052 (Chan et al.); WO 2004/060053 (Chan et al.); US 2005/0186206 и WO 2005/060999 (Brunetta, P.); US 2005/0191297 и WO 2005/061542 (Brunetta, P.); US 2006/0002930 и WO 2005/115453 (Brunetta et al.); US 2006/0099662 и WO 2005/108989 (Chuntharapai et al.); CN 1420129A (Zhongxin Guojian Pharmaceutical); US 2005/0276803 и WO 2005/113003 (Chan et al.); US 2005/0271658 и WO 2005/117972 (Brunetta et al.); US 2005/0255527 и WO 2005/11428 (Yang, J.); US 2006/0024295 и WO 2005/120437 (Brunetta, P.); US 2006/0051345 и WO 2005/117978 (Frohna, P.); US 2006/0062787 и WO 2006/012508 (Hitraya, E.); US 2006/0067930 и WO 2006/31370 (Lowman et al.); WO 2006/29224 (Ashkenazi, A.); US 2006/0110387 и WO 2006/41680 (Brunetta, P.); US 2006/0134111 и WO 2006/066086 (Agarwal, S.); WO 2006/069403 (Ernst and Yansura); US 2006/0188495 и WO 2006/076651 (Dummer, W.); WO 2006/084264 (Lowman, H.); WO 2006/093923 (Quan and Sewell); WO 2006/106959 (Numazaki et al.); WO 2006/126069 (Morawala); WO 2006/130458

(Gazit-Bornstein et al.); US 2006/0275284 (Hanna, G.); US 2007/0014785 (Golay et al.); US 2007/0014720 (Gazit-Bornstein et al.); и US 2007/0020259 (Hansen et al.); US 2007/0020265 (Goldenberg and Hansen); US 2007/0014797 (Hitraya); US 2007/0224189 (Lazar et al.); WO 2007/014238 (Bruge and Brugger); и WO 2008/003319 (Parren and Baadsgaard). Некоторые из указанных публикаций включают, помимо прочего, лечение рассеянного склероза.

Публикации, касающиеся терапии ритуксимабом, включают следующие: Perotta and Abuel "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab" Abstract # 3360 *Blood* 10(1) (part 1-2): p.88B (1998); Stashi et al. "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" *Blood* 98(4): 952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro et al. "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis* 61: 833-888 (2002); Leandro et al. "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro et al. "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism* 46(1): 2673-2677 (2002); Edwards and Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40: 205-211 (2001); Edwards et al. "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 824-828 (2002); Edwards et al. "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S 197 (2002); Le vine and Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al. "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46: 2029-2033 (2002);

Hidashida et al. "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with Rituximab." Presented at the *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with Rituximab" Presented at the *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002; Specks et al. "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44(12): 2836-2840 (2001); Anolik et al., "B lymphocyte Depletion in the Treatment of Systemic Lupus (SLE): Phase I/II Trial of Rituximab (RITUXAN(R)) in SLE" *Arthritis And Rheumatism*, 46(9), S289-S289 Abstract 717 (October, 2002), and Albert et al, "A Phase I Trial of Rituximab (Anti-CD20) for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus" *Arthritis And Rheumatism*, 48(12): 3659-3659, Abstract LB9 (December, 2003); Martin and Chan "Pathogenic Roles of B cells in Human Autoimmunity: Insights from the Clinic" *Immunity* 20: 517-527 (2004); Cree et al. "An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica." *Neurology* 64(7): 1270-2 (2005); Cross et al. "Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." *J Neuroimmunol*, 180(1-2): 63-70 (2006); Bar-Or A. et al., "Safety, pharmacodynamics, and activity of Rituximab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I, multicentre, open-label clinical trial." *Ann Neurol* 63(3): 395-400 (2008); Hauser S. et al., "B-cell depletion with Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." *NEJM*, 358(7): 676-88, (2008); Hawker K et al., "Efficacy and Safety of rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized, double-blind, placebo - controlled, multicenter trial." *Multiple Sclerosis* 14(1): S299 (2008), Abstract; Hawker K et al., "Efficacy and Safety of rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial." *Neurology* 72(S3): A254 (2009),

Abstract.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение связано со способами лечения у пациентов прогрессирующего множественного склероза, включающими введение пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, при этом лечение основано на одной или нескольких характеристиках пациента, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях в момент начала лечения у пациента не диагностируется возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В некоторых воплощениях в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В некоторых воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления связан с подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления связан с олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего

периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения связано с рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В некоторых воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В некоторых воплощениях лечение сокращает время до получения подтвержденного прогрессирования заболевания. В некоторых воплощениях подтверждением того, что заболевание прогрессирует, является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В некоторых воплощениях, для обеспечения первоначального воздействия анти-CD20-антителом, пациенту вводят эффективное количество анти-CD20-антитела, составляющее приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов, с последующим введением второго анти-CD20-антитела, приблизительно составляющего от 0,3 примерно до 4,0 граммов. В некоторых воплощениях первоначальное воздействие анти-CD20-антителом и/или воздействие вторым анти-CD20-антителом соответствует количеству приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов. В некоторых воплощениях воздействие вторым антителом осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия антителом. В некоторых воплощениях каждое из указанных воздействий анти-CD20-антителом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз анти-CD20-антитела.

В некоторых воплощениях анти-CD20-антитело содержит: а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, при условии, что у указанного пациента обнаруживается одна или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (б) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом указанное лечение включает введение пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях на момент начала лечения у пациента не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В некоторых воплощениях в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В определенных воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой

жидкости. В определенных воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В определенных воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В некоторых воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В некоторых воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях лечение сокращает время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует. В определенных воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В определенных воплощениях, для обеспечения первоначального воздействия анти-CD20-антителом, пациенту вводят эффективное количество анти-CD20-антитела, составляющее приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов, с последующим

введением второго анти-CD20-антитела, составляющего приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов. В определенных воплощениях первоначальное воздействие анти-CD20-антителом и/или воздействие вторым анти-CD20-антителом соответствует количеству приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов. В определенных воплощениях воздействие вторым антителом осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия антителом. В определенных воплощениях каждое из указанных воздействий анти-CD20-антителом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит: а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и b) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими (а) выбор пациента с прогрессирующим множественным склерозом, при условии, что у указанного пациента обнаруживается одна или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, и (b) введение выбранному таким образом пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях на момент начала лечения у пациента не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В определенных воплощениях в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В определенных воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В некоторых воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения связано с рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях пациент дополнительно испытывает два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях лечение сокращает время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует. В определенных воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В определенных воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В определенных воплощениях, для обеспечения первоначального воздействия анти-CD20-антителом, пациенту вводят эффективное количество анти-CD20-антитела, составляющее приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов, с последующим введением второго анти-CD20-антитела, составляющего приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов. В определенных воплощениях первоначальное воздействие анти-CD20-антителом и/или воздействие вторым анти-CD20-антителом соответствует количеству приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов. В некоторых воплощениях воздействие вторым антителом осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия антителом. В некоторых воплощениях каждое из указанных воздействий анти-CD20-антитела обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и b) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано со способами установления того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению анти-CD20-антителом,

включающими установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом одна или более из указанных характеристик у пациента указывает на то, что пациент будет отвечать на лечение.

В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях на момент начала лечения у пациента не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В некоторых воплощениях в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В определенных воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В некоторых воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5

пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях указанный способ дополнительно включает выработку рекомендаций пациенту.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и b) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано также со способами идентификации пациента с прогрессирующим множественным склерозом, который, вероятнее всего, будет чувствителен к лечению анти-CD20-антителом, включающими следующее: (a) установление одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем

приблизительно 5 пунктов; и (b) идентификацию пациента, имеющего одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) по меньшей мере приблизительно одного из пунктов по Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), повысившегося в течение двухлетнего периода перед началом лечения анти-CD20-антителом, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях на момент начала лечения у пациента не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В некоторых воплощениях в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В определенных воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях показатель EDSS у пациента превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед

началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях указанный способ дополнительно включает выработку рекомендаций пациенту.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и b) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение дополнительно связано со способами маркетинга анти-CD20-антитела или его фармацевтически приемлемой композиции для применения в отношении субпопуляции пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, при этом указанные способы включают информирование целевой аудитории о применении анти-CD20-антитела для лечения пациентов указанной субпопуляции, характеризующихся как пациенты такой субпопуляции, которые имеют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно

Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях на момент начала лечения у указанной субпопуляции пациентов не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В определенных воплощениях в образце, взятом у указанной субпопуляции пациентов, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В некоторых воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у указанной субпопуляции пациентов показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В определенных воплощениях у субпопуляции пациентов показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях у указанной

субпопуляции пациентов дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст указанной субпопуляции пациентов составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано с изделиями промышленного производства, включающими совместно упакованные фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый носитель, а также этикетку, на которой отмечено (то есть указано), что указанное анти-CD20-антитело или фармацевтическая композиция предназначены для лечения пациентов со множественным склерозом, которые имеют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (б) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим

множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях на момент начала лечения у указанной субпопуляции пациентов не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В определенных воплощениях в образце, взятом у указанной субпопуляции пациентов, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В некоторых воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В определенных воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В определенных воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В некоторых воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях фармацевтическая композиция, содержащая анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый

носитель, находится в контейнере. В некоторых воплощениях указанный контейнер содержит приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов анти-CD20-антитела. В некоторых воплощениях указанный контейнер содержит приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях указанная этикетка содержит инструкции, при этом в инструкциях указано, что эффективное количество анти-CD20-антитела вводят пациенту для обеспечения первоначального воздействия анти-CD20-антителом в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов, с последующим воздействием вторым анти-CD20-антителом в количестве приблизительно от 0,3 примерно до до 4,0 граммов. В определенных воплощениях первоначальное воздействие анти-CD20-антителом и/или второе воздействие анти-CD20-антителом количественно составляет приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов. В определенных воплощениях второе воздействие осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия антителом. В определенных воплощениях каждое из указанных воздействий анти-CD20-антителом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Настоящее изобретение связано также со способами предсказания того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза,

при этом указанные способы включают установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом возраст, окрашивающиеся гадолинием поражения, повышение индекса EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения, индекс MSSS или их сочетание указывают на то, что субъект будет чувствителен к лечению.

В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях на момент начала лечения у указанной субпопуляции пациентов не был диагностирован возвратно-ремиттирующий множественный склероз.

В определенных воплощениях в образце, взятом у субъекта, дополнительно обнаруживается признак воспаления. В определенных воплощениях указанным образцом является образец спинномозговой жидкости. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен подъемом показателя IgG. В некоторых воплощениях признак воспаления отмечен олигоклональными полосами IgG, детектируемыми методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 15-летнего периода. В некоторых воплощениях у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода. В некоторых воплощениях повышение показателя EDSS в течение двухлетнего

периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях повышение показателя EDSS составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях указанное повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания. В определенных воплощениях у пациента дополнительно имеет место два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

В определенных воплощениях возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов или изделий промышленного производства у пациентов обнаруживается одна или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS).

Настоящее изобретение дополнительно связано со способами лечения множественного склероза у пациента, предусматривающими введение эффективного количества окрелизумаба указанному пациенту с целью обеспечения первоначального воздействия окрелизумабом в количестве, приблизительно составляющем от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с последующим вторым воздействием окрелизумабом в количестве, приблизительно составляющем от 0,3 примерно до 0,6 граммов, при этом указанное второе воздействие осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия, и каждое из указанных воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба.

В определенных воплощениях первоначальное воздействие

окрелизумабом количественно соответствует приблизительно 0,6 граммам. В некоторых воплощениях второе воздействие окрелизумабом количественно соответствует приблизительно 0,6 граммам. В определенных воплощениях второе воздействие осуществляют приблизительно не ранее чем через 24 недели после первоначального воздействия. В определенных воплощениях одной или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба. В определенных воплощениях одно или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде двух доз окрелизумаба. В определенных воплощениях первоначальное воздействие окрелизумабом включает введение первой дозы и второй дозы окрелизумаба, при этом первая доза и вторая доза окрелизумаба приблизительно составляет 0,3 грамма. В определенных воплощениях второе воздействие окрелизумабом включает введение единственной дозы окрелизумаба, при этом указанная единственная доза окрелизумаба составляет 0,6 граммов. В некоторых воплощениях указанные способы дополнительно включают обеспечение третьего воздействия окрелизумабом. В определенных воплощениях указанные способы дополнительно включают обеспечение четвертого воздействия окрелизумабом. В определенных воплощениях указанные способы дополнительно включают обеспечение пятого воздействия окрелизумабом. В некоторых воплощениях любого из указанных способов, данные способы дополнительно предусматривают приблизительно от одного примерно до трех последовательных воздействий.

Настоящее изобретение относится также к изделиям промышленного производства, включающим следующее: (a) контейнер, содержащий окрелизумаб; и (b) вкладыш в упаковку с инструкциями по лечению множественного склероза у пациента, при этом в инструкциях указано, что пациенту вводят количество окрелизумаба, которое эффективно для обеспечения первоначального воздействия окрелизумабом и которое приблизительно составляет от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с последующим введением окрелизумаба для второго воздействия в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с

оговоркой, что второе воздействие окрелизумабом осуществляют приблизительно не ранее чем через 16-60 недель после первоначального, и что каждое из воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба.

В определенных воплощениях первоначальное воздействие окрелизумабом производят в количестве, приблизительно составляющем 0,6 граммов. В некоторых воплощениях второе воздействие окрелизумабом производят в количестве, приблизительно составляющем 0,6 граммов. В некоторых воплощениях второе воздействие окрелизумабом осуществляют приблизительно не ранее чем через 24 недели после первоначального воздействия. В определенных воплощениях одно или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной дозы окрелизумаба. В некоторых воплощениях одно или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде двух доз окрелизумаба. В некоторых воплощениях первоначальное воздействие включает первую дозу и вторую дозу окрелизумаба, при этом первая доза и вторая доза окрелизумаба приблизительно составляет 0,3 грамма. В некоторых воплощениях указанные инструкции дополнительно включают возможность обеспечения третьего воздействия окрелизумабом. В определенных воплощениях инструкции дополнительно включают возможность обеспечения четвертого воздействия окрелизумабом. В некоторых воплощениях инструкции дополнительно включают возможность обеспечения пятого воздействия окрелизумабом. В некоторых воплощениях любого из указанных способов инструкции дополнительно включают возможность обеспечения приблизительно от одного примерно до трех последовательных воздействий окрелизумабом.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фиг. 1А показано выравнивание последовательностей при сравнении аминокислотных последовательностей переменного домена легкой цепи ( $V_L$ ) каждой из следующих последовательностей: мышинной 2H7 (SEQ ID NO: 1), гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO:2) легкой капзацепи подгруппы I (SEQ ID NO:3). Областями CDR переменного домена легкой цепи ( $V_L$ ) мышинной 2H7 и hu2H7.v16 являются

следующие: CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:5) и CDR3 (SEQ ID NO:6).

На фиг. 1B показано выравнивание последовательностей при сравнении аминокислотных последовательностей переменного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) каждой из следующих последовательностей: мышины 2H7 (SEQ ID NO:7), гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO: 8) и человеческой консенсусной последовательности тяжелой цепи подгруппы III (SEQ ID NO:9). Области CDR переменного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) мышины 2H7 и hu2H7.v16 являются следующие: CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11) и CDR3 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 1A и фиг. 1B, как показано, области CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой цепи, заключенные в скобки, фланкированы участками рамки считывания, FR1-FR4. 2H7 относится к мышинному антителу 2H7. Звездочками между рядами последовательностей указаны положения, которые в конкретных двух последовательностях отличаются. Нумерация остатков соответствует нумерации Kabat et al. *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), со вставками, показанными в виде a, b, c, d, e.

На фиг. 2 приведена аминокислотная последовательность легкой цепи зрелого варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO: 13).

На фиг. 3 приведена аминокислотная последовательность тяжелой цепи зрелого варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO: 14).

На фиг. 4 приведена аминокислотная последовательность тяжелой цепи зрелого варианта 2H7.v31 (SEQ ID NO: 15). L-цепь варианта 2H7.v31 такая же, что и в варианте 2H7.v16.

На фиг. 5 показано выравнивание легких цепей зрелых вариантов 2H7.v16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO. 13 и 16, соответственно), с нумерацией остатков переменного домена по Кабату и с нумерацией остатков константного домена Eu.

На фиг. 6 показано выравнивание тяжелых цепей зрелых вариантов 2H7.v16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO. 14 и 17, соответственно), с нумерацией остатков переменного домена по

Кабату и с нумерацией остатков константного домена Eu.

На фиг. 7 представлено краткое описание проведения исследования в связи с лечением возвратно-ремиттирующего множественного склероза с использованием окрелизумаба.

На фиг. 8 приведены графики Каплана-Мейера для зависимости временного интервала до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, у субъектов в группах плацебо и ритуксимаба.

На фиг. 9 показано срединное значение изменения в объеме T2-повреждений от исходного значения до значения, полученного на 96 неделе. На оси Y отражен объем T2-повреждений в мм<sup>3</sup>.

На фиг. 10 представлена сумма исходных характеристик и относительный риск у субъектов в группах плацебо и ритуксимаба.

На фиг. 11 приведены результаты многофакторного анализа аддитивных прогностических эффектов возраста и очагов гадолинийсодержащих (Gd) повреждений в отношении результата лечения в группах плацебо и ритуксимаба. На фиг. 11A приведены результаты многофакторного анализа для возраста <51 и исходных Gd=0. На фиг. 11B приведены результаты многофакторного анализа для возраста =51 и исходных Gd=0. На фиг. 11C приведены результаты многофакторного анализа для возраста <51 и исходных Gd-повреждений =1. На фиг. 11D приведены результаты многофакторного анализа для возраста =51 и исходных Gd-повреждений =1.

На фиг. 12 приведены результаты многофакторного анализа аддитивных прогностических эффектов возраста и оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS) в отношении результата лечения в группах плацебо и ритуксимаба. На фигуре 12A приведены результаты многофакторного анализа для возраста =55 и MSSS<5. На фиг. 12B приведены результаты многофакторного анализа для возраста >55 и MSSS<5. На фиг. 12C приведены результаты многофакторного анализа для возраста =55 и MSSS=5. На фиг. 12D приведены результаты многофакторного анализа для возраста >55 и MSSS=5.

На фиг. 13 показаны графики Каплана-Мейера для зависимости временного интервала до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, у субъектов в группах плацебо и ритуксимаба со

следующими характеристиками: возраст =55; 3 = исходное значение по шкале EDSS=6,5; исключались пациенты с длительностью заболевания >10 лет, если их исходный уровень EDSS <5, или с длительностью заболевания >15, если их исходный уровень EDSS=5.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### I. Определения

"В-клетка" представляет собой лимфоцит, который созревает в костном мозге, и включает «наивную», или «интактную», В-клетку, В-клетку памяти или В-клетку-эффектор (плазматические клетки). Здесь В-клетка может быть нормальной или незлокачественной В-клеткой.

Здесь "маркер поверхности В-клетки", или "антиген поверхности В-клетки", представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности В-клетки, на который может быть нацелено антитело, которое с ним связывается. Примеры маркеров поверхности В-клеток включают маркеры CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 и CD86 поверхности лейкоцитов (их описание см. в кн.: The Leukocyte Antigen Facts Book, 2<sup>nd</sup> Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Другие маркеры поверхности В-клеток включают RP 105, FcRH2, В-клеточный CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, ВСМА и 239287. В-клеточный поверхностный маркер, представляющий здесь особый интерес, предпочтительно экспрессируется на В-клетках, по сравнению с другими, не относящимися к В-клеткам, тканями млекопитающих, и может быть экспрессирован как на В-клетках-предшественниках, так и на зрелых В-клетках. Здесь предпочтительным поверхностным маркером В-клеток является CD20.

Антиген "CD20", или просто "CD20", является негликозилированным фосфопротеином приблизительно в 35 кДа, обнаруживаемым на поверхности более чем 90% В-клеток из периферической крови и лимфоидных органов. CD20 присутствует как на поверхности нормальных В-клеток, так и на злокачественных В-клетках, однако не экспрессируется на

стволовых клетках. Другие встречающиеся в литературе названия CD20 включают "В-лимфоцит-рестриктированный антиген" и "Bp35". Антиген CD20 описан, например, у Clark et al. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 82: 1766 (1985).

Здесь "антагонист антитела" представляет собой антитело, которое, при связывании с поверхностным маркером В-клетки, разрушает или истощает В-клетки у млекопитающих и/или препятствует реализации одной или нескольких функций В-клеток, например, путем редуцирования или предотвращения гуморального ответа, реализуемого В-клетками. Антагонист антитела предпочтительно способен истощить В-клетки (то есть уменьшить уровень циркулирующих В-клеток) у обработанного им млекопитающего. Такого истощения можно достичь путем различных механизмов, таких как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование пролиферации В-клеток и/или индукция гибели В-клеток (например, путем апоптоза).

"Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "ADCC" относятся к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки-природные киллеры (NK, Natural Killer), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис указанной клетки-мишени. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоетических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в публикации Ravetch и Kinet, 9: 457-92 (1991). Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы можно предпринять *in vitro* анализ ADCC, например, такой, который описан в патенте США No. 5500362 или 5821337. Используемые для таких анализов клетки-эффекторы включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллеры (NK-клетки). Альтернативно или дополнительно, ADCC-

активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой, например, которая описана Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

"Человеческими клетками-эффекторами" являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. В некоторых воплощениях указанные клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которыми опосредована ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные киллеры (NK-клетки), моноциты, цитотоксические T-клетки и нейтрофилы; при этом клетки PBMC и NK-клетки являются предпочтительными.

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" используются для обозначения рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых воплощениях FcR представляет собой интактную («наивную») последовательность человеческого FcR. Более того, предпочтительный FcR является таким Fc-рецептором, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор), и он включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и такие формы указанных рецепторов, которые получены в результате альтернативного сплайсинга. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые прежде всего отличаются своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (см. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Обзор по рецепторам FcR можно найти в публикациях Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); а также de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая и те, которые могут быть идентифицированы в будущем, охватываются здесь термином "FcR".

Указанный термин включает также и неонатальный рецептор, FcRn, который ответственен за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

"Комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется в результате связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента может быть предпринят анализ CDC, например, как описано у Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

"Ингибирующими рост" антителами являются такие антитела, которые предотвращают или уменьшают пролиферацию клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается данное антитело. Например, антитело может предотвратить или уменьшить пролиферацию В-клеток *in vitro* и/или *in vivo*.

Антителами, которые "индуцируют апоптоз", являются такие антитела, которые индуцируют запрограммированную гибель клеток, например, В-клеток, что определяется посредством стандартных анализов апоптоза, таких как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, уменьшение клеток в объеме, дилатация эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами).

Термин "антитело" используется здесь в наиболее широком смысле и охватывает, в частности, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных молекул, а также фрагменты антител, при условии, что они проявляют требуемую от них биологическую активность.

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, предпочтительно содержащую его антиген-связывающую область. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv-

фрагменты; диатела; линейные антители; молекулы одноцепочечных антител; а также мультиспецифические антители, образованные из фрагментов антител.

В свете преследуемых здесь целей "интактным антителом" является антиген, содержащий переменные домены легкой цепи и тяжелой цепи, а также Fc-область.

"Нативными антителами" обычно являются гетеротетрамерные гликопротеины приблизительно в 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как количество дисульфидных связей между тяжелыми цепями иммуноглобулинов различных изотипов варьирует. Каждая тяжелая цепь и легкая цепь имеют также регулярно расположенные межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен ( $V_H$ ) с последующим рядом константных доменов. Каждая легкая цепь имеет на одном конце переменный домен ( $V_L$ ), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Конкретные аминокислотные остатки, по-видимому, образуют поверхность контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин "переменный" относится к тому факту, что последовательности определенных частей переменных доменов существенно отличаются между антителами и используются для придания специфичности каждому конкретному антителу и для связывания антитела с его конкретным антигеном. Однако переменность распределена вдоль переменных доменов антител неравномерно. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых гиперпеременными областями, как в переменных доменах легких цепей, так и в переменных доменах тяжелых цепей. Более высококонсервативные области переменных доменов называются областями рамки считывания (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых цепей и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающие бета-складчатую пространственную

конфигурацию, соединенную тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях частично образующие, бета-складчатую структуру. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством рамок считывания FR и, совместно с гипервариабельными областями из другой цепи, способствуют образованию антиген-связывающего участка антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены непосредственно в связывании антитела с антигеном не участвуют, однако они проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антиген-связывающих фрагментов, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых имеет единственный антиген-связывающий участок, и оставшегося "Fc"-фрагмента, название которого отражает его выраженную способность к кристаллизации. Обработка пепсином приводит к образованию  $F(ab')_2$ -фрагмента, который имеет два антиген-связывающих участка и все еще сохраняет способность к образованию поперечной связи с антигеном.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который полностью содержит антиген-распознающий и антиген-связывающий участок. Эта область состоит из димера вариабельного домена одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, находящихся в тесной нековалентной ассоциации друг с другом. Именно в такой конфигурации три указанные гипервариабельные области каждого вариабельного домена взаимодействуют, образуя антиген-связывающий участок на поверхности  $V_H$ - $V_L$ -димера. В совокупности шесть указанных гипервариабельных областей придают антителу специфичность связывания антигена. Однако даже единственный вариабельный домен (или половина Fv-фрагмента, содержащая только три гипервариабельные области, специфичные в отношении антигена) обладают способностью распознавать и

связывать антиген, правда, с меньшим сродством, чем полный связывающий участок.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что в них содержится несколько добавочных остатков на карбокси-конце тяжелой цепи CH1-домена, включая один или более цистеинов из шарнирной области. Fab'-SH является здесь обозначением, предназначенным для Fab', в котором цистеиновый остаток(остатки) константных доменов несет по меньшей мере одну свободную тиоловую группу. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антитела первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми имеются цистеины шарнирной области. Известны также и другие химические соединения между фрагментами антител.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) из любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух совершенно разных типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ) на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, антитела могут быть отнесены к разным классам. Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на субклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам антител, называются, соответственно, α, δ, ε, γ и μ. Субъединичная структура и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов известны.

"Одноцепочечный Fv-", или "scFv-" фрагмент антитела содержит V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены антитела, при этом указанные домены представлены в виде одноцепочечной полипептидной цепи. В некоторых воплощениях Fv-полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-доменами, которые позволяют фрагменту scFv образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. В качестве обзора в связи с scFv см.

Plückthun, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к малым фрагментам антитела с двумя антиген-связывающими участками, при этом указанные фрагменты содержат варибельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), соединенную с варибельной областью легкой цепи ( $V_L$ ) в одной и той же полипептидной цепи ( $V_H - V_L$ ). С помощью линкера, который слишком короток для того, чтобы возможно было спаривание между двумя указанными доменами на одной и той же цепи, эти домены вынужденно спариваются с комплементарными доменами другой цепи, образуя в результате два антиген-связывающих участка. Диатела более подробно описаны, например, в документах EP 404097; WO 93/11161; а также у Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Здесь термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальных антител, содержащих популяцию антител, которые идентичны друг другу и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые могут быть получены в процессе продуцирования моноклональных антител - обычно такие варианты присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело направлено на единственную детерминанту на антигене. Помимо их специфичности, моноклональные антитела являются предпочтительными в том отношении, что они не содержат примесей других иммуноглобулинов. Уточняющее определение "моноклональное" указывает на характер антитела в том отношении, что оно получено из по существу гомогенной популяции антител, а не сконструировано каким-нибудь особым способом получения антител с требуемой специфичностью. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью гибридного способа, впервые описанного Kohler с соавт.,

*Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены с использованием технологий рекомбинантной ДНК (см., например, патент США No. 4816567). "Моноклональные антитела" могут быть также изолированы из фаговой библиотеки антител с использованием технологий, описанных, например, Clackson с соавт., *Nature*, 352: 624-628 (1991), и Marks с соавт., *J. Mol. Biol*, 222: 581-597 (1991).

Здесь моноклональные антитела специфически включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная цепь(цепи) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они обладают требуемой биологической активностью (Патент США No. 4816567; Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Представляющие здесь интерес химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антиген-связывающие последовательности вариабельного домена, полученные из не принадлежащего человеческому роду примата (например, обезьяны Старого света, такой как павиан, макак-резус или макак-крабоед), и последовательности человеческой константной области (Патент США No. 5693780).

"Гуманизированными" не принадлежащими человеческому роду (например, мышинными) формами антител являются химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности, полученные из не принадлежащего к человеческому роду иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентское антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области не принадлежащего человеческому роду представителя (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик, или не принадлежащего человеческому роду примата, обладающими

требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки области рамки считывания (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками не принадлежащего человеческому роду представителя. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентском антителе или в донорском антителе. Указанные модификации производят для дополнительного усовершенствования эффективности антитела. Обычно гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют таковым у не принадлежащего человеческому роду иммуноглобулина, и все или по существу все из FR являются последовательностью рамок считывания человеческого иммуноглобулина, за исключением замены (замен), как указано выше. Гуманизированное антитело необязательно будет содержать также по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно таковую человеческого иммуноглобулина. Более подробно см. Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332: 323-329 (1988); а также Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Используемый здесь термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области", или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), в переменном домене легкой цепи и остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), и/или аминокислотные остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и остатки 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Остатки "рамки

считывания", или "FR", являются остатками вариабельного домена, отличными от определяемых здесь остатков гипервариабельной области.

"Голым антителом" является (как здесь описано) антитело, которое не конъюгировано с гетерологичной молекулой, такой как цитотоксический фрагмент или радиоактивная метка.

Примеры анти-CD20-антител включают "С2В8", который теперь называют "ритуксимабом" ("РИТУКСАН<sup>(R)</sup>/МАВТЕРА<sup>(R)</sup>") (патент США 5736137); меченное иттрием-90 мышинное антитело 2В8, обозначаемое "Y2В8", или "ибритумомаб тиуксетан" (ЗЕВАЛИН<sup>(R)</sup>), коммерчески доступное от производителя Biogen Idec, Inc. (например, патент США 5736137; 2В8 депонировано в АТСС под регистрационным номером no. НВ11388 22 июня 1993); мышинный IgG2a "В1", также называемый "тозитумомабом", необязательно меченный <sup>131</sup>I для выработки антитела "131I-В1", или "йодин-1131-тозитумомаба" (БЕКСАР<sup>(TM)</sup>), коммерчески доступного от производителя Corixa (см. также, например, патент США 5595721); мышинное моноклональное антитело "1F5" (например, Press et al. *Blood* 69(2): 584-591 (1987), и его варианты, включая "framework patched" или гуманизированное 1F5 (например, WO 2003/002607, Leung, S.; АТСС-депозит НВ-96450); мышинное антитело 2Н7 и химерное антитело 2Н7 (например, патент США 5677180); антитело 2Н7 (например, WO 2004/056312 (Lowman et al.) и как было указано выше); полностью человеческое HUMAX-CD20<sup>(TM)</sup> (офатумумаб), высокоаффинное антитело, нацеленное на молекулу CD20 в клеточной мембране В-клеток (Genmab, Denmark; см., например, Glennie and van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) и Cragg et al, *Blood* 101: 1045-1052 (2003)); человеческие моноклональные антитела, предложенные в международных заявках WO 2004/035607 и WO 2005/103081 (Teeling et al, GenMab/Medarex); антитела, имеющие комплексные N-гликозид-соединенные сахарные цепи, связанные с Fc-областью, описанные в патентной заявке США 2004/0093621 (Shitara et al); химеризованное или гуманизированное антитело, обладающее высокой аффинностью в отношении внеклеточного эпитопа антигена CD20, описанного в международной заявке WO 2006/106959

(Numazaki et al, Biomedics Inc.); моноклональные антитела и антиген-связывающие фрагменты, взаимодействующие с CD20 (например, WO 2005/000901, Tedder et al.), такие как HB20-3, HB20-4, HB20-25 и MB20-11; одноцепочечные белки, связывающиеся с CD20, включая, но не ограничиваясь перечисленным, TRU-015 (например, патентные заявки США US 2005/0186216 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); US 2005/0202534 (Hayden-Ledbetter and Ledbetter); US 2005/0202028 (Hayden-Ledbetter and Ledbetter); US 2005/136049 (Ledbetter et al.); US 2005/0202023 (Hayden-Ledbetter and Ledbetter) - Trubion Pharm Inc.); CD20-связывающие молекулы, такие как серия антител АМЕ, например, АМЕ-133<sup>(TM)</sup>-антитела, описанные, например, в международной заявке WO 2004/103404; в патентных заявках США US 2005/0025764; и US 2006/0251652 (Watkins et al, Applied Molecular Evolution, Inc.), и анти-CD20-антитела с Fc-мутациями, как описано, например, в международной заявке WO 2005/070963 (Allan et al., Applied Molecular Evolution, Inc.); CD20-связывающие молекулы, такие как те, что описаны в документах WO 2005/016969 и US 2005/0069545 (Carr et al); биспецифические антитела, описанные, например, в документе WO 2005/014618 (Chang et al); гуманизированные моноклональные антитела LL2 и другие анти-CD20-антитела, как описано, например, в патенте США 7151164 (Hansen et al, Immunomedics; US 2005/0106108 (Leung and Hansen; Immunomedics); полностью человеческие антитела против CD20, как описано, например, в документе WO 2006/130458; Gazit et al, Amgen/AstraZeneca); антитела против CD20, как описано, например, в документе WO 2006/126069 (Morawala, Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd.); химерные или гуманизированные B-Ly1-антитела против CD20 (например, GA-101), как описано, например, в документах WO 2005/044859; US 2005/0123546; US 2004/0072290; и US 2003/0175884 (Umana et al; GlycArt Biotechnology AG); A20-антитело или его варианты, такие как химерное или гуманизированное антитело против CD20 (сA20, hA20, соответственно), и IMMUN-106 (например, документ US 2003/0219433, Immunomedics); и моноклональные антитела L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 или NU-B2, доступные в International

Leukocyte Typing Workshop (например, Valentine et al, In: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). В некоторых воплощениях описанными здесь анти-CD20-антителами являются химерные, гуманизированные или человеческие анти-CD20-антитела, более предпочтительно, ритуксимаб, антитело 2H7, химерное или гуманизированное антитело A20 (Immunomedics) и человеческое анти-CD20-антитело HUMAX-CD20<sup>(TM)</sup> (Genmab).

Используемые здесь термины "ритуксимаб" или "РИТУКСАН<sup>(R)</sup>" относятся к генно-инженерному химерному мышиному/человеческому моноклональному антителу, направленному на антиген CD20 и обозначаемому "C2B8" в патенте США No. 5736137, включая их фрагменты, которые сохраняют способность связываться с CD20. Ритуксимаб коммерчески доступен из компании Genentech.

Исключительно в целях, связанных с настоящим изобретением, и если специально не указано иное, под "гуманизированным 2H7" подразумевается гуманизированное антитело, которое связывается с человеческим CD20, или его антиген-связывающий фрагмент, причем указанное антитело эффективно в отношении истощения В-клеток приматов *in vivo*, при этом указанное антитело содержит в своей переменной области Н-цепи ( $V_H$ ) по меньшей мере последовательность CDR H3 последовательности SEQ ID NO: 12 (Fig. 1B) из антитела против человеческого CD20 и, по существу, консенсусные остатки человеческой рамки считывания (FR) подгруппы III тяжелой цепи ( $V_{HIII}$ ). В некоторых воплощениях указанное антитело дополнительно содержит последовательность Н-цепи CDR H1 последовательности SEQ ID NO: 10 и последовательность CDR H2 последовательности SEQ ID NO: 11, а в некоторых воплощениях дополнительно содержит последовательность L-цепи CDR L1 последовательности SEQ ID NO:4, последовательность CDR L2 последовательности SEQ ID NO:5, последовательность CDR L3 последовательности SEQ ID NO:6 и, по существу, консенсусные остатки человеческой рамки считывания (FR) подгруппы I (VI), при этом  $V_H$ -область может быть присоединена к константной области человеческой IgG-цепи, причем указанной областью может быть, например, IgG1 или IgG3.

В некоторых воплощениях такое антитело содержит последовательность  $V_H$  последовательности SEQ ID NO:8 (v16, как показано на фиг. 1B), необязательно содержит также последовательность  $V_L$  последовательности SEQ ID NO:2 (v16, как показано на фиг. 1A), в которой могут быть аминокислотные замены D56A и N100A в H-цепи и S92A в L-цепи (v96). В некоторых воплощениях указанное антитело является интактным антителом, содержащим аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи, последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно, как показано на фиг. 2 и 3. В некоторых воплощениях указанным антителом является 2H7.v31, содержащее аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи, последовательности SEQ ID NO: 13 и 15, соответственно, как показано на фиг. 2 и 4. Здесь антитело может дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая способствует улучшению активности ADCC (антитело-зависимой клеточной цитотоксичности) и/или CDC, например, в случае, когда аминокислотными заменами являются S298A/E333A/K334A, а в некоторых воплощениях 2H7.v31 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 (как показано на фиг. 4). Любые из указанных антител могут дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая способствует снижению активности CDC, например, содержать по меньшей мере замену K322A. См. патент США No. 6528624B1 (Idusogie et al).

Используемый здесь термин "окрелизумаб" относится к генно-инженерному гуманизированному моноклональному антителу против антигена CD20 и содержащему (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, включая их фрагменты, которые сохраняют способность связываться с CD20. Окрелизумаб является коммерчески доступным от компании Genentech.

"Изолированным" антителом является антитело, которое идентифицировано и отделено и/или получено из компонента его природного окружения. Примесными компонентами его природного

окружения являются материалы, которые являются помехой при диагностике или терапевтических применениях указанного антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. В некоторых воплощениях указанное антитело будет очищено (1) более чем на 95% по массе антитела, определяемой методом Лоури, а в некоторых воплощениях более чем на 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при ДСН-ПААГ в восстановительных или невосстановительных условиях при окрашивании Кумасси голубым или, в некоторых воплощениях, серебром. Изолированное антитело включает также антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, если по меньшей мере один из компонентов природного окружения указанного антитела будет отсутствовать. Однако, как правило, изолированное антитело получают, используя по меньшей мере одну стадию очистки.

Используемые здесь термины "субъект" или "пациент" означают субъекта или пациента человеческого происхождения. Обычно такой субъект или пациент подходит для лечения множественного склероза. Для указанных здесь целей таким подходящим субъектом или пациентом является тот, кто испытывает, испытал или вероятнее всего испытает один или более признаков, симптомов или других показателей множественного склероза; у которого диагностирован множественный склероз, независимо от того, является ли данное заболевание, например, вновь диагностированным (с "впервые выявленным" РС), диагностированным ранее, с новым рецидивом или обострением, ранее диагностированным и находящимся в состоянии ремиссии, и т.д.; и/или который подвержен определенному риску развития множественного склероза. Страдающий от множественного склероза или подверженный риску развития множественного склероза необязательно может быть идентифицирован как лицо, подвергнутое скринингу на предмет выявления повышенных уровней CD20-положительных В-клеток в сыворотке, спинномозговой жидкости (СМЖ) и/или в очаге поражения (поражений) РС, и/или подвергнутое

скринингу с помощью анализа для выявления аутоантител, оцениваемых качественно и, предпочтительно, количественно. Обычно такие аутоантитела, ассоциированные со множественным склерозом, включают антитело против миелинового основного белка (МВР), антитело против миелинового олигодендроцитарного гликопротеина (МОГ), антитела против ганглиозидов и/или против нейрофиламентов. Такие аутоантитела могут быть детектированы у субъекта в сыворотке, в спинномозговой жидкости (СМЖ) и/или в очаге поражения РС. Под "повышенным" уровнем (уровнями) аутоантитела или В-клеток здесь подразумевается уровень (уровни) таких аутоантител или В-клеток, который значительно превышает уровень (уровни) у индивида в отсутствие РС.

Используемые здесь "лечение" или "обработка" связаны с подходом для получения благотворных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей настоящего изобретения, благотворные или желаемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, одно или более явлений из следующего: снижения одного или более симптомов, связанных с данной болезнью, уменьшения степени выраженности данного заболевания, стабилизации болезни (например, предотвращения или отсрочки ухудшения состояния болезни), отсрочки или замедления прогрессирования заболевания, улучшения состояния болезни, снижения дозы одного или нескольких других лекарственных средств, необходимых для лечения данного заболевания, и/или повышения качества жизни.

Используемый здесь термин "отсрочка" прогрессирования множественного склероза означает задержку, торможение, замедление, отставание, стабилизацию и/или отдаление развития данного заболевания. Такая отсрочка может быть различной по времени, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, подвергаемого лечению.

Здесь "во время начала лечения" относится к временному периоду, когда производят первое воздействие, или к периоду перед первым воздействием лекарственного средства от множественного склероза, такого как анти-CD20-антитело. В некоторых воплощениях "во время начала лечения" составляет

приблизительно около одного года, девяти месяцев, шести месяцев, трех месяцев, двух месяцев или одного месяца перед воздействием лекарственного средства от множественного склероза, такого как анти-CD20-антитело. В некоторых воплощениях "во время начала лечения" совпадает с моментом непосредственно перед первым воздействием лекарственного средства от множественного склероза, такого как анти-CD20-антитело.

Здесь "основано на" включает (1) оценку, определение или измерение характеристик пациента, как здесь описано (и, предпочтительно, выбор пациента, подходящего для получения лечения; и (2) назначения лечения (нескольких видов лечения), как описано в настоящей заявке.

"Симптомом" РС является любой патологический феномен или отклонение от нормы в отношении структуры, функции или ощущения, испытываемого субъектом и показательного для РС.

"Множественный склероз" относится к хроническому и часто инвалидизирующему заболеванию центральной нервной системы, характеризующемуся прогрессирующей деструкцией миелина. Существует четыре признанных на международном уровне формы РС, а именно, первично прогрессирующий множественный склероз (PPMS), возвратно-ремиттирующий множественный склероз (RRMS), вторично прогрессирующий множественный склероз (SPMS) и прогрессирующе-рецидивирующий множественный склероз (PRMS).

Используемый здесь термин "прогрессирующий множественный склероз" относится к первично прогрессирующему множественному склерозу (PPMS), вторично прогрессирующему множественному склерозу (SPMS) и прогрессирующе-рецидивирующему множественному склерозу (PRMS). В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз характеризуется документированной необратимой потерей неврологической функцией, стойко продолжающейся в течение 6 месяцев, которую нельзя объяснить клиническим рецидивом заболевания.

"Первично прогрессирующий множественный склероз", или "PPMS", характеризуется постепенным прогрессированием заболевания, с самого начала, без каких-либо отчетливых

периодов рецидивов и ремиссий. Возможны периоды выравнивания активности заболевания, и могут быть хорошие или плохие дни или недели. PPMS отличается от RRMS и SPMS тем, что начало заболевания обычно возникает в конце третьего десятилетия - начале четвертого десятилетия жизни, мужчины заболевают так же часто, как и женщины, и вначале активность заболевания затрагивает спинной, а не головной, мозг. PPMS часто мигрирует в головной мозг, однако поражение участков головного мозга при этой форме менее вероятно, чем при RRMS или SPMS. Например, у индивидов с PPMS с меньшей вероятностью, чем в случаях RRMS или SPMS, развиваются когнитивные проблемы. PPMS является подтипом РС, при котором сканирующая ЯМР-томография позволяет выявить очаги воспаления (усиленные гадолинием). Первично прогрессирующая форма данного заболевания поражает от 10 до 15% людей, болеющих множественным склерозом. PPMS можно определить в соответствии с критериями, описанными McDonald с соавт. *Ann Neurol* 50: 121-7 (2001). Здесь подвергаемым лечению субъектом с формой PPMS обычно является субъект, у которого диагноз PPMS является установленным или весьма вероятным.

"Возвратно-ремиттирующий множественный склероз", или "RRMS", характеризуется рецидивами (известными также как обострения), во время которых могут возникнуть новые симптомы, а старые возобновляются и ухудшаются. За рецидивами следуют периоды ремиссии, в течение которых пациент полностью или частично восстанавливается после дефицитов, приобретаемых в рецидивирующий период. Рецидивы могут длиться в течение дней, недель или месяцев, и восстановление может быть медленным и постепенным или же почти мгновенным. У подавляющего большинства людей с РС сначала диагностируют RRMS. Обычно он возникает в возрасте от двадцати, с чем-то до тридцати, с чем-то лет, хотя известны также и случаи со значительно более ранним или более поздним таким диагнозом. Женщины заболевают указанным подтипом РС вдвое чаще, чем мужчины. Во время рецидивов миелин, защитная изолирующая оболочка вокруг нервных волокон (нейронов) в областях белого вещества центральной нервной системы (ЦНС), в процессе воспалительного ответа может быть поврежден

собственной иммунной системой организма. Это вызывает широкий спектр неврологических симптомов, которые существенно варьируют, в зависимости от того, какие именно области ЦНС поражаются. Сразу же после рецидива воспалительный ответ спадает, и глиальные клетки специального типа в ЦНС (называемые олигодендроцитами) осуществляют ремиелинизацию - процесс, при котором миелиновая оболочка вокруг аксона может быть восстановлена. Именно такая ремиелинизация может быть ответственна за ремиссию. Приблизительно у 50% пациентов с RRMS в течение 10 лет после запуска процесса заболевание переходит в форму SPMS. Через 30 лет такая форма охватывает уже до 90% пациентов. Единовременно возвратно-ремиттирующая форма заболевания охватывает приблизительно 55% всех больных РС.

"Вторично прогрессирующий множественный склероз", или "SPMS", характеризуется устойчивым прогрессированием клинического неврологического поражения, с наступлением или без наступления отчетливых периодов рецидивов и минорных периодов ремиссий и выхода активности заболевания на плато. Больные, у которых развилась форма SPMS, на более ранней стадии страдают формой RRMS в течение определенного периода, который может длиться приблизительно от двух лет до сорока и более лет. Имеют место периоды без каких-либо отчетливых рецидивов и ремиссий, которые со временем имеют тенденцию к затуханию. С момента запуска вторично прогрессирующей фазы заболевания инвалидность начинает развиваться значительно быстрее, чем она развивалась на стадии RRMS, хотя и у некоторых индивидов этот процесс может протекать довольно медленно. Приблизительно у 50% пациентов с RRMS через 10 лет развивается форма SPMS данного заболевания. Через 25-30 лет такая форма охватывает уже до 90% пациентов. Форма SPMS ассоциируется с более низкими уровнями образования воспалительных поражений, чем RRMS, однако общая отягощенность заболевания продолжает прогрессировать. Единовременно форма SPMS заболевания охватывает приблизительно 30% всех больных РС.

"Прогрессирующе-ремиттирующий множественный склероз", именуемый "PRMS", характеризуется постепенным прогрессированием клинического неврологического поражения с перемежающимися

периодами рецидивов и ремиссий. Непосредственно после рецидива наступает период значительного восстановления, однако в промежутках между рецидивами наблюдается постепенное ухудшение симптомов. Форма PRMS поражает приблизительно 5% всех больных множественным склерозом. Некоторые невропатологи считают форму PRMS вариантом PPMS.

Выражение "эффективное количество" относится к количеству антитела (или другого лекарственного средства), которое эффективно в плане улучшения состояния или лечения множественного склероза. Такое эффективное количество в большинстве случаев приводит к улучшению признаков, симптомов или других показателей РС, таких как уменьшение частоты рецидивов, профилактика инвалидизации, сокращение количества и/или объема очагов поражения, выявляемых при ЯМР-томографии (МРТ), улучшение времени прохождения 25-футовой дорожки, замедление или отсрочивание прогрессирования заболевания, например, увеличение времени прогрессирования заболевания (например, по Расширенной шкале инвалидизации, EDSS), и т.д.

Здесь "воздействие антитела" относится к приведению в контакт с антителом или к воздействию антитела в составе одной или более доз, вводимых в течение периода, приблизительно составляющего от 1 до 20 дней. Дозы можно вводить в одно и то же время или же с фиксированными или неравными временными интервалами в течение указанного периода воздействия. Первоначальное или последующее (например, второе или третье) воздействие антителом отделяют друг от друга во времени так, как подробно описано в настоящей заявке.

Используемый здесь термин "иммуносупрессивное средство" для добавочной терапии относится к веществам, которые вызывают супрессию или маскировку иммунной системы млекопитающего, подлежащего лечению согласно изобретению. Указанный термин охватывает вещества, которые вызывают супрессию продуцирования цитокинов, подавление или торможение экспрессии аутоантигенов, или же которые маскируют антигены МНС. Примеры таких средств включают 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. Патент США No. 4665077); нестероидные противовоспалительные средства

(NSAID); ганцикловир, такролимус, глюкокортикоиды, такие как кортизол или альдостерон, противовоспалительные средства, такие как ингибитор циклооксигеназы, ингибитор 5-липоксигеназы или антагонист рецептора лейкотриена; антагонисты пуринов, такие как азатиоприн или микофенолат мофетила (MMF); алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид; бромкриптин; даназол; дапсон; глутаральдегид (который маскирует антигены МНС, как описано в патенте США No. 4120649); антиидиотипические антитела проти антигенов МНС и фрагментов МНС; циклоспорин А; стероиды, такие как кортикостероиды или глюкокортикостероиды, или аналоги глюкокортикоидов, например, преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон; ингибиторы дигидрофолатредуктазы, такие как метотрексат (перорально или подкожно); гидроксихлорохин; сульфазалазин; лефлуномид; антагонисты цитокина или цитокинового рецептора, включая антитела против альфа-интерферона, бета- или гамма-интерферона, фактора некроза опухоли (инфликсимаб или адалимумаб), антитела против иммуноадгезина TNF-альфа (энтанерцепт), антитела против фактора некроза опухоли бета, антитела против интерлейкина-2 и антитела против рецептора IL-2; антитела против LFA-1, включая антитела против CD11a и CD18; антитела против L3T4; гетерологичный антилимфоцитарный глобулин; анти-пан-Т-клеточные антитела, предпочтительно, антитела против CD3 или CD4/CD4a; растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (WO 90/08187, дата публикации 26.07.1990); стрептокиназу; TGF-бета; стрептодорназу; РНК или ДНК из организма хозяина; FK506; RS-61443; дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточный рецептор (Cohen et al, Патент США No. 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner et al, *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); и WO 91/01133); а также антитела против Т-клеточного рецептора (EP 340109), такие как T10B9.

Используемый здесь термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Подразумевается, что указанный термин включает радиоактивные

изотопы (например, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты.

"Химиотерапевтическим средством" является химическое соединение, используемое при лечении злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и ЦИТОКСАН<sup>(R)</sup> (циклофосфамид); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелазин, карцелезин и бицелезин); криптофицины (в частности, криптофицин-1 и криптофицин-8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистый иприт, такой как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма-11 и калихеамицин омега-11 (см., например, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронаты; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные ему хромофоры хромопротеинового энединового антибиотика, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРИАМИЦИН<sup>(R)</sup>

(доксорубин) (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; ингибиторы биосинтеза гормонов надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; корректирующую добавку к фолиевой кислоте, такую как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид-гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидрокимочевина; лентинан; лонидаинин; мэйтансиноиды, такие как мэйтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK<sup>(R)</sup>-полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазикувон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, ТАКСОЛ<sup>(R)</sup> (паклитаксел) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.), не содержащий кремофора АБРАКСАН<sup>(TM)</sup>, композиция паклитаксела с сконструированными наночастицами альбумина (American Pharmaceutical Partners,

Schaumberg, Illinois), и ТАКСОТЕП<sup>(R)</sup> (доксетаксел) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; ГЕМЗАП<sup>(R)</sup> (гемцитабин); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; НАВЕЛБИН<sup>(R)</sup> (винорелбин); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; иммуноглобулин топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше веществ.

Указанное определение охватывает также противогормональные средства, которые действуют в качестве регуляторов или ингибиторов действия гормонов на опухоли, такие как анти-эстрогены и селективные модуляторы эстрогенных рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая НОЛВАДЕКС<sup>(R)</sup> (тамоксифен)), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY1 17018, онапристон и ФАРЕСТОН (торемифен); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий продуцирование эстрогена с надпочечниках, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, МЕГЕЙС<sup>(R)</sup> (мегестрола ацетат), АРОМАЗИН<sup>(R)</sup> (экземестан), форместан, фадрозол, РИВИЗОР<sup>(R)</sup> (ворозол), ФЕМАРА<sup>(R)</sup> (летрозол), и АРИМИДЕКС<sup>(R)</sup> (анастрозол); а анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог цитозинового нуклеозида); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, вовлеченных в aberrantную пролиферацию клеток, таких, например, как РКС-альфа, Ralf и H-Ras; вакцины, такие как генно-терапевтические вакцины, например, вакцина АЛЛОВЕКТИН<sup>(R)</sup>, вакцина ЛЕЙВЕКТИН<sup>(R)</sup> и вакцина ВАКСИД<sup>(R)</sup>; PROLEUKIN<sup>(R)</sup> rIL-2 ПРОЛЕЙКИНингибитор топоизомеразы ЛУРТОТЕКАН<sup>(R)</sup>; gmRN АБАРЕЛИКС<sup>(R)</sup>, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше веществ.

Термин "цитокин" является родовым названием белков,

высвобождаемых одной из клеточных популяций, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины; интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; фактор некроза опухоли, например, TNF- $\alpha$  или TNF- $\beta$ ; и другие полипептидные факторы, включая LIF и набор лигандов (kit ligand, KL). Используемый здесь термин цитокин включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты нативных последовательностей цитокинов, включая продуцируемые синтетическим путем низкомолекулярные вещества и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин "гормон" относится к полипептидным гормонам, которые обычно секретируются железистыми органами через протоки. В число таких гормонов входят, например, гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метионильный гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреоид-стимулирующий гормон (ТСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); пролактин, плацентарный лактоген, мышинный гонадотропин-рилизинг ассоциированный пептид, ингибин; активин; мюллерова ингибирующая субстанция; и тромбopoэтин. Используемый здесь термин гормон включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты нативных последовательностей гормонов, включая продуцируемые синтетическим путем низкомолекулярные вещества и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин "фактор роста" относится к белкам, которые усиливают рост, и включает, например, фактор роста гепатоцитов; фактор роста фибробластов; фактор роста сосудистого эндотелия; фактор роста нервов, такой как ФРН- $\beta$ ; полученный из тромбоцитов фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны,

такие как интерферон- $\alpha$ ,  $-\beta$  и  $-\gamma$ ; и колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF); колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF); и колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF). Используемый здесь термин фактор роста включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты нативных последовательностей факторов роста, включая продуцируемые синтетическим путем низкомолекулярные вещества и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин "интегрин" относится к рецепторному белку, который позволяет клеткам связываться с внеклеточным матриксом и реагировать на него и который вовлечен во множество клеточных функций, таких как ранозаживление, клеточная дифференцировка, хоминг опухолевых клеток и апоптоз. Они составляют часть обширного семейства рецепторов клеточной адгезии, которые участвуют в межклеточных взаимодействиях и во взаимодействиях клеток с внеклеточным матриксом. Функциональные интегрины состоят из двух трансмембранных гликопротеиновых единиц, называемых альфа- и бета-, которые не соединены ковалентной связью. Все альфа-субъединицы, как и бета-субъединицы, имеют некоторую степень гомологии друг с другом. Указанные рецепторы всегда содержат одну альфа-цепь и одну бета-цепь. Примеры включают интегрины альфа-6-бета-1, альфа-3-бета-1, альфа-7-бета-1, LFA-1, альфа-4 и т.д. Используемый здесь термин интегрин включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты нативных последовательностей интегринов, включая продуцируемые синтетическим путем низкомолекулярные вещества и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Здесь примеры "интегриновых антагонистов или антител" включают антитело против LFA-1, такое как эфализумаб (РАПТИВА<sup>(R)</sup>), коммерчески доступное в компании Genentech; антитело против альфа-4-интегринна, такое как натализумаб (ТИЗАБРИ<sup>(R)</sup>), доступное в компании Biogen Idec/Elan

Pharmaceuticals, Inc.; диазациклические производные фенилаланина (WO 2003/89410); производные фенилаланина (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 и WO 2003/53926); производные фенилпропионовой кислоты (WO 2003/10135); производные енамина (WO 2001/79173); производные пропионовой кислоты (WO 2000/37444); производные алкановой кислоты (WO 2000/32575); замещенные фенильные производные (патенты США No. 6677339 и 6348463); производные ароматических аминов (патент США No. 6369229); и полипептид дезинтегринового домена ADAM (US2002/0042368), антитела против альфа- $\nu$ -бета-3-интегрина (EP 633945); соединенные аза-мостиковой связью бициклические производные аминокислот (WO 2002/02556).

В свете преследуемых здесь целей "фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа)" относится к молекуле человеческого TNF-альфа, содержащей аминокислотную последовательность, описанную Pennica et al, *Nature*, 312: 721 (1984), или Aggarwal et al, *JBC*, 260: 2345 (1985).

Здесь "ингибитор TNF-альфа" является агентом, который в некоторой степени ингибирует биологическую функцию TNF-альфа, обычно путем связывания с TNF-альфа и нейтрализации его активности. Примерами рассматриваемых здесь ингибиторов TNF являются этанерцепт (ЭНБРЕЛ<sup>(R)</sup>), инфликсимаб (РЕМИКАД<sup>(R)</sup>), и адалимумаб (ГУМИРА<sup>(TM)</sup>).

Примеры "модифицирующих заболевание противоревматических лекарственных средств", или "DMARD", включают гидроксихлорохин, сульфазалазин, метотрексат, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб (плюс перорально и подкожно метотрексат), азатиоприн, D-пеницилламин, золото (перорально), золото (внутримышечно), миноциклин, циклоспорин, иммуноадсорбцию с использованием белка А стафилококка, включая их соли и производные, и т.д.

Примерами "нестероидных противовоспалительных средств", или "NSAID", являются ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, индометацин, сулиндак, толметин, включая их соли и производные, и т.д.

"Кортикостероиды" относятся к любому какому-нибудь или к нескольким синтетическим или возникшим природным образом

веществам с общей химической структурой стероидов, которые имитируют или усиливают эффекты природным образом возникающих кортикостероидов. Примеры синтетических кортикостероидов включают преднизон, преднизолон (включая метилпреднизолон), дексаметазон, глюкокортикоид и бетаметазон.

"Листовку-вкладыш в упаковке" используют для соотнесения с инструкциями, обычно вкладываемыми в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию относительно показаний, применения, дозировок, введения, противопоказаний, возможности комбинировать содержимое упаковки с другими терапевтическими средствами и/или предостережения относительно применения таких терапевтических продуктов, и т.д.

"Этикетка" используется здесь для соотнесения с информацией, обычно вкладываемой в коммерческие упаковки фармацевтических композиций, включая такие контейнеры как ампулы и листовка-вкладыш в упаковке, а также другие типы упаковок.

Здесь употребление выражения "приблизительно" в отношении величины или параметра включает (и описывает) вариации, которые связаны с указанной величиной и параметром как таковыми. Например, обозначение "приблизительно X" включает описание "X".

Здесь и в прилагаемой формуле изобретения под единственным числом подразумевается также и множественное число, если контекст определенным образом не подсказывает иное. Очевидно, что описанные здесь аспекты и вариации изобретения включают понятия "состоящий" и/или "состоящий по существу из" аспектов и вариаций.

## **II. Способы лечения**

Настоящее изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими введение указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях в настоящем изобретении предложены способы лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающие введение указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, при этом лечение

основано на том, что пациент имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях в настоящем изобретении предложены способы лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, при условии, что указанный пациент имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом указанное лечение включает введение пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими введение указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, при этом указанный пациент на момент начала лечения имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом возрастной показатель, окрашивающиеся гадолинием поражения, повышение показателя по

шкале EDDS, оценка по шкале MSSS или сочетание указанных признаков является показателем того, что пациент будет реагировать на лечение анти-CD20-антителом.

В определенных воплощениях изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза, включающими (a) выбор пациента с одной или несколькими характеристиками, выбранными из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, и (b) введение выбранному таким образом пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В некоторых воплощениях изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими введение пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, и при этом одна или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, используются в качестве основы для отбора пациента, претендующего на лечение, и при этом указанное лечение включает введение пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

Данное изобретение дополнительно связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими введение пациенту эффективного количества окрелизумаба, обеспечивающего первоначальное воздействие окрелизумаба в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 0,6

граммов, с последующим вторым воздействием окрелизумаба в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 0,6 граммов, при этом второе воздействие назначают не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия, и каждое из воздействий окрелизумабом назначают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба. В некоторых воплощениях первоначальное воздействие окрелизумабом обеспечивается приблизительно 0,6 граммами. В некоторых воплощениях второе воздействие окрелизумабом обеспечивается приблизительно 0,6 граммами. В некоторых воплощениях указанное второе воздействие обеспечивается введением не ранее чем приблизительно через 24 недели после первоначального воздействия. В некоторых воплощениях одно или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту введением одной дозы окрелизумаба. В некоторых воплощениях одно или более воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту введением двух доз окрелизумаба. В некоторых воплощениях указанные две дозы окрелизумаба содержат приблизительно 0,3 грамма окрелизумаба.

Настоящее изобретение связано также со способами установления и/или предсказания ответственности пациента с прогрессирующим множественным склерозом на лечение анти-CD20-антителом.

В определенных воплощениях изобретение связано со способами установления того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению анти-CD20-антителом, включающими установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия в течение двухлетнего периода перед началом лечения повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, при этом одна или более из указанных характеристик у пациента будут указывать на то, что пациент будет чувствителен к лечению.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами установления того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению анти-CD20-антителом, включающими (a) установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, (b) применение алгоритма для установления того, что данный пациент является чувствительным к указанному лечению; и (c) протоколирование результата, специфичного для тестируемого пациента.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающими (a) установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, составляющего менее чем приблизительно 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, при этом пациента для проведения лечения выбирают на основании того, что он соответствует одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, и (b) лечения указанного выбранного таким образом

пациента путем введения указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами выбора терапии для пациента и/или популяции пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, включающими (a) установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов; и (b) выбора анти-CD20-антитела для лечения пациента в том случае, если пациент или популяция пациентов соответствуют одной или нескольким характеристикам, выбранным из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами предсказания того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом отвечать на лечение анти-CD20-антителом, при этом указанные способы включают установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести

множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, при этом возрастной показатель, наличие окрашивающихся гадолинием поражений, повышение показателя по шкале EDDS в течение двухлетнего периода перед началом лечения, оценка по шкале MSSS или сочетание указанных признаков является показателем того, что пациент окажется чувствительным к лечению под действием анти-CD20-антитела.

В определенных воплощениях настоящее изобретение связано со способами идентификации пациента с прогрессирующим множественным склерозом, который вероятнее всего окажется чувствительным к лечению под действием анти-CD20-антитела, при этом указанные способы включают (a) установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов; и (b) идентификации пациента, соответствующего по одной или нескольким характеристикам, выбранным из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из описанных выше способов лечения, оценки и/или предсказания того, будут ли чувствительны пациенты к лечению, указанные пациенты соответствуют одной или нескольким характеристикам, выбранным из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более

окрашивающихся гадолинием поражений, и (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В определенных воплощениях любого из описанных выше способов оценки и/или предсказания указанные способы дополнительно включают информирование пациента.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов лечения, оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент соответствует одной или нескольким характеристикам, выбранным из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов. В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов лечения, оценки и/или предсказания наличия чувствительности пациента к лечению указанный пациент имеет две характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов. В определенных воплощениях пациент имеет три характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, и (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях пациент имеет (а)

возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, (b) одно или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышение по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую более чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов лечения, оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению, прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-ремиттирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях у пациента и/или популяции пациентов на момент начала лечения прогрессирующе-ремиттирующий множественный склероз не диагностировался.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов лечения, оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению, у пациента и/или популяции пациентов дополнительно обнаруживается признак воспаления в образце. На признак воспаления указывает установление одного или более показателей воспаления. Образец может быть любым образцом, подходящим для установления воспаления. В определенных воплощениях образцом является ткань или жидкость. В некоторых воплощениях жидким образцом является спинномозговая жидкость. В определенных воплощениях на признак воспаления указывает повышенный показатель IgG. В некоторых воплощениях на признак воспаления указывают олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования. В некоторых воплощениях признак воспаления детектируется методом МРТ (MRI). В определенных воплощениях признак воспаления детектируется по наличию Gd-усиленных очагов повреждения или T2-очагов повреждения. В данной области известны и другие

способы оценки признаков воспаления.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов характеризуются изменением в EDSS в течение определенного временного периода. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются увеличением в EDSS, составляющим по меньшей мере приблизительно какое-нибудь из увеличений на 1 пункт, 1,25 пункта, 1,5 пункта, 1,75 пункта, 2 пункта, 2,25 пункта, 2,5 пункта, 2,75 пункта или 3 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения анти-CD20-антителом. В некоторых воплощениях увеличение в EDSS составляет по меньшей мере приблизительно 1,5 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях увеличение в EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале EDSS, приблизительно составляющий больше чем 5,0, в течение любого из периодов перед началом лечения, приблизительно составляющих менее чем 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет, 11 лет, 12 лет, 13 лет, 14 лет, 15 лет, 16 лет, 17 лет, 18 лет, 19 лет или 20 лет. В определенных воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель по шкале EDSS, составляющий приблизительно больше чем 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего 15 лет. В определенных воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале EDSS, составляющий меньше чем 5,0 или приблизительно равный 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее чем любой какой-нибудь из периодов в 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет, 11 лет, 12 лет, 13 лет, 14 лет или 15 лет. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале EDSS, составляющий меньше чем 5,0 или приблизительно равный 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее чем 10 лет.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале EDSS, приблизительно заключенный в любом из интервалов от 1,5 пунктов до 7 пунктов, от 1,5 пунктов до 6,5 пунктов, от 2 пунктов до 6,5 пунктов или от 3 пунктов до 6,5 пунктов. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале EDSS, составляющий к моменту начала лечения приблизительно от 3 и примерно до 6,5 пунктов.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь способов лечения, оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале MSSS, приблизительно составляющий более чем какой-нибудь из показателей 6, 7, 8 или 9. В некоторых воплощениях какого-либо из способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале MSSS, приблизительно составляющий более чем 9.

В определенных воплощениях какого-либо из способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов дополнительно характеризуются тем, что в течение двухлетнего периода перед началом лечения перенесли два или несколько рецидивов. В определенных воплощениях пациент и/или популяция пациентов дополнительно характеризуются тем, что в течение двухлетнего периода перед началом лечения перенесли количество рецидивов, выбранное из 2 рецидивов, 3 рецидивов, 4 рецидивов или 5 рецидивов.

В некоторых воплощениях какого-либо из способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению пациент и/или популяция пациентов характеризуются возрастным показателем. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что их возраст приблизительно составляет менее чем 55 лет, 54 лет, 53 лет, 52 года, 51 год или 50 лет. В некоторых воплощениях пациент и/или популяция

пациентов характеризуются тем, что их возраст приблизительно составляет 51 год.

В некоторых воплощениях какого-либо из способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению указанное лечение сокращает временной период до получения подтверждения того, что заболевание прогрессирует. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается приблизительно в течение любого из периодов, выбранных из периода в 4 недели, 8 недель, 12 недель, 16 недель, 20 недель, 24 недели, 28 недель или 32 недели. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В определенных воплощениях какого-либо из способов лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению анти-CD20-антитело включает а) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) переменную область легкой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов указанным анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях какого-либо из описанных здесь способов указанным анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов указанным анти-CD20-антителом является офатумумаб. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов указанным анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов анти-CD20-антителом является hA20.

Описанные здесь способы могут охватывать любое сочетание описанных здесь воплощений. Например, указанные способы

включают способы лечения и оценки и/или предсказания наличия чувствительности к лечению, согласно которым (а) возраст пациента приблизительно составляет менее чем 55 лет, и (b) у пациента обнаруживаются одно или более окрашивающихся гадолинием очагов поражения.

### III. Дозировки

В соответствии с некоторыми воплощениями какого-либо из описанных здесь способов или изделий производства, способ или инструкции включают введение, с целью обеспечения первоначального воздействия антителом, эффективного количества анти-CD20-антитела пациенту с множественным склерозом, приблизительно составляющего от 0,3 примерно до 4 граммов (предпочтительно, примерно от 0,3 приблизительно до 1,5 граммов, например, приблизительно до 0,6 граммов или приблизительно до 1,0 грамма), с последующим вторым воздействием антителом в количестве, приблизительно составляющем от 0,3 примерно до 4 граммов (предпочтительно, примерно от 0,3 приблизительно до 1,5 граммов, например, приблизительно до 0,6 граммов или приблизительно до 1,0 грамма), при этом воздействие вторым антителом предпринимают не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия антителом. В целях, преследуемых настоящим изобретением, воздействие вторым антителом должно быть вторым эпизодом лечебного воздействия анти-CD20-антителом на организм пациента после первоначального воздействия антителом, при этом не должно быть никакого воздействия или лечебного вмешательства с использованием анти-CD20-антитела между первоначальным и вторым воздействиями. В определенных воплощениях воздействие первоначальным антителом и/или воздействие вторым антителом производят в количестве, приблизительно составляющем любую из доз в 0,3 грамма, 0,4 грамма, 0,5 граммов, 0,6 граммов, 0,7 граммов, 0,8 граммов, 0,9 граммов или 1,0 грамм.

Интервал между первоначальным и вторым или последующими воздействиями антителом может отсчитываться от введения либо первой, либо второй дозы первоначального воздействия антителом,

однако в некоторых воплощениях он ведется с момента введения первой дозы первоначального воздействия антителом.

В некоторых воплощениях воздействия антителом разнесены во времени интервалом приблизительно в 24 недели или в 6 месяцев; или приблизительно в 48 недель или в 12 месяцев.

В одном из воплощений второе воздействие антителом не предпринимают ранее чем приблизительно через 20-30 недель после первоначального воздействия, необязательно с последующим третьим воздействием антителом в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 4 граммов (предпочтительно, примерно от 0,3 приблизительно до 1,5 граммов), при этом третье воздействие антителом предпринимают не ранее чем приблизительно через 46-60 недель (предпочтительно, примерно через 46-54 недели) после первоначального воздействия, и затем, в некоторых воплощениях, никакого дополнительного воздействия антителом не предпринимают ранее чем по меньшей мере приблизительно через 70-75 недель после первоначального воздействия. В некоторых воплощениях третье воздействие антителом предпринимают в количестве, приблизительно составляющем любую из доз в 0,3 грамма, 0,4 грамма, 0,5 граммов, 0,6 граммов, 0,7 граммов, 0,8 граммов, 0,9 граммов или 1,0 грамм.

В альтернативном воплощении, второе воздействие антителом предпринимают не ранее чем приблизительно через 46-60 недель после первоначального воздействия, и последующее воздействие, в случае, если его вообще предпринимают, оказывают не ранее чем по меньшей мере приблизительно через 46-60 недель после предыдущего воздействия.

Любое какое-нибудь одно или несколько предпринимаемых здесь воздействий антителом может быть обеспечено путем введения пациенту однократной дозы антитела или двух отдельных доз указанного антитела (то есть составляющих первую и вторую дозу). Конкретное число доз (одну или две), используемых для каждого из воздействий антителом, зависит, например, от типа подвергаемого лечению РС, типа используемого антитела, от того, используется ли какое-нибудь второе лекарственное средство, а также от того, какого именно типа лекарственное средство

используется, а также от способа и частоты введения. Когда вводят две отдельные дозы, вторую дозу предпочтительно вводить приблизительно через 3-17 дней, более предпочтительно, приблизительно через 6-16 дней, и наиболее предпочтительно, приблизительно через 13-16 дней после введения первой дозы. В некоторых воплощениях, когда вводят две отдельные дозы, вторую дозу вводят приблизительно через 14 дней. Когда вводят две отдельные дозы, первая доза и вторая доза антитела предпочтительно составляет примерно от 0,3 до 1,5 граммов, более предпочтительно, примерно от 0,3 приблизительно до 1,0 грамма. В некоторых воплощениях, когда вводят две отдельные дозы, первая доза и вторая доза антитела приблизительно составляет любую из доз в 0,3 грамма, 0,4 грамма, 0,5 граммов или 0,6 граммов. В некоторых воплощениях первоначальное воздействие окрелизумабом включает введение первой дозы и второй дозы окрелизумаба, при этом первая доза и вторая доза окрелизумаба приблизительно составляет 0,3 грамма. В некоторых воплощениях второе воздействие окрелизумабом включает введение однократной дозы окрелизумаба, причем указанная однократная доза окрелизумаба составляет 0,6 граммов.

В одном из воплощений пациента подвергают по меньшей мере примерно трем, по меньшей мере приблизительно четырем или по меньшей мере приблизительно пяти воздействиям антитела, например, осуществляют приблизительно от 3 до 60 воздействий, и более предпочтительно, приблизительно от 3 до 40 воздействий, наиболее предпочтительно, приблизительно от 3 до 20 воздействий. В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов, указанные способы дополнительно включают осуществление приблизительно от одного примерно до трех последовательных воздействий окрелизумабом. В определенных воплощениях такие воздействия назначают с интервалами, каждый из которых приблизительно составляет 24 недели или 6 месяцев, или же 48 недель или 12 месяцев. В одном из воплощений каждое воздействие антителом обеспечивается введением однократной дозы антитела. В альтернативном воплощении каждое воздействие антителом обеспечивается введением двух отдельных доз

антитела. Однако не любое воздействующее антитело нужно вводить в виде одноразовой дозы или в виде двух отдельных доз.

Антитело может быть голым антителом или же может быть конъюгировано с другой молекулой, такой как цитотоксическое средство, например, радиоактивное соединение. В некоторых воплощениях указанным антителом является ритуксимаб, гуманизированное антитело 2H7 (например, содержащее последовательности переменного домена в SEQ ID NO. 2 и 8) или гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности переменного домена в SEQ ID NO. 23 и 24, или же антитело huMax-CD20 (Genmab). В некоторых воплощениях указанным антителом является окрелизумаб (например, содержащее (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14).

В одном из воплощений пациент никогда прежде не принимал лечения в виде такого лекарственного средства (лекарственных средств) как иммуносупрессорное лекарственное средство (средства), для лечения множественного склероза и/или никогда прежде не принимал лечения антителом против поверхностных маркеров В-клеток (например, никогда прежде не лечился антителом против CD20).

Антитело вводят любым из подходящих способов, включая парентеральный, местный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный, интраназальный пути введения и/или введение внутрь пораженных тканей. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Предусмотрено также введение в полость позвоночного канала (см., например, патентную заявку США No. 2002/0009444, Grillo-Lopez, A., касающуюся интратекальной доставки антитела против CD20). Кроме того, антитело может быть надлежащим образом доставлено путем импульсной инфузии, например, в виде снижающихся доз антитела. В некоторых воплощениях дозирование производят внутривенно, подкожно или интратекально. В некоторых воплощениях дозирование производят посредством внутривенной инфузии (инфузий).

Хотя антитело против CD20 может быть единственным антителом, вводимым пациенту для лечения множественного склероза, необязательно, но можно вводить и второе лекарственное средство, такое как цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство, иммуносупрессорное средство, цитокин, антагонист цитокина или антитело против цитокина, фактор роста, гормон, интегрин, антагонист интегрина или антитело против интегрина (например, анти-LFA-1-антитело, такое как эфализумаб (РАПТИВА<sup>(R)</sup>), коммерчески доступные из компании Genentech, или антитело против альфа-4-интегрина, такое как натализумаб (ТИЗАБРИ<sup>(R)</sup>), коммерчески доступное из компании Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc), и т.д., с антителом, которое связывается с поверхностным маркером В-клетки (например, с антителом против CD20).

В некоторых воплощениях комбинированной терапии антитело комбинируют с лекарственным средством класса интерферонов, таким как IFN-бета-1a (РЕБИФ<sup>(R)</sup> и АВОНЕКС<sup>(R)</sup>) или IFN-бета-1b (БЕТАЗЕРОН<sup>(R)</sup>); олигопептидом, таким как глатирамерацетат (КОПАКСОН<sup>(R)</sup>); цитотоксическим средством, таким как митоксантрон (НОВАНТРОН<sup>(R)</sup>), метотрексат, циклофосфамид, хлорамбуцил, азатиоприн; внутривенным иммуноглобулином (гамма-глобулин); антилимфоцитарной терапией (например, митоксантрон, циклофосфамид, кэмпас, анти-CD4, кладрибин, полное облучение организма, трансплантация костного мозга); кортикостероидом (например, метилпреднизолон, преднизон, дексаметазон или глюкокортикоид), включая системную терапию кортикостероидами; неантилимфоцитарной иммуносупрессорной терапией (например, микофенолат мофетила (ММФ) или циклоспорин); снижающим холестерин лекарственным средством класса "статинов", которое включает церивастатин (БАЙКОЛ<sup>(R)</sup>), флувастатин (ЛЕСКОЛ<sup>(R)</sup>), аторвастатин (ЛИПИТОР<sup>(R)</sup>), ловастатин (МЕВАКОР<sup>(R)</sup>), правастатин (ПРАВАХОЛ<sup>(R)</sup>), симвастатин (ЗОКОР<sup>(R)</sup>); эстрадиол; тестостерон (необязательно в повышающихся дозировках; Stuve et al. *Neurology* 8: 290-301 (2002)); гормонзаместительной терапией; лечением симптомов, вторичных или родственных РС (например, спастичность, недержание, боль, усталость); ингибитором TNF;

модифицирующим заболевание противоревматическим лекарственным средством (DMARD); нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (NSAID); плазмаферезом; левотироксина; циклоспорином А; аналогом соматостатина; антагонистом цитокина или рецептора цитокина; антиметаболитом; иммуносупрессорным лекарственным средством; реабилитирующей хирургией; радиоактивным йодом; тироектомией; другим антагонистом В-клеточной поверхности/антителом против В-клеточной поверхности; и т.д.

Второе лекарственное средство вводят с первоначальным воздействием и/или с более поздними воздействиями антитела против CD20, такое комбинированное введение включает совместное введение, с использованием отдельных композиций или единой фармацевтической композиции, и последовательное введение в любом порядке, при этом предпочтительно, чтобы был временной период, когда оба (или все) активные средства одновременно проявляли бы свою биологическую активность.

Помимо введения пациенту антител, в настоящей заявке рассматривается введение антител посредством генной терапии. Такое введение нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, охватывается выражением введение "эффективного количества" антитела. См., например, международную заявку WO96/07321, опубликованную 14 марта 1996, касающуюся применения генной терапии для получения внутриклеточных антител.

Существует два основных подхода для доставки нуклеиновой кислоты (необязательно заключенной в вектор) в клетки пациента: *in vivo* и *ex vivo*. Для доставки *in vivo* нуклеиновую кислоту непосредственно инъецируют пациенту, обычно в ту область, где требуется указанное антитело. Для обработки *ex vivo* извлекают клетки пациента, нуклеиновую кислоту вводят в такие изолированные клетки, и полученные модифицированные клетки вводят пациенту либо непосредственно, либо, например, инкапсулируют их в пористые мембраны, которые затем имплантируют в организм пациента (см., например, патенты США No. 4892538 и 5283187). Существует целый ряд доступных технологий, с помощью которых можно ввести нуклеиновые кислоты

в жизнеспособные клетки. Указанные технологии варьируют, в зависимости от того, переносят ли нуклеиновую кислоту в культивируемые клетки *in vitro* или же в клетки предполагаемого хозяина *in vivo*. Технологии, подходящие для переноса нуклеиновых кислот в клетки млекопитающего *in vitro*, включают использование липосом, электропорации, микроинъекции, клеточного слияния, DEAE-декстрана, метода осаждения фосфатом кальция и т.д. Вектором, обычно используемым для доставки гена *ex vivo*, является ретровирусный вектор.

В некоторых воплощениях технологии переноса нуклеиновой кислоты *in vivo* включают трансфекцию с помощью вирусных векторов (таких как аденовирус, вирус простого герпеса I или адено-ассоциированный вирус) и систем на основе липидов (липидами, используемыми для липид-опосредованного переноса генов, являются, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). В некоторых ситуациях приходится источник нуклеиновой кислоты снабжать средством, которое нацелено на клетки-мишени, например, антителом, специфичным в отношении мембранных белков клеточной поверхности или клетки-мишени, лигандом к рецептору на клетках-мишенях и т.д. Когда используются липосомы, для нацеливания и/или для того, чтобы облегчить проникновение, можно использовать белки, которые связываются с мембранным белком клеточной поверхности, ассоциированным с эндоцитозом, например, капсидные белки или их фрагменты, тропные в отношении конкретных типов клеток, антитела к белкам, которые периодически подвергаются интернализации, и к белкам, которые имеют внутриклеточную локализацию и которые увеличивают время полужизни внутри клеток. Технологии рецептор-опосредованного эндоцитоза описаны, например, Wu et al, *J. Biol. Chem.* 262: 4429- 4432 (1987); и Wagner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 3410-3414 (1990). Для ознакомления с известными в настоящее время методиками маркировки генов и генной терапии см. Anderson et al., *Science* 256: 808-813 (1992). См. также международную заявку WO 93/25673 и цитируемые в ней ссылки.

#### **IV. Антитела и их получение**

В способах или изделиях производства согласно настоящему

изобретению включено или в них используется антитело, которое связывается с маркером клеточной поверхности В-клеток, в частности, такое антитело, которое связывается с CD20. Соответственно, здесь будут описаны способы получения таких антител.

Маркером поверхности В-клеток, используемым для получения или скрининга антител, может быть, например, растворимая форма маркера или его части, содержащая требуемый эпитоп. Альтернативно или дополнительно, клетки, экспрессирующие на своей поверхности указанный маркер, могут быть использованы для получения или скрининга антител. Другие формы маркера поверхности В-клеток, используемые для получения антител, хорошо знакомы специалистам в данной области.

Далее в качестве иллюстрации следует описание типовой технологии получения антител, используемых в соответствии с настоящим изобретением.

*(i) Поликлональные антитела*

Поликлональные антитела предпочтительно получают у животных посредством многократных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезно конъюгировать релевантный антиген с белком, который является иммуногенным для иммунизируемых видов, например, с гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина соевых бобов, используя бифункциональный или дериватирующий агент, например, сложный эфир малеимидобензоилсульфосукцинимид (конъюгация через цистеиновые остатки), N-гидроксисукцинимид (через лизиновые остатки), глутаральдегид, янтарный ангидрид,  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  представляют собой разные алкильные группы.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем комбинирования, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (соответственно, в случае кроликов или мышей) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъекции полученного раствора внутривожно и многократно в разные участки кожи. Через месяц животных стимулируют от 1/5 до

1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда путем подкожных многократных инъекций в разные участки кожи. Через семь - 14 дней у животных берут кровь, и в сыворотке определяют титр антител. Животных стимулируют до тех пор, пока титр антител не выйдет на плато. В некоторых воплощениях животных стимулируют конъюгатом одного и того же антигена, но конъюгированного с разным белком и/или посредством разных перекрестносливающих реагентов. Конъюгаты могут быть получены также в рекомбинантной клеточной культуре в виде слияния белков. Для усиления иммунного ответа применимы также агрегирующие агенты, такие как квасцы.

(ii) Моноклональные антитела

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, содержащие указанную популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые производятся в процессе продуцирования моноклонального антитела, такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. Таким образом, уточнение "моноклональный" указывает на характер антитела, то есть на то, что оно не является смесью дискретных или поликлональных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридного метода, впервые описанного Kohler с соавт., *Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены с использованием технологий рекомбинантной ДНК (патент США No. 4816567).

В гибридном методе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, как здесь описано, с тем, чтобы получить лимфоциты, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым при иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с помощью соответствующих сливающих агентов, таких как полиэтиленгликоль, с образованием гибридных клеток (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридные клетки высевают и растят в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживаемость не слитых родительских миеломных клеток. Например, если родительские миеломные клетки лишены фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), культуральная среда обычно будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые препятствуют росту HGPRT-дефицитных клеток.

В определенных воплощениях миеломными клетками являются такие клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень продуцирования антитела посредством селективных антителопродуцирующих клеток и являются чувствительными к такой среде как среда HAT. Кроме того, в определенных воплощениях миеломные линии клеток являются мышинными миеломными линиями, такими как линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступных в Центре распределения Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетками SP-2 и X63-Ag8-653, доступными в Американской Коллекции Клеточных Культур, Rockville, Maryland USA. Линии клеток человеческой миеломы и гетеромиеломы человек-мышь также, как было описано, используются для продуцирования человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают гибридные клетки, исследуют на предмет продуцирования моноклональных антител против конкретного антигена. В некоторых воплощениях специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, определяют посредством иммунопреципитации или посредством анализа связывания *in vitro*, например, радиоиммуноанализа (RIA) или иммуноферментного анализа (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, посредством анализа Скэтчарда, Munson et

al, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

После того как будут идентифицированы гибридомные клетки, которые продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, полученные клоны могут быть субклонированы с помощью методов ограниченного разведения и выращены стандартными методами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящая для указанной цели культуральная среда включает, например, среду D-MEM или среду RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены у животного *in vivo* в виде асцитных опухолей.

Моноклональные антитела, секретируемые указанными субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки, используя подходящие способы очистки иммуноглобулинов, такие, например, как протеин А-сефароза, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют, используя для этого общепринятые методики (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфическому связыванию с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышиных антител). В некоторых воплощениях гибридомные клетки служат в качестве источника такой ДНК. Сразу после изолирования такую ДНК можно встроить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в хозяйские клетки, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые обычно не продуцируют иммуноглобулиновый белок, чтобы добиться синтеза моноклональных антител в рекомбинантных хозяйских клетках. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей требуемое антитело, включают публикации Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) и Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

В дополнительном воплощении, антитела или фрагменты антител могут быть изолированы из библиотек фаговых антител, вырабатываемых с помощью технологий, описанных McCafferty et

al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) описывают, соответственно, выделение мышинных и человеческих антител с помощью фаговых библиотек. В приведенных далее публикациях описано продуцирование высокоаффинных (в нМ диапазоне) человеческих антител путем перетасовки цепей (Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), а также путем комбинационного инфицирования и *in vivo* рекомбинации в качестве стратегии для конструирования очень крупных фаговых библиотек (Waterhouse et al, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Таким образом, в плане выделения моноклональных антител указанные технологии являются жизнеспособными альтернативами традиционным гибридным технологиям моноклональных антител.

ДНК может быть также модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности человеческими константными доменами тяжелой и легкой цепей вместо гомологичных мышинных последовательностей (патент США No. 4816567; Morrison, et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), или путем ковалентного присоединения к иммуноглобулин-кодирующей последовательности полной или частичной последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид.

Обычно такие неиммуноглобулиновые полипептиды заменяют константными доменами антитела, или же их заменяют переменными доменами одного антиген-связывающего активного центра антитела, чтобы создать химерное бивалентное антитело, содержащее один антиген-связывающий активный центр антитела, обладающий специфичностью в отношении одного антигена, и другой антиген-связывающий активный центр антитела, обладающий специфичностью в отношении другого антигена.

### (iii) Гуманизированные антитела

Способы гуманизации не-человеческих антител известны в данной области. В некоторых воплощениях гуманизированное антитело содержит один или несколько аминокислотных остатков, встроенных в него из источника антител, отличного от человека. Такие не соответствующие человеческим аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые обычно берутся

из «импортного» переменного домена. Гуманизация может быть выполнена в основном по способу Winter с соавт. (Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), путем замены последовательностями гиперпеременной области соответствующих последовательностей антитела человека.

Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США 4816567), в которых по существу менее чем интактный человеческий переменный домен заменен соответствующей последовательностью из вида, не являющегося человеком. На практике гуманизированными антителами являются обычно человеческие антитела, в которых часть остатков гиперпеременной области и, возможно, часть остатков FR заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов как легких, так и тяжелых цепей, для использования при получении гуманизированных антител очень важен для уменьшения антигенности. В соответствии с так называемым способом «наилучшей подгонки», последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу против полной библиотеки известных человеческих последовательностей переменных доменов. Человеческую последовательность, которая является наиболее близкой к последовательности грызунов, принимают затем в качестве области рамки считывания (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al, *J. Immunol*, 151: 2296 (1993); Chothia et al, *J. Mol. Biol*, 196: 901 (1987)). В другом способе используют конкретную область рамки считывания, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы переменных областей легкой и тяжелой цепей. Одна и та же рамка считывания может быть использована для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других благоприятствующих биологических свойств. Для достижения такой

цели в некоторых воплощениях представленных здесь способов гуманизированные антитела получают путем анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходной и гуманизированной последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и известны специалистам в данной области. Доступны также и компьютерные программы, которые иллюстрируют и дают изображения возможных трехмерных конформационных структур выбранных иммуноглобулиновых последовательностей-кандидатов. Изучение таких изображений позволяет анализировать вероятную роль конкретных остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности-кандидата, то есть произвести анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из последовательностей реципиента и импортных последовательностей, так, чтобы была достигнута требуемая характеристика антитела, например, повышенная аффинность в отношении антигена-мишени (антигенов-мишеней). Обычно остатки гипервариабельной области непосредственно и наиболее существенно влияют на связывание антигена.

В некоторых воплощениях гуманизированное анти-CD20-антитело представляет собой гуманизированное антитело 2H7. В некоторых воплощениях гуманизированное антитело 2H7 содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть следующих CDR-последовательностей:

последовательность CDR L1, RASSSVSYXH, в которой X представляет собой M или L (SEQ ID NO. 18), например, SEQ ID NO:4 (Фиг. 1A),

последовательность CDR L2 SEQ ID NO: 5 (Фиг. 1A),

последовательность CDR L3, QQWXFNPT, в которой X представляет собой S или A (SEQ ID NO. 19), например, SEQ ID NO:6 (Фиг. 1A),

последовательность CDR H1 SEQ ID NO: 10 (Фиг. 1B),

последовательность CDR H2, AIYPGNGXTSYNQKFKG, в которой X

представляет собой D или A (SEQ ID NO. 20), например, SEQ ID NO: 11 (Фиг. 1B), и

последовательность CDR H3, VVYYSXXYWYFDV, в которой X в положении 6 представляет собой N, A, Y, W или D, а X в положении 7 является S или R (SEQ ID NO. 21), например, SEQ ID NO: 12 (Фиг. 1B).

Приведенные выше последовательности CDR обычно присутствуют в последовательностях рамок считывания человеческих переменных доменов легкой и тяжелой цепей, например, по существу человеческих консенсусных остатков FR человеческой легкой каппа-цепи подгруппы I ( $V_L6I$ ) и по существу человеческих консенсусных остатков FR человеческой тяжелой цепи подгруппы III ( $V_HIII$ ). См. также WO 2004/056312 (Lowman et al).

В некоторых воплощениях переменную область тяжелой цепи можно присоединить к константной области цепи человеческого IgG, где указанная область может быть, например, область IgG1 или IgG3, включая области нативной последовательности и варианты константные области.

В некоторых воплощениях такое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:8 ( $v16$ , как показано на Фиг. 1B), и при этом необязательно содержит также последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO:2 ( $v16$ , как показано на Фиг. 1A), которая необязательно содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях 56, 100 и/или 100a, например, D56A, N100A или N100Y, и/или S100aR в переменном домене тяжелой цепи, и одну или несколько аминокислотных замен в положениях 32 и/или 92, например, M32L и/или S92A, в переменном домене легкой цепи. В некоторых воплощениях указанное антитело является интактным антителом, содержащим аминокислотные последовательности легкой цепи SEQ ID NO. 13 или 16, и аминокислотные последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO. 14, 15, 17, 22 или 25. В некоторых воплощениях гуманизованное антитело 2H7 представляет собой окрелизумаб (Genentech).

В определенных воплощениях гуманизованное антитело 2H7 представляет собой интактное антитело или фрагмент антитела,

содержащий последовательность вариабельной области легкой цепи:  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID  
 NO: 2);

и последовательность вариабельной области тяжелой цепи:  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP  
 GNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVYYSNSY  
 WYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8).

В определенных воплощениях гуманизированное антитело 2H7 представляет собой интактное антитело, в некоторых воплощениях оно содержит аминокислотную последовательность легкой цепи:  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:  
 13);

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи:  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP  
 GNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVYYSNSY  
 WYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14) или аминокислотную  
 последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP  
 GNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVYYSNSY  
 WYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15).

В некоторых воплощениях гуманизованное антитело 2H7 содержит последовательность варибельного домена легкой цепи антитела

2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG  
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID  
NO:23)

и 2H7.v511 последовательность варибельного домена тяжелой цепи:  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYP  
GNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVYYSYRY  
WYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 24).

В некоторых воплощениях гуманизованное антитело 2H7.v511 является интактным антителом, оно может содержать аминокислотную последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG  
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 16)

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO. 17

или: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYP

GNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVYYSYRY  
WYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO. 25).

В некоторых воплощениях описываемое здесь антитело может дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает активность ADCC, например, когда аминокислотные замены находятся в положениях 298, 333 и 334, предпочтительно, S298A, E333A и K334A, если использовать E<sub>u</sub>-нумерацию остатков тяжелой цепи. См. также патент США No. 6737056B1, Presta. Любое из указанных антител может содержать по меньшей мере одну замену в Fc-области, которая улучшает связывание FcR<sub>n</sub> или время полужизни в

сыворотке, например, замена в положении 434 тяжелой цепи, такая как N434W. См. также патент США No. 6737056B1, Presta. Любое из указанных антител может дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая повысит активность CDC, например, может содержать по меньшей мере замену в положении 326, предпочтительно, K326A или K326W. См. также патент США No. 6528624B1 (Idusogie et al.).

В определенных воплощениях вариантами гуманизованного антитела 2H7 являются такие варианты, которые содержат переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:2 и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, включая таковые с наличием и отсутствием замен в Fc-области (если она присутствует), а также такие варианты, которые содержат переменный домен тяжелой цепи с альтерацией N100A; или D56A и N100A; или D56A, N100Y и S100aR; в последовательности SEQ ID NO: 8 и переменном домене легкой цепи с альтерацией M32L; или S92A; или M32L и S92A; в последовательности SEQ ID NO:2. M34 в переменном домене тяжелой цепи антитела 2H7.v16 идентифицирован как потенциальный источник стабильности антитела и является еще одним потенциальным кандидатом для осуществления замены.

В определенных воплощениях настоящего изобретения варианты переменной области на основе антитела 2H7.v16 содержат аминокислотные последовательности v16, за исключением положений аминокислотных замен, которые указаны ниже в таблице. Если специально не указано иное, варианты антитела 2H7 будут иметь такую же самую легкую цепь, что и легкая цепь в v16.

Типичные варианты гуманизированного антитела 2H7

Версия 2H7	Изменения в тяжелой цепи (V <sub>H</sub> )	Изменения в легкой цепи (V <sub>L</sub> )	Изменения в Fc-области
16 для сравнения			
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

*(iv) Человеческие антитела*

В качестве альтернативы гуманизации, могут быть получены человеческие антитела. Например, в настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации способны продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие эндогенного продуцирования иммуноглобулинов. Было описано, например, что гомозиготная делеция гена области присоединения тяжелой цепи (J<sub>H</sub>) антитела у химерных мышей и мышей с мутацией в зародышевой линии приводит к полному ингибированию эндогенного продуцирования антител. Перенос массива иммуноглобулиновых генов зародышевой линии человека в организм такой мыши с мутацией в зародышевой линии приведет, после стимуляции антигеном, к продуцированию человеческих антител. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993) и патенты США No. 5591669, 5589369 и

5545807.

Альтернативно, технология фагового дисплея (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990)) может быть использована для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуаров генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов из неиммунизированных доноров. В соответствии с такой технологией, гены V-домена антитела клонируют в рамке считывания либо в основной, либо в минорный белок оболочки нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и экспонируют в виде функциональных фрагментов антитела на поверхности фаговой частицы. Поскольку такая нитчатая частица содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, отбор на основе функциональных свойств указанного антитела также приводят к отбору гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей может быть предпринят в различных форматах; в качестве обзора в этой связи см., например, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Несколько источников сегментов V-генов могут быть использованы для фагового дисплея. Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) выделили массив разнообразных антиоксазолоновых антител из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V-генов, происходящих из селезенок иммунизированных мышей. Можно сконструировать репертуар V-генов из неиммунизированных людей-доноров, и можно выделить антитела против массива разнообразных антигенов (включая аутоантигены) с использованием способов, описанных Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) или Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). См. также патенты США No. 5565332 и 5573905.

Человеческие антитела могут быть получены также посредством активированных *in vitro* В-клеток (см. Патенты США No. 5567610 и 5229275).

(v) Фрагменты антител

Были разработаны различные технологии получения фрагментов антител. Традиционно такие фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например,

Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) и Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)). Однако теперь указанные фрагменты могут быть продуцированы непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Например, фрагменты антител могут быть выделены из обсуждаемых выше фаговых библиотек антител. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно получены из *E. coli* и химически соединены, с образованием F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие технологии получения фрагментов антител будут очевидны специалистам в данной области. В других воплощениях предпочтительным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патент США No.5571894 и патент США No. 5587458. Фрагмент антитела может быть также "линейным антителом", например, как описано в Патенте США No. 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

(vi) *Биспецифические антитела*

Биспецифическими антителами являются антитела, которые имеют специфичность связывания в отношении по меньшей мере двух различных эпитопов. Типичные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами маркера поверхности В-клеток. Другие такого рода антитела могут связываться с маркером поверхности В-клеток и дополнительно связываться со вторым отличающимся маркером поверхности В-клеток. Альтернативно, плечо антитела, связывающееся с маркером поверхности В-клеток, может быть объединено с плечом, которое связывается с пусковой молекулой на лейкоците, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3), или Fc-рецепторами для IgG (FcγR), такими как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), таким образом, чтобы сфокусировать клеточные защитные механизмы на В-клетке. Биспецифические антитела могут быть использованы также для локализации цитотоксических агентов на В-клетке. Указанные антитела имеют

плечо связывания маркера поверхности В-клеток и плечо, которое связывается с цитотоксическим агентом (например, сапорином, анти-интерфероном-а, алкалоидом барвинка, цепью А рицина, метотрексатом или гаптенем радиоактивного изотопа). Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например,  $F(ab')_2$ -биспецифических антител).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулинов, где указанные две цепи имеют разную специфичность (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Ввиду случайного ассортимента тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов такие гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет корректную биспецифическую структуру. Очистка корректной молекулы, которую обычно выполняют на стадиях аффинной хроматографии, является достаточно трудоемкой, с низким выходом продукта. Сходные процедуры описаны в публикациях WO 93/08829 и Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Согласно другому подходу, переменные домены антитела с требуемыми специфичностями связывания (антиген-антитело-связывающие участки) сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. В определенных воплощениях такое слияние является слиянием с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирного участка, СН2- и СН3-областей. В определенных воплощениях первая константная область тяжелой цепи (СН1), содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если это требуется, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и совместно трансфицируют в организм подходящего хозяина. Это обеспечивает большую гибкость в процессе подгонки взаимных пропорций трех указанных полипептидных фрагментов в тех

воплощениях, когда неравные соотношения трех указанных полипептидных цепей, используемых при конструировании, обеспечивают оптимальный выход. Однако можно встроить кодирующие последовательности для двух или для всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу или когда указанные соотношения не имеют принципиального значения.

В определенных воплощениях такого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридных иммуноглобулинов (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулинов, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине этой биспецифической молекулы обеспечивает легкий путь разделения. Такой подход описан в заявке WO 94/04690. В отношении дальнейших подробностей получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Согласно другому подходу, описанному в патенте США 5731168, может быть сконструирована поверхность раздела между парой молекул антител для максимального увеличения процента гетеродимеров, которые извлекают их культуры рекомбинантных клеток. В определенных воплощениях поверхность раздела содержит по меньшей мере часть  $C_{H3}$ -домена константного домена антитела. В таком способе одну или несколько аминокислот с малыми боковыми цепями из указанной поверхности раздела первой молекулы антитела заменяют аминокислотами с более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие «полости» идентичного или сходного с указанными крупными боковыми цепями размера, создаются на поверхности раздела молекулы второго антитела путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями меньшими (например, аланином и

треонином). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с выходом нежелательных конечных продуктов, таких как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают поперечно сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в таком гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое – с биотином. Такие антитела были предложены, например, для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США No. 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любых приемлемых способов поперечного сшивания. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области и описаны в патенте США No. 4676980, вместе с целым рядом технологий поперечного сшивания.

Технологии получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены путем образования химических связей. Brennan с соавт., *Science*, 229: 81 (1985), описывают процедуру, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют, с образованием F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов. Такие фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолкомплексирующего агента арсенита натрия для стабилизации соседних дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). После этого одно из производных Fab'-TNB вновь превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламиноом и смешивают с эквимолярным количеством другого производного Fab'-TNB, с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Описаны также различные технологии получения и выделения фрагментов биспецифических антител из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали с использованием лейциновых молний. Kostelny с соавт., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии

из белков Fos и Jun соединяли с Fab'-частями двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области, с образованием мономеров, и затем повторно окисляли, с образованием гетеродимеров антител. Такой способ может быть использован также и для получения гомодимеров антител. Технология «диател», описанная Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител. Указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), присоединенный к переменному домену легкой цепи ( $V_L$ ) линкером, который слишком короток, чтобы допустить спаривание между указанными двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом,  $V_H$ - и  $V_L$ -домены одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными  $V_H$ - и  $V_L$ -доменами другого фрагмента, с образованием посредством этого двух антигенсвязывающих участков. Была опубликована также и другая стратегия получения биспецифических фрагментов антител с использованием димеров одноцепочечной цепи Fv (sFv). См. Gruber с соавт., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Рассматриваются также антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt с соавт., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

#### **V. Конъюгаты и другие модификации антитела**

Антитело, используемое здесь в способах или включенное в изделия производства, необязательно конъюгируют с цитотоксическим агентом. Например, такое антитело может быть конъюгировано с лекарственным средством, как описано в документе WO 2004/032828.

Химиотерапевтические агенты, применимые при получении таких конъюгатов антитело-цитотоксический агент, описаны выше.

Здесь обсуждаются также конъюгаты антитела с одним или несколькими низкомолекулярными токсинами, такими как калихеамицин, майтансин (патент США No. 5208020), трихотен и CC1065. В одном из воплощений настоящего изобретения антитело конъюгировано с одной или несколькими молекулами майтансина (например, приблизительно от 1 примерно до 10 молекул

майтансина на молекулу антитела). Майтансин может быть, например, превращен в  $\text{May-SS-Me}$ , который может быть восстановлен до  $\text{May-SH}_3$  и введен в реакцию с модифицированным антителом (Chari с соавт., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)), с получением конъюгата мейтансиноид-антитело.

Альтернативно, указанное антитело может быть конъюгировано с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Семейство антибиотиков калихеамицинов способно продуцировать двухцепочечные разрывы ДНК при субпиколярных концентрациях. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими,  $\gamma_1^I$ ,  $a_2^I$ ,  $a_3^I$ , N-ацетил- $\gamma_1^I$ , PSAG и  $\theta_1^I$  (Hinman et al. *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) и Lode et al. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAPS), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См., например, международную заявку WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 года.

В настоящем изобретении дополнительно рассматривается антитело, конъюгированное с соединением, наделенным нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для получения радиоконъюгированных антител доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ ,  $\text{P}^{32}$  и радиоактивные изотопы Lu.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием множества бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-

(пиридилдитиол) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат, имиотиолан (ИТ), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(пара-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано у Vitetta с соавт., *Science* 238: 1098 (1987). Углерод-14-меченная 1-изотиоцианатобензоил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатобразующего агента для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может быть «отщепляемым линкером», облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, может быть использован кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, диметилсодержащий линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari с соавт. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

Альтернативно, может быть получен слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, например, с помощью рекомбинантных технологий или путем пептидного синтеза.

Еще в одном воплощении изобретения антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (таким как стрептавидин) для использования в предварительном нацеливании на опухоль, где этот конъюгат антитело-рецептор вводят субъекту с последующим удалением несвязанного конъюгата из кровотока с использованием агента клиренса и затем введением лиганда (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, радионуклидом).

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть также конъюгированы с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидильный химиотерапевтический агент, см. WO81/01145) в активное средство

против злокачественной опухоли. См., например, WO 88/07378 и патент США No. 4975278.

Ферментативный компонент таких конъюгатов включает любой фермент, способный действовать на пролекарство таким образом, что превращает пролекарство в его более активную, цитотоксическую форму.

Ферменты, которые применимы в способе согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленным, щелочную фосфатазу, применимую для превращения фосфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, применимую для превращения сульфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, применимую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в лекарственное средство против злокачественной опухоли, 5-фторурацил; протеиназы, такие как протеиназа *Serratia*, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые применимы для превращения пептидсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, применимые для превращения пролекарств, которые содержат D-аминокислотные заместители; углевод-расщепляющие ферменты, такие как  $\beta$ -галактозидаза и нейраминидаза, применимые для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства;  $\beta$ -лактамаза, применимая для превращения лекарственных средств, дериватизированных  $\beta$ -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как пенициллин V-амидаза или пенициллин G-амидаза, применимые для превращения лекарственных средств, дериватизированных по атомам азота их аминогрупп, соответственно, феноксиацетильной или фенилацетильной группами в свободные лекарственные средства. Альтернативно, антитела с ферментативной активностью, известные также как «абзимы», могут быть использованы для превращения пролекарств согласно изобретению в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены, как

здесь описано, для доставки абзима к популяции опухолевых клеток.

Ферменты согласно настоящему изобретению можно ковалентно связать с антителом с помощью технологий, хорошо известных в данной области, таких как применение гетеробифункциональных сшивающих реагентов, обсуждаемых выше. Альтернативно, слитые белки, содержащие по меньшей мере антигенсвязывающий участок антитела согласно изобретению, соединенный по меньшей мере с функционально активной частью фермента согласно изобретению, могут быть сконструированы с использованием технологий рекомбинантных ДНК, хорошо известных в данной области (см., например, Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

Здесь обсуждаются и другие модификации антитела. Например, антитело можно связать с одним из различных небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем, полиоксиалкиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. В некоторых воплощениях фрагменты антител, такие как Fab', связанные с одной или несколькими молекулами ПЭГ.

Описанные здесь антитела могут быть также представлены в виде липосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как способы, описанные у Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); в патентах США No. 4485045 и 4544545 и в международной заявке WO97/38731, опубликованной 23 октября 1997 года. Липосомы с повышенным временем циркуляции описаны в патенте США No. 5013556.

Особенно целесообразные липосомы могут быть получены способом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор для получения липосом желаемого диаметра. Fab'-фрагменты антител согласно изобретению могут быть конъюгированы с такими липосомами, как описано у Martin с соавт., *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982),

посредством реакции дисульфидного обмена. Химиотерапевтический агент необязательно содержится в липосоме. См. Gabizon с соавт., *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484 (1989).

Рассмотрена модификация (модификации) аминокислотной последовательности. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности такого антитела получают путем введения соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях указанного антитела. Производят любую комбинацию делеции, вставки или замены для получения конечной конструкции, при условии, что указанная конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные замены могут изменять также посттрансляционные процессы антитела, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования.

Применяемый способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, называют аланинсканирующим мутагенезом, описанным Cunningham и Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Здесь идентифицированы остаток или группа остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменены нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно, аланином или полиаланином), с тем, чтобы воздействовать на взаимодействие указанных аминокислот с антигеном. Затем аминокислоты в тех положениях, которые обнаруживают функциональную чувствительность к указанным заменам, корректируют путем введения дополнительных аминокислот в непосредственной близости от таких положений или путем замены другими вариантами аминокислот в тех же самых положениях. Таким образом, хотя участок для внесения изменения в аминокислотную последовательность определен предварительно, характер мутации как таковой необязательно должен быть predetermined. Например,

для анализа характеристик мутации в конкретном положении проводят аланинсканирующий или неспецифический мутагенез в кодоне-мишени или на участке-мишени, и экспрессируемые варианты антител подвергают скринингу на предмет обнаружения требуемой активности.

Вставки аминокислотной последовательности включают аминок- и/или карбокси-концевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности отдельных или множественных аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты вставок в связи с молекулами антитела включают слияние с N-концом или C-концом антитела фермента или полипептида, который увеличивает период полужизни указанного антитела в сыворотке.

Другим типом варианта является вариант замены аминокислот. При таких вариантах происходит замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в молекуле антитела другим остатком. Участки, представляющие наибольший интерес для инсерционного мутагенеза антитела (антител), включают гипервариабельные участки, но рассматриваются также изменения в области FR. Консервативные замены показаны в таблице 2 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, в таком случае можно вводить более существенные замены, называемые в таблице 2 «типowymi заменами», и полученные продукты подвергать скринингу.

Таблица 2

Исходный остаток	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu

Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Существенные модификации в биологических свойствах антитела выполняются путем выбора замен, которые существенно отличаются их влиянием на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы на участке-мишени или (с) размера боковой цепи. Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии со сходством свойств их боковых цепей (A.L. Lehninger, *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M);

(2) полярные незаряженные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q);

(3) кислотные: Asp (D), Glu (E);

(4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H).

Альтернативно, природным путем образованные остатки могут быть разделены на группы на основе общих свойств их боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены стимулируют замещение члена одного из указанных классов членом другого класса.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации антитела, может быть также заменен, обычно серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrантного перекрестного сшивания. И наоборот, в молекулу антитела может быть добавлена цистеиновая связь (связи) для улучшения стабильности антитела (в частности, когда антитело является фрагментом антитела, таким как Fv-фрагмент).

Особенно предпочтительный тип замещенного варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела. Обычно полученный вариант(варианты), отобранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого он был получен. Удобным путем для генерирования таких содержащих замены вариантов является созревание аффинности с использованием фагового диплея. Вкратце, несколько участков гипервариабельной области (например, 6-7 участков) подвергаются мутагенезу для получения всех возможных аминокислотных замен на каждом участке. Полученные таким образом варианты антител отображают моновалентным образом из частиц нитчатого фага в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованным внутри каждой частицы. Затем указанные проявляемые фагом варианты подвергаются скринингу на предмет определения их биологической активности (например,

аффинности связывания), как здесь описано. Для идентификации таких участков гипервариабельной области, которые могут быть участками-кандидатами на модификацию, может быть предпринят аланинсканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезен анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседствующие с ними остатки, в соответствии с разработанными здесь технологиями, являются кандидатами для замены. Сразу же после получения таких вариантов полученную панель вариантов подвергают скринингу, как здесь описано, и антитела с наилучшими свойствами, проявленными в одном или нескольких релевантных анализах, могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный характер гликозилирования антитела. Такое изменение включает делецию одной или нескольких углеводных фрагментов молекулы, обнаруживаемых в антителе, и/или добавление одного или нескольких участков гликозилирования, которых нет в указанном антителе.

Гликозилирование полипептидов является обычно либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина, являются распознаваемыми последовательностями при ферментативном присоединении углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксикамнокислоте, наиболее часто, к серину или треонину, хотя могут быть использованы также 5-гидроксипролин или 5-

гидроксизин.

Добавление к антителу участков гликозилирования удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Такое изменение может быть осуществлено также путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для O-связанных участков гликозилирования).

Если антитело содержит Fc-область, присоединенный к нему углевод может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, которые лишены фукозы, присоединенной к Fc-области антитела, описаны в заявке на патент США No. 2003/0157108 A1, Presta, L. См. также патент США No. 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) в отношении композиции анти-CD20-антитела. Антитела с рассеченным пополам N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, упоминаются в международной заявке WO 03/011878, Jean-Mairet et al. и в патенте США No. 6602684, Umana et al. Антитела по меньшей мере с одним галактозным остатком в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, упоминаются в международной заявке WO 97/30087, Patel et al. См. также WO 98/58964 (Raju, S.) и WO 99/22764 (Raju, S.) в отношении антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc-области.

В некоторых воплощениях согласно изобретению вариант гликозилирования содержит Fc-область, при этом углеводная структура, присоединенная к Fc-области, лишена фукозы. Такие варианты соответствуют улучшенной функции ADCC. Кроме того, указанная Fc-область необязательно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (Eu-нумерация остатков). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным в отношении фукозы» антителам, включают заявку на патент США No. 2003/0157108 A1, Presta, L.; патентные заявки WO 00/61739A1; WO 01/29246A1; US

2003/0115614A1; US 2002/0164328A1; US 2004/0093621A1; US 2004/0132140A1; US 2004/0110704A1; US 2004/0110282A1; US 2004/0109865A1; WO 03/085119A1; WO 03/084570A1; WO 2005/035778; WO 2005/035586 (где описано ингибирование фукозилирования под действием РНК (RNAi)); Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные в отношении фукозилирования белков (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); заявка на патент США No. US 2003/0157108 A1, Presta, L.; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в частности, в Примере 11), и линии клеток с нокаутом генов, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8* (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, получают различными способами, известными в данной области. Указанные способы включают, не ограничиваясь ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение путем олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или невариантной версии антитела.

Может потребоваться модификация антитела согласно изобретению в отношении его эффекторной функции, например, с тем, чтобы повысить его антиген-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Это может быть достигнуто путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. Альтернативно или дополнительно, остаток(остатки) цистеина может быть введен в Fc-область, способствуя, таким образом, образованию в этой области межцепочечной дисульфидной связи. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и/или повышенную комплемент-опосредованную

киллерную активность в отношении клеток, а также антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). См. Caron et al., *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. *Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью могут быть получены также с использованием гетеробифункциональных перекрестно-сшивающих линкеров, как описано у Wolff с соавт., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Альтернативно, может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-области и может таким образом осуществлять повышенный лизис комплемента и обладать повышенной способностью к ADCC. См. Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

В международной заявке WO 00/42072 (Presta L.) описаны антитела с улучшенной функцией ADCC в присутствии человеческих эффекторных клеток, где указанные антитела содержат аминокислотные замены в своей Fc-области. В некоторых воплощениях такое антитело с улучшенной функцией ADCC содержит замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области. В некоторых воплощениях измененной Fc-областью является Fc-область IgG1 человека, содержащая замены в одном, двух или трех из этих положений или же состоящая из одного, двух или трех из указанных положений.

Антитела с измененными связыванием C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC) описаны в международной заявке WO 99/51642, патенте США No. 6194551B1, патенте США No. 6242195B1, патенте США No. 6528624B1 и патенте США No. 6538124 (Idusogie et al.). Указанные антитела содержат аминокислотную замену в одном или нескольких из аминокислотных положений 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 и/или 334, их Fc-области.

Для того, чтобы увеличить время полужизни антитела в сыворотке, можно в указанное антитело (в частности, во фрагмент антитела) встроить эпитоп связывания с аварийным рецептором (salvage receptor), как описано, например, в патенте США No. 5739277. В данном контексте термин «эпитоп связывания с аварийным (salvage) рецептором» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>), который

является ответственным за увеличение периода полужизни молекулы IgG в сыворотке *in vivo*. Антитела с заменами в их Fc-области и увеличенными периодами полужизни в сыворотке описаны также в международной заявке WO 00/42072 (Presta, L.).

Рассмотрены также сконструированные генно-инженерным путем антитела с тремя или несколькими (предпочтительно, четыремя) функциональными антиген-связывающими участками (заявка на патент США No. US 2002/0004587 A1, Miller et al.).

#### **VI. Фармацевтические композиции**

Терапевтические композиции антител, используемых в соответствии с настоящим изобретением, получают, для хранения, путем смешивания антитела, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, например, фосфатный, цитратный и содержащий другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее чем приблизительно из 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатобразующие соединения, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup>

или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Примеры композиций анти-CD20-антител описаны в международной заявке WO 98/56418. В указанной заявке описана жидкая мультидозовая композиция, содержащая 40 мг/мл ритуксимаба, 25 мМ ацетата, 150 мМ трегалозы, 0,9% бензилового спирта, 0,02% полисорбата-20 при pH 5,0, которая имеет минимальный срок хранения два года при 2-8°C. Другая представляющая интерес композиция анти-CD20-антитела содержит 10 мг/мл ритуксимаба в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата-80 и стерильную воду для инъекций, pH 6,5.

Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в патенте США No. 6267958 (Andya et al.). Такие лиофилизированные композиции могут быть восстановлены соответствующим разбавителем до высокой концентрации белка, и такую восстановленную композицию можно вводить подкожно млекопитающему, которое подлежит лечению согласно изобретению.

Обсуждаются также кристаллизованные формы антитела или антител. См., например, US 2002/0136719 A1 (Shenoy et al.).

Описанная здесь композиция может содержать также более чем одно активное соединение, необходимое для конкретного подлежащего лечению состояния, а в некоторых воплощениях, соединения с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Например, может понадобиться обеспечение в композиции дополнительного цитотоксического агента; химиотерапевтического агента; иммуносупрессивного агента; цитокина; антагониста цитокина или антитела против цитокина; фактора роста; гормона; интегрина; антагониста интегрина или антитела против интегрина (например, антитела против LFA-1, такого как эфализумаб/РАПТИВА, коммерчески доступного от производителя Genentech, или антитела против альфа-4-интегрина, такого как натализумаб/ТИЗАБРИ<sup>(R)</sup>), доступного от производителя Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc.); лекарственного средства класса интерферонов, такого как IFN-бета-1a (REBIF<sup>(R)</sup>) и АВОНЕКС<sup>(R)</sup>) или IFN-бета-1b

(БЕТАЗЕРОН<sup>(R)</sup>); олигопептида, такого как глатирамерацетат (КОПАКСОН<sup>(R)</sup>); цитотоксического агента, такого как митоксантрон (НОВАНТРОН<sup>(R)</sup>), метотрексата, циклофосфида, хлорамбуцила или азатиоприна; внутривенного иммуноглобулина (гамма-глобулин); лекарственного средства, вызывающего истощение лимфоцитов (например, митоксантрона, циклофосфида, кампата, анти-CD4 [-антитела] или кладрибина); иммуносупрессивного лекарственного средства, не вызывающего истощения лимфоцитов (например, микофенолат мофетила (MMF) или циклоспорин); лекарственного средства из класса «статинов», понижающего холестерин; эстрадиола; тестостерона; гормонозаместительной терапии; лекарственного средства, которое лечит симптомы, вторичные или родственные РС (например, спастичность, недержание, боль, усталость); ингибитора TNF; модифицирующего заболевание противоревматического лекарственного средства (DMARD); нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID); кортикостероида (например, метилпреднизолона, преднизона, дексаметазона или глюкокортикоида); левотироксина; циклоспорина А; аналога соматостатина; цитокина или антагониста рецептора цитокина; антиметаболита; иммуносупрессорного лекарственного средства; антагониста интегрина или антитела против интегрина (например, антитела против LFA-1, такого как эфализумаб, или антитела против альфа-4-интегрина, такого как натализумаб); или антагониста/антитела против маркера поверхности В-клеток; и т.д. Тип и эффективные количества таких другого рода лекарственных средств зависят, например, от количества антитела, присутствующего в композиции, от типа подлежащего лечению рассеянного склероза, а также от клинических параметров пациентов. Указанные лекарственные средства обычно используют в тех же самых дозировках и вводят теми же самыми способами, что и указанные выше пути введения, или приблизительно в количестве 1-99% указанных выше доз.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, с помощью технологий коацервации или полимеризации на границе двух фаз, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и

поли (метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие технологии описаны в [справочнике] Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем указанные матрицы находятся в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт), полилактиды (патент США No. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT<sup>(TM)</sup>) (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Композиции, предназначенные для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через мембраны для стерильного фильтрования.

В некоторых воплощениях указанная композиция содержит одну или несколько групп, состоящих из гистидинового буфера, трегалозы, сахарозы и полисорбата-20. В некоторых воплощениях гистидиновый буфер является гистидин-ацетатным буфером, pH 6,0. Примеры композиций, подходящих для введения анти-CD20-антитела, можно найти в публикации Andya с соавт., US 2006/0088523, которая включена в настоящее описание в полном объеме информации, касающейся композиций.

Типичные композиции анти-CD20-антител описаны в публикациях Andya с соавт., US 2006/0088523 и WO 98/56418, которые в полном объеме включены в настоящее описание в виде

ссылки. В некоторых воплощениях композиция является жидкой мультидозовой композицией, содержащей анти-CD20-антитело в количестве 40 мг /мл, 25 мМ ацетата, 150 мМ трегалозы, 0,9% бензиловый спирт, 0,02% полисорбат-20 при pH 5,0, которая имеет минимальный срок хранения, составляющий два года при 2-8°C. В некоторых воплощениях представляющая интерес композиция анти-CD20-антитела содержит 10 мг/мл антитела в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг /мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата-80 и стерильную воду для инъекций, pH 6,5. В определенных воплощениях анти-CD20-антитело представлено в водной фармацевтической композиции, содержащей 10-30 мМ ацетата натрия, приблизительно от pH 4,8 примерно до pH 5,5, предпочтительно, при pH 5,5, полисорбат в виде поверхностно-активного вещества в количестве, приблизительно составляющем 0,01-0,1% об./об., трегалозу в количестве, приблизительно составляющем 2-10% масс./об., и бензиловый спирт в качестве консерванта (патент США No. 6171586, который в полном объеме включен в настоящее описание в виде ссылки). Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в документе WO 97/04801, который в полном объеме включен в настоящее описание в виде ссылки. Такие лиофилизированные композиции могут быть восстановлены с помощью специального разбавителя до высоких белковых концентраций, и восстановленная композиция может быть введена подкожно млекопитающему, которое предполагается лечить согласно изобретению.

В некоторых воплощениях композиция вариантов гуманизированного антитела 2H7 состоит из антитела, 12-14 мг/мл, в 10 мМ гистидине, 6% сахарозе, 0,02% полисорбате-20, pH 5,8. В специфическом воплощении варианты 2H7 и, в частности, 2H7.v16, составляют из 20 мг/мл антитела в 10 мМ гистидинсульфате, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 и стерильной воды для инъекций, при pH 5,8. В специфическом воплощении одна в/в композиция гуманизированного антитела 2H7 v16 состоит из 30 мг/мл антитела в 20 мМ ацетате натрия, 4% дигидрате трегалозы, 0,02% полисорбате-20 (Tween 20<sup>(TM)</sup>), pH 5,3. В определенных воплощениях композиция варианта

гуманизированного антитела 2H7.v511 составлена из 15-30 мг/мл антитела, предпочтительно, 20 мг/мл антитела, в 10 мМ гистидинсульфате, 60 мг/мл сахарозы (6%), 0,2 мг/мл полисорбата-20 (0,02%), и стерильной воды для инъекций, при pH 5,8. Еще в одном воплощении композиция вариантов 2H7 и, в частности, 2H7.v511, составляют из 20 мг/мл антитела в 20 мМ ацетате натрия, 4% дигидрате трегалозы, 0,02% полисорбате-20, pH 5,5, для внутривенного введения. В некоторых воплощениях композиция 2H7.V 114 представляет собой 15-25 мг/мл, предпочтительно, 20 мг/мл антитела в 20 мМ ацетате натрия, 240 мМ (8%) дигидрате трегалозы, 0,02% полисорбате-20, pH 5,3.

#### ***VII. Изделия производства и способы производства***

В настоящем изобретении предложены изделия производства, содержащие (а) контейнер, содержащий окрелизумаб; и (b) вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения множественного склероза у пациента, при этом в инструкциях отмечено (то есть указано), что пациенту вводят такое количество окрелизумаба, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия окрелизумаба и составляет приблизительно от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с последующим вторым воздействием окрелизумаба в количестве, приблизительно составляющем от 0,3 примерно до 0,6 граммов, при этом второе воздействие осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия, и каждое из указанных воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба. В определенных воплощениях первоначальное воздействие окрелизумабом осуществляют в количестве приблизительно 0,6 граммов. В определенных воплощениях второе воздействие окрелизумабом осуществляют в количестве, приблизительно составляющем 0,6 граммов. В некоторых воплощениях второе воздействие осуществляют не ранее чем приблизительно через 24 недели после первоначального воздействия. В определенных воплощениях одно или несколько воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной дозы окрелизумаба. В некоторых воплощениях одно или несколько воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде двух доз

окрелизумаба.

В определенных воплощениях указанные две дозы окрелизумаба содержат приблизительно 0,3 грамма окрелизумаба.

В настоящем изобретении дополнительно предложены изделия производства, содержащие вещества, применимые для лечения прогрессирующего множественного склероза. В определенных воплощениях указанное изделие содержит совместно упакованные фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый носитель, и вкладыш упаковки, в котором отмечено, что анти-CD20-антитело или фармацевтическая композиция показаны для лечения пациентов с множественным склерозом, имеющих одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях указанное изделие производства содержит совместно упакованные фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый носитель, и вкладыш, в котором отмечено, что введение анти-CD20-антитела или фармацевтической композиции основано на том, что пациент имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях указанное изделие производства содержит совместно упакованные фармацевтическую композицию,

содержащую анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый носитель, и вкладыш, в котором отмечено, что фармацевтическую композицию вводят отобранному пациенту, где отобранный пациент имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь изделий производства пациент имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь изделий производства пациент имеет более чем одну из характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов. В некоторых воплощениях любого из описанных здесь изделий производства пациент имеет две из характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в

течение двухлетнего периода перед началом лечения. В определенных воплощениях пациент имеет три характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов. В определенных воплощениях пациент имеет (а) возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, (b) наличие одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) повышение по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь изделий производства, прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-ремиттирующим множественным склерозом. В определенных воплощениях у пациента на момент начала лечения прогрессирующе-ремиттирующий множественный склероз не диагностировался.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь изделий производства, у пациента дополнительно обнаруживается признак воспаления в образце. В определенных воплощениях образцом является спинномозговая жидкость. В некоторых воплощениях на признак воспаления указывает повышенный показатель IgG. В некоторых воплощениях на признак воспаления указывают олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь

изделий производства, увеличение в EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях пациент имеет показатель по шкале EDSS, составляющий приблизительно больше чем 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее 15 лет. В определенных воплощениях пациент имеет показатель, по шкале EDSS, составляющий меньше чем 5,0 или приблизительно равный 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее чем 10 лет. В некоторых воплощениях показатель по шкале EDSS составляет к моменту начала лечения приблизительно от 3,0 и примерно до 6,5. В определенных воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS составляет увеличение показателя по шкале EDSS приблизительно на 1,5 пункта в течение двух лет до момента начала лечения. В некоторых воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS на 1,5 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В определенных воплощениях пациент дополнительно перенес два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь изделий производства, пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель, по шкале MSSS, приблизительно составляющий более чем какой-нибудь из показателей 6, 7, 8 или 9. В некоторых воплощениях какого-либо из изделий производства, пациент и/или популяция пациентов характеризуются тем, что имеют показатель по шкале MSSS, приблизительно составляющий более чем 9.

В некоторых воплощениях какого-либо из описанных здесь изделий производства, возраст пациента приблизительно составляет менее чем 51 год.

В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь изделий производства, лечение сокращает временной период до подтверждения того, что заболевание прогрессирует. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В некоторых воплощениях

подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь изделий производства, анти-CD20-антитело содержит а) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и b) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Указанное изделие производства содержит контейнер и ярлык на контейнере или вкладыш в контейнер или прилагаемый к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер удерживает или содержит композицию, которая является эффективной для лечения множественного склероза, и может иметь стерильное отверстие доступа (например, контейнер может быть мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой, предназначенной для гиподермальной инъекции). По меньшей мере одно активное средство в указанной композиции является антителом. В определенных воплощениях указанный контейнер содержит приблизительно от 0,3 примерно до 4,0 граммов анти-CD20-антитела. В некоторых воплощениях контейнер содержит приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов анти-CD20-антитела.

На ярлыке или вкладыше упаковки указано, что композиция предназначена для лечения множественного склероза у страдающего от него пациента, со специальным руководством в отношении количеств дозирования и интервалов введения антитела и любого другого назначенного лекарственного средства. Указанное изделие

производства может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, например, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Указанное изделие производства может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точек зрения, в том числе и другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Необязательно описанное здесь изделие производства дополнительно содержит контейнер, содержащий средство, отличное от антитела, для лечения, и дополнительно содержащий инструкции по лечению пациента таким средством, причем указанное средство предпочтительно является химиотерапевтическим агентом или иммуносупрессивным агентом, интерфероном, таким как IFN-бета-1a (REBIF<sup>(R)</sup> и АВОНЕКС<sup>(R)</sup>) или IFN-1b (БЕТАЗЕРОН<sup>(R)</sup>); олигопептидом, таким как глатирамерацетат (КОПАКСОН<sup>(R)</sup>); цитотоксическим агентом, таким как митоксантрон (НОВАНТРОН<sup>(R)</sup>), метотрексатом, циклофосфамидом, хлорамбуцилом или азатиоприном; внутривенным иммуноглобулином (гамма-глобулином); лекарственным средством, вызывающим истощение лимфоцитов (например, митоксантрон, циклофосфамид, кампат, анти-CD4 [-антитело] или кладрибин); иммуносупрессивным лекарственным средством, не вызывающим истощения лимфоцитов (например, микофенолат мофетила (MMF) или циклоспорин); лекарственным средством из класса «статинов», понижающим холестерин; эстрадиолом; гормонозаместительной терапией; лекарственным средством, которое лечит симптомы, вторичные или родственные РС (например, спастичность, недержание, боль, усталость); ингибитором TNF; модифицирующим заболевание противоревматическим лекарственным средством (DMARD); нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (NSAID); кортикостероидом (например, метилпреднизолон, преднизон, дексаметазон или глюкокортикоид); левотироксином; циклоспорином А; аналогом соматостатина; цитокином или антагонистом рецептора цитокина; антиметаболита; иммуносупрессорного лекарственного средства; антагониста интегрина или антитела против интегрина (например, антитела

против LFA-1, такого как эфализумаб, или антитела против альфа-4-интегрина, такого как натализумаб); или антагониста/антитела против маркера поверхности В-клеток; и т.д.

В определенных воплощениях на ярлыке может быть дополнительно отмечено любое из описанных здесь воплощений. Например, на ярлыке может быть указано, что пациент имеет (a) возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, и (b) наличие одного или более окрашивающихся гадолинием поражений.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ производства, включая материалы, используемый для лечения описанного здесь прогрессирующего множественного склероза. В некоторых воплощениях предложен способ производства анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтической композиции, содержащей совместно упакованные анти-CD20-антитело или фармацевтическую композицию и вкладыш, в котором отмечено, что анти-CD20-антитело или фармацевтическая композиция предназначены для лечения пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, при этом указанные пациенты имеют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из описанных здесь способов производства пациенты имеют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

### **VIII. Способы рекламирования и маркетинга**

Настоящее изобретение связано также со способами рекламирования анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтически приемлемой композиции, предусматривающими рекламирование перед целевой аудиторией применения анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтической композиции для лечения пациента или популяции пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, при условии, что пациент или популяция пациентов имеют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

Здесь представлены также способы маркетинга анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтически приемлемой композиции для применения при лечении субпопуляции пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, где указанный способ предусматривает информирование целевой аудитории в отношении применения анти-CD20-антитела для лечения субпопуляции пациентов, отличающейся тем, что пациенты такой субпопуляции имеют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

Кроме того, настоящее изобретение связано со способами специального уведомления об использовании анти-CD20-антитела субпопуляцией пациентов с прогрессирующим множественным

склерозом, при этом указанный способ предусматривает предоставление инструкций по назначению анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтически приемлемой композиции субпопуляции пациентов, отличающихся тем, что пациенты такой субпопуляции имеют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

Настоящее изобретение дополнительно связано также со способами предоставления возможности лечения пациентам с прогрессирующим множественным склерозом, при этом указанные способы включают фасовку анти-CD20-антитела в флаконы (ампулы) со вкладышем в упаковке, содержащим инструкции относительно лечения пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, при этом пациенты должны иметь одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из указанных способов пациент имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В некоторых воплощениях любого из указанных способов пациент имеет две характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую выше чем приблизительно 5 пунктов.

В определенных воплощениях любого из указанных способов прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивным множественным склерозом. В некоторых воплощениях у пациента на момент начала лечения прогрессирующе-ремиттирующий множественный склероз не диагностировался.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь способов, у пациента дополнительно обнаруживается признак воспаления в образце. В определенных воплощениях образцом является спинномозговая жидкость. В некоторых воплощениях на признак воспаления указывает повышенный показатель IgG. В определенных воплощениях на признак воспаления указывают олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь способов, увеличение в EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях пациент имеет показатель по шкале EDSS, составляющий приблизительно больше чем 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее 15 лет. В определенных воплощениях пациент имеет показатель по шкале EDSS, составляющий меньше чем 5,0 или приблизительно равный 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее чем 10 лет.

В некоторых воплощениях показатель по шкале EDSS составляет к моменту начала лечения приблизительно от 3,0 и примерно до 6,5. В определенных воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS составляет увеличение показателя по шкале EDSS приблизительно на 1,5 пункта в течение двух лет до момента начала лечения. В некоторых воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS на 1,5 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В определенных воплощениях пациент дополнительно перенес два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В некоторых воплощениях любого из описанных здесь способов возраст пациента составляет приблизительно менее чем 51 год.

В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь способов, лечение сокращает временной период до подтверждения того, что заболевание прогрессирует. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В определенных воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В некоторых воплощениях какого-либо из описанных здесь способов анти-CD20-антителом является окрелизумаб.

В некоторых воплощениях какого-либо из описанных здесь способов анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В определенных воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Описанные здесь способы могут охватывать любую комбинацию описанных здесь воплощений. Например, указанные способы включают такие способы, согласно которым пациент имеет (a) возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, (b) одно или более окрашивающихся гадолинием поражений.

**IX. Системы и способы предсказания реагирования на лечение множественного склероза**

Настоящее изобретение связано также с системами и способами анализа того, будет ли субъект и/или пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза. В настоящем изобретении предложены системы для анализа отвечаемости пациента с прогрессирующим множественным склерозом на лечение лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза, включающими (а) установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов; (b) техническое обеспечение для установления признака по пункту (a); и (c) вычислительные средства для применения алгоритма с целью установления того, является ли данный пациент чувствительным или отвечающим на указанное лечение.

Настоящее изобретение дополнительно связано со способами предсказания того, будет ли субъект с прогрессирующим множественным склерозом отвечать на лечение лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза, где указанные способы включают установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, при этом возрастной показатель, окрашивающиеся гадолинием поражения, повышение показателя по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед

началом лечения, оценка по шкале MSSS или сочетание указанных признаков является показателем того, что пациент будет реагировать на указанное лечение.

В некоторых воплощениях любой из указанных здесь систем и/или способов, пациент имеет более одной характеристики, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, и с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В некоторых воплощениях любой из описанных здесь систем и/или способов, пациент имеет более одной характеристики, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов. В определенных воплощениях любой из описанных здесь систем и/или способов, пациент имеет две характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов. В некоторых воплощениях пациент имеет три характеристики, выбранные из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед

началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов. В некоторых воплощениях пациент имеет (a) возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, (b) одно или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) повышение по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценку по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющую более чем приблизительно 5 пунктов.

В некоторых воплощениях любой из указанных здесь систем и/или способов прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-ремиттирующим множественным склерозом. В некоторых воплощениях у пациента на момент начала лечения прогрессирующе-ремиттирующий множественный склероз не диагностировался.

В определенных воплощениях любой из указанных здесь систем и/или способов, у пациента дополнительно обнаруживается признак воспаления в образце. В некоторых воплощениях образцом является спинномозговая жидкость. В определенных воплощениях на признак воспаления указывает повышенный показатель IgG. В определенных воплощениях на признак воспаления указывают олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования.

В некоторых воплощениях любой из указанных здесь систем и/или способов, увеличение в EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В некоторых воплощениях пациент имеет показатель по шкале EDSS, составляющий приблизительно больше чем 5,0, в течение периода, приблизительно составляющего менее 15 лет. В определенных воплощениях пациент имеет показатель по шкале EDSS, составляющий меньше чем 5,0 или приблизительно равный 5,0, в

течение периода, приблизительно составляющего менее чем 10 лет. В некоторых воплощениях показатель по шкале EDSS составляет к моменту начала лечения приблизительно от 3,0 и примерно до 6,5. В определенных воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS составляет по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения. В некоторых воплощениях увеличение показателя по шкале EDSS на 1,5 пункта в течение двухлетнего периода перед началом лечения нельзя объяснить рецидивом заболевания. В определенных воплощениях пациент дополнительно перенес два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

В некоторых воплощениях любой из указанных здесь систем и/или способов возраст пациента составляет приблизительно менее чем 51 год.

В некоторых воплощениях какой-либо из указанных здесь систем и/или способов указанные системы и/или способы дополнительно включают информирование пациента.

В определенных воплощениях какого-либо из описанных здесь систем и/или способов, лечение сокращает временной период до получения подтвержденного прогрессирования заболевания. В некоторых воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель. В определенных воплощениях подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

В некоторых воплощениях какой-либо из указанных систем и/или способов лекарственным средством являются интерферон-бета-1b (например, Бетазерон<sup>(R)</sup>); интерферон-бета-1a (например, Авонекс<sup>(R)</sup> или Ребиф<sup>(R)</sup>), глатирамер (например, Копаксон<sup>(R)</sup>), митоксантрон (Новантрон<sup>(R)</sup>), кортикостероиды (например, этилпреднизолон, преднизон, дексаметазон), 3-4 диаминопиридин, АВТ-874, алемтузумаб, альбутерол (Провентил<sup>(R)</sup>), АТЛ1102, аторвастатин (Липитор<sup>(R)</sup>), азатиоприн, ВG00012 (диметилфумарат), ВНТ-3009, ботулинический токсин А (Ботокс<sup>(R)</sup>), С-105, каннадор,

дронабинол, тетрагидроканнабинол, каннабидиол, CDP323, кладрибин, CNTO 1275, циклофосфамид, даклизумаб, декстрометорфан/хинидин (AVP-923, Зенвиа<sup>TM</sup>), донепецил (Арицепт<sup>(R)</sup>), доксициклин, эстрадиол, эстриол, эстропрогестины, фампридин-SR (4-аминопиридин, замедленного высвобождения), финголимод (FTY720), тау-интерферон, ламотриджин (Ламиктал<sup>(R)</sup>), лаквинимод, лидокаин + прилокаин (EMLA), MBR8298 (синтетический пептид основного миелинового белка), мемантин (Наменда<sup>(R)</sup>), метилпреднизолон, MN-166, модафинил (Провигил<sup>(R)</sup>), микофенолат мофетила (Целлцепт<sup>(R)</sup>), налтрексон, натализумаб (Тизабри<sup>(R)</sup>), пароксетин (Паксил<sup>(R)</sup>), PI-2301 (сополимер), пиоглитазон (Актос<sup>(R)</sup>), пиксантрон (BBR 2778), правастатин (Правахол<sup>(R)</sup>), прегабалин (Лирика<sup>(R)</sup>), прогестерон, RG2077, рилузол (Рилутек<sup>(R)</sup>), ролипрам (ингибитор фосфодиэстеразы-4), RTL1000, SB-683699, симвастатин (Зокор<sup>(R)</sup>), пептидная вакцин против Т-клеточного рецептора (NeuroVax<sup>TM</sup>), терифлуномид, тестостероновый гель (Андрогель<sup>(R)</sup>) или триметоприм.

В определенных воплощениях какой-либо из указанных здесь систем и/или способов лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза, является анти-CD20-антитело. В определенных воплощениях указанное анти-CD20-антитело включает а) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) переменную область легкой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях указанным анти-CD20-антителом является окрелизумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является ритуксимаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является офатумумаб. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является GA101. В некоторых воплощениях анти-CD20-антителом является hA20.

Описанные здесь системы и/или способы могут охватывать любую комбинацию описанных здесь воплощений. Например, указанные способы включают такие способы, согласно которым

пациент имеет (а) возраст, приблизительно составляющий менее чем 55 лет, и (b) одно или более окрашивающихся гадолинием поражений.

Дальнейшие подробности данного изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами. Описание всех цитируемых здесь ссылок намеренно включено в настоящее описание в виде ссылок.

#### **ПРИМЕРЫ**

В настоящих примерах, которые предназначены исключительно в целях иллюстрации изобретения и, следовательно, никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения, также описываются и уточняются аспекты и воплощения описываемого выше изобретения. Нижеследующие примеры и подробное описание приведены здесь лишь с целью иллюстрации изобретения, но не с целью его ограничения.

#### **ПРИМЕР 1: фаза II исследования действия окрелизумаба при возвратно-ремиттирующем множественным склерозе (RRMS)**

Предпринята фаза II многоцентрового рандомизированного, проводимого в параллельных группах, частично слепого, плацебо- и авонекс-контролируемого исследования с подбором дозы с целью оценки эффективности, измеряемой путем магнитно-резонансной визуализации методом МРТ (MRI) очагов повреждения головного мозга, и безопасности двух режимов дозировки окрелизумаба у пациентов с возвратно-ремиттирующим множественным склерозом (RRMS).

Указанными двумя схемами лечения окрелизумабом при проведении испытаний были следующие: 1) окрелизумаб в дозе 1000 мг, в качестве первого цикла лечения, с последующими однократными инфузиями по 1000 мг, в качестве последующих циклов лечения, и 2) окрелизумаб в дозе 600 мг, по схеме, состоящей из двух инфузий по 300 мг, в качестве первого цикла лечения, с последующими однократными инфузиями 600 мг, в качестве последующих циклов лечения.

Удовлетворяющих критериям пациентов рандомизировали (1:1:1:1) в одну из четырех групп лечения, А, В, С или D, как описано на фиг. 7. Краткое описание схемы построения

исследования проиллюстрировано на фиг. 7.

Группа А (окрелизумаб 1000 мг): две внутривенные (в/в) инфузии окрелизумаба, каждая по 1000 мг, с интервалом в 14 дней, в качестве 1-го цикла лечения. Затем пациентам назначали поддерживающую схему лечения, то есть однократную инфузию в 1000 мг, вводимую при каждом последующем цикле лечения, проводимом с интервалом в 24 недели. Впоследствии, с целью поддержания двойного слепого исследования в процессе 2-го цикла лечения, пациентам вводили две инфузии с интервалом в 14 дней, при этом первая инфузия содержала 1000 мг окрелизумаба, а вторая инфузия - плацебо. При 3-ем и 4-ом циклах лечения пациентам вводили однократную инфузию в 1000 мг, без второй инфузии плацебо, двойным слепым методом, до тех пор, пока на основании первичного анализа не была выбрана предпочтительная доза.

Группа В (окрелизумаб 600 мг): две в/в инфузии окрелизумаба, каждая по 300 мг, с интервалом в 14 дней, в качестве 1-го цикла лечения. Затем пациентам назначали поддерживающую схему лечения, то есть однократную инфузию в 600 мг, вводимую при каждом последующем цикле лечения, проводимом с интервалом в 24 недели. Впоследствии, с целью поддержания двойного слепого исследования в процессе 2-го цикла лечения, пациентам вводили две инфузии с интервалом в 14 дней, при этом первая инфузия содержала 600 мг окрелизумаба, а вторая инфузия - плацебо. При 3-ем и 4-ом циклах лечения пациентам вводили однократную инфузию в 600 мг, без второй инфузии плацебо, двойным слепым методом, до тех пор, пока на основании первичного анализа не была выбрана предпочтительная доза.

Группа С (плацебо): две в/в инфузии плацебо с интервалом в 14 дней, в качестве 1-го цикла лечения. Впоследствии пациентов переводили на схему лечения окрелизумабом в дозе 600 мг, двойным слепым методом, начиная с в/в инфузий окрелизумаба в дозе 300 мг, с интервалом в 14 дней, в начале 2-го цикла лечения. После этого пациентам назначали, двойным слепым методом, поддерживающую схему лечения, то есть однократную инфузию в 600 мг, вводимую при 3-ем и 4-ом циклах лечения, до

тех пор, пока на основании первичного анализа не была выбрана предпочтительная доза.

Группа D (авонекс): 30 мкг авонекса еженедельно вводили внутримышечно (в/м) в качестве 1-го цикла лечения. Впоследствии пациентам было предложено провести открытое исследование на добровольной основе, по схеме 600 мг окрелизумаба, начиная с двух в/в инфузий окрелизумаба по 300 мг, с интервалом в 14 дней, в начале 2-го цикла лечения. При 3-ем и 4-ом циклах лечения пациентам делали однократную инфузию в 600 мг, пока на основании первичного анализа не была выбрана предпочтительная доза.

После того как исследователи и члены комитета по этике были проинформированы относительно предпочтительной дозы, пациенты всех групп во всех последующих циклах (последующем цикле) лечения получали установленную предпочтительную дозу (600 мг или 1000 мг) в виде одноразовой инфузии.

Первое введение в настоящем исследовании терапевтического подхода, будь то в/в инфузия (окрелизумаба или плацебо) или первая в/м инъекция авонекса, знаменует начало периода лечения (день 1). Кроме того, все пациенты получали также 100 мг метилпреднизолона в виде в/в инфузии в 1 день исследования, а также с каждой следующей инфузией окрелизумаба или плацебо, а пациенты, получавшие авонекс (группа D), - в соответствии с временной схемой введения инфузий окрелизумаба.

Осуществляется четыре цикла лечения, то есть цикл 1=от начала лечения до 24 недели; цикл 2=с 24 недели до 48 недели; цикл 3=с 48 недели до 72 недели; цикл 4=с 72 недели до 96 недели. После посещений врача в связи с инфузией 1-го цикла (посещения 2 и 3, день 1 и неделя 2, соответственно), посещения врача осуществлялись на 4-й неделе, а затем каждые 4 недели в течение первых 24 недель. После посещений врача в связи с инфузией 2-го цикла (посещения 9 и 10, неделя 24 и неделя 26, соответственно), посещения врача осуществлялись на 36-й неделе, а затем каждые 12 недель до окончания лечения и периодов последующего наблюдения. Следует прилагать все усилия, чтобы не пропускать визиты к врачу в назначенные сроки. Время от времени

может возникать необходимость дополнительных внеплановых посещений для установления возможности потенциальных рецидивов, новых неврологических симптомов или просто из предосторожности.

**Исследуемая популяция и критерии отбора**

Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 55 лет включительно, у которых диагностирован, в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005), возвратно-ремиттирующий множественный склероз (RRMS) и которые соответствуют представленным ниже критериям включения/исключения, могут быть выбраны для включения в настоящее исследование.

**Критерии включения:**

Для того, чтобы быть включенными в настоящее исследование, пациенты должны были соответствовать следующим критериям:

1. RRMS в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005);

2. Возраст 18-55 включительно;

3. Наличие по меньшей мере двух документированных рецидивов в течение последних 3 лет перед началом скрининга, по меньшей мере один из которых возник в течение последнего года перед началом скрининга;

4. Исходный показатель по Расширенной шкале инвалидизации (EDSS) составляет от 1,0 до 6,0 пунктов;

5. Определяемое ниже доказательство обремененности заболеванием множественного склероза (РС):

а. Наличие по меньшей мере шести T2-поражений, согласно анализу МРТ-сканирования, проведенному, на основе локального считывания, в течение года до скрининга. В случае, если анализ МРТ-сканирования не проводился в течение последнего года или в случае, если с помощью указанного анализа было выявлено менее чем шесть T2-поражений, для допуска пациента необходим скрининг по меньшей мере шести T2-поражений, обнаруживаемых путем МРТ-сканирования, или

б. Наличие у пациента 2 документированных рецидивов в течение последнего года перед началом скрининга.

**Критерии исключения:**

Пациенты, которые соответствуют следующим критериям,

должны быть исключены из участия в настоящем исследовании:

1. Первично или вторично прогрессирующий множественный склероз на момент скрининга (1-е посещение врача);
2. Длительность болезни, составляющая более 15 лет, у пациентов с показателем EDSS=2,0.

#### **Анализ эффективности**

Первоочередной задачей в данном исследовании было изучение эффекта, оказываемого окрелизумабом, вводимым посредством двух внутривенных доз по 600 или 1000 мг (см. фигуру 7), в отношении общего числа окрашивающихся гадолинием T1-поражений, наблюдаемых при МРТ-сканировании головного мозга на 12, 16, 20 и 24 неделях, по сравнению с плацебо.

Дополнительными задачами настоящего исследования являлись оценка эффективности и безопасности окрелизумаба в сравнении с плацебо, отражающая следующее: общегодовую (на годовой основе) запротоколированную частоту рецидивов к 24 неделе; долю пациентов, у которых не возникло рецидивов (запротоколированных) к 24 неделе; общее число окрашивающихся гадолинием T1-поражений, наблюдаемых при МРТ-сканировании головного мозга на 4, 8, 12, 16, 20 и 24 неделях; общее число новых и/или сохранившихся окрашивающихся гадолинием T1-поражений, наблюдаемых при МРТ-сканировании головного мозга на 4, 8, 12, 16, 20 и 24 неделях; изменение общего объема T2-поражений, наблюдаемых при МРТ-сканировании головного мозга, с момента начала испытаний до 24 недели, с целью оценки безопасности и переносимости схем введения двух доз окрелизумаба у пациентов с RRMS, по сравнению с введением плацебо и авонекса, к 24 неделе, и суммарную безопасность окрелизумаба, вводимого в течение периода вплоть до 96 недель, и исследование фармакокинетики и других фармакодинамических результатов исследования окрелизумаба.

В данном примере рецидив определяется как возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов, связанных с РС и непосредственно предваряемых относительной стабильностью или улучшением неврологического состояния в течение по меньшей мере 30 дней. Симптомы должны сохраняться в течение >24 часов и

должны быть такими, которые нельзя отнести за счет сопутствующих клинических факторов (например, за счет температуры, инфекции, повреждения, побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства). Возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов должно сопровождаться объективным неврологическим ухудшением, согласующимся с увеличением по меньшей мере на пол-балла, по шкале EDSS, или на 2 пункта, согласно одной из соответствующих систем функциональной оценки (FSS), или на 1 пункт по двум или нескольким соответствующим FSS. Указанное изменение должно быть отражено в выбранных системах FSS (то есть должно отражаться на пирамидальном пути, на походке, должно иметь мозжечковую природу, природу, связанную со стволом головного мозга, сенсорную или связанную со зрением природу). Сенсорных изменений, эпизодических спазмов, усталости, изменения настроения или неотложных позывов к мочеиспусканию или дефекации или недержания недостаточно для установления наличия рецидива. Исследователь, осуществляющий осмотр пациента, подтверждает те рецидивы, которые соответствуют указанным выше критериям.

Исследовательская задача в настоящем испытании включает, но не ограничена перечисленным, следующее: изменения в объеме головного мозга, при МРТ-сканировании головного мозга, с момента начала испытаний до недели 12; изменения в объеме головного мозга, при МРТ-сканировании головного мозга, в течение периода от 12 недели до 96 недели в подгруппе пациентов, принимающих окрелизумаб; общее число новых и/или увеличившихся T2-поражений, наблюдаемых при МРТ-сканировании головного мозга на 4, 8, 12, 16, 20 и 24 неделях; долю пациентов, у которых не возникло рецидивов (запротоколированных) к 24 неделе; долю пациентов, у которых не возникло новых окрашивающихся гадолинием T1-поражений к 24 неделе; оценку бесполезности лечения, исходя из общего числа окрашивающихся гадолинием T1-поражений через 48 недель после проведения в подгруппе пациентов 4 циклов лечения окрелизумабом; долю пациентов, у которых не возникло рецидивов

(клинических или запротоколированных) в течение каждого из циклов лечения, а также к 48 и к 96 неделе; долю пациентов, которым необходимо системное лечение метилпреднизолоном рецидива РС в процессе каждого цикла лечения, а также к 48 и к 96 неделям; ежегодовую (на годовой основе) клиническую и запротоколированную частоту рецидивов в процессе каждого цикла лечения, а также к 48 и к 96 неделям; время до наступления первого запротоколированного рецидива к 24 неделе; время до наступления первого запротоколированного рецидива к 96 неделе; время до начала (запуска) процесса непрерывного прогрессирования степени инвалидизации, что определяется нарастающим ухудшением, по шкале EDSS, на 1,0 или более пунктов в течение периода от 12 до 96 недели; время до начала процесса непрерывного прогрессирования степени инвалидизации, что определяется нарастающим ухудшением, по шкале EDSS, на 1,0 или более пунктов в течение периода от 24 до 96 недели; изучение эффектов окрелизумаба в отношении первоочередной и дополнительных задач настоящего исследования по сравнению с авонексом; изучение корреляции полиморфных вариантов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к RRMS, и изучение активности окрелизумаба и чувствительности пациентов с RRMS к лечению окрелизумабом; изучение взаимосвязи между циркулирующими биомаркерами, ассоциированными с RRMS, предрасположенностью и активностью окрелизумаба и терапевтическим ответом на лечение окрелизумабом у пациентов с RRMS; изменение, по шкале утомляемости MFIS (Modified Fatigue Impact Scale), от исходного уровня до уровня к 24- и 48-недельному срокам; изменение, по шкале утомляемости, моторной и когнитивной функций (FSMC), от исходного уровня до уровня к 24- и 48-недельному срокам; изменение в соотношении числа пациентов, утомляемость которых изменилась от "тяжелой" до "умеренной" и от "умеренной" до "слабой", согласно оценке по шкале FSMC, при сравнении исходного уровня с 24- и 48-недельным сроками; изменение, по шкале Центра эпидемиологических исследований депрессии (CES-D), от исходного уровня до уровня к 24- и 48-недельному срокам; и изменение в соотношении числа

пациентов, у которых наблюдается динамика от состояния с более депрессивной симптоматикой к состоянию с менее депрессивной симптоматикой, по шкале CES-D, при сравнении исходного уровня с 24- и 48-недельным сроками.

#### ***МРТ головного мозга***

МРТ является полезным инструментом для мониторинга повреждений центральной нервной системы (ЦНС) при РС. МРТ-сканы головного мозга были получены при скрининге только у некоторых пациентов (см. дополнительные задачи), и у всех пациентов - на исходном уровне в начале исследования и, с четырехнедельными интервалами, между началом исследования и 24-й неделей. Помимо этого, в подгруппе пациентов (группы А и В), МРТ-сканирование головного мозга предпринимали на 96-й неделе (16 посещение врача) и еще через 48 недель, то есть на 144-й неделе.

МРТ-сканирование включает получение следующих сканов в каждой временной точке: T2-weighted МРТ-скан, T1-weighted МРТ-скан (без усиления гадолинием), и T1-weighted МРТ-скан (с усилением гадолинием).

#### ***Оценка нетрудоспособности***

Прогрессирование нетрудоспособности, определяемое по шкале EDSS, устанавливали у всех пациентов путем обследования независимым экспертом при скрининге и каждые 12 недель в течение всего периода изучения и до окончания периода наблюдения, когда прогрессирование нетрудоспособности определяли через 24 недели.

Прогрессирование нетрудоспособности определяется как повышение на  $\geq 1,0$  пункт по сравнению с исходным уровнем по шкале EDSS, которое нельзя отнести за счет повышения в связи с другой этиологией (например, температура, сопутствующее заболевание или одновременный прием другого лекарственного средства), при этом исходный уровень составляет 5,0 или менее, и  $\geq 0,5$ , когда исходный уровень по шкале составляет 5,5 или более. Прогрессирование заболевания считается подтвержденным, когда повышение по шкале EDSS подтверждается при регулярном посещении врача по меньшей мере через 12 недель после первого случая документирования прогрессии. В альтернативном

определении подтвержденного прогрессирования нетрудоспособности требуется, чтобы повышение по шкале EDSS было подтверждено по меньшей мере через 24 недели после первого случая документирования прогрессии.

Шкала EDSS основана на стандартном неврологическом обследовании; производится количественная оценка в баллах по семи категориям EDSS, представляющим функциональные системы (пирамидальную, мозжечковую, систему ствола головного мозга, сенсорную, систему пищеварительного тракта и мочевого пузыря, систему зрения и церебральную и/или ментальную, плюс "другое") (в совокупности, оценка функциональных систем, или FSS). Каждая оценка FSS представляет собой последовательную клиническую оценку по шкале, имеющей диапазон от 0 до 5 или 6. Затем такие оценки используются в сочетании с результатами осмотра и информацией, связанной со способностью к ходьбе и с использованием при этом вспомогательных устройств, для определения оценки по шкале EDSS. Шкала EDSS является шкалой нетрудоспособности, или инвалидности, имеющей цену деления в 0,5 пунктов и изменяющейся от 0 (норма) до 10 (смерть).

**Пример 2: Фаза II/III исследования действия ритуксимаба при первично прогрессирующем множественном склерозе (PPMS)**

Была предпринята фаза II/III многоцентрового рандомизированного, проводимого в параллельных группах, двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования (U2786g) с целью оценки безопасности и эффективности ритуксимаба у взрослых с первично прогрессирующим множественным склерозом (PPMS), согласно определению, данному McDonald с соавт. (*Ann Neurol* 50: 121-7(2001)).

Субъектов рандомизировали в соотношении 2:1 на группы, в которых пациентам будут вводить либо ритуксимаб, либо плацебо. Ритуксимаб, коммерчески доступный в компании Genentech, был составлен для в/в введения в виде стерильного продукта в 9,0 мг/мл раствора хлорида натрия, 0,7 мг/мл полисорбата-80, 7,35 мг/мл дегидрата цитрата натрия и стерильной воды для инъекций (pH 6,5). Каждый курс исследуемого лекарственного средства состоял из двух в/в инфузий (с интервалом в 14 дней) по 1000 мг

ритуксимаба или плацебо. Субъекты получали первый курс лечения в дни 1 и 15, и получали дополнительные курсы на 24, 48 и 72 неделях. Субъекты получали ацетаминофен (1 г) и дифенгидрамин-НС1 (50 мг), или их эквивалент, через рот, за 30-60 мин до начала каждой инфузии. Глюкокортикоиды перед инфузией не назначали. При длительности испытания в 96 недель субъектов осматривали на регулярной основе при визитах к врачу для физического обследования, неврологической и МРТ-оценки, для учета побочных явлений и жизненных показателей, а также для оценки полного набора гематологических факторов, химического состава сыворотки и лабораторного анализа мочи.

Исходные демографические данные субъектов в соответствии с назначенным лечением (ИТТ) представлены в таблице 3.

Таблица 3

Демографические данные и исходные характеристики:  
соответствие между субъектами и назначенным лечением

Характеристика	Плацебо (n=147)	Ритуксимаб (n=292)	Всего субъектов (n=439)
Возраст (годы)			
n	147	292	439
Среднее (SD)	49,6(8,69)	50,1(9,02)	49,9(8,90)
Срединное значение	51,0	51,0	51,0
Минимум максимум	20-66	18-66	18-66
18-<40	20(13,6%)	40(13,7%)	60(13,7%)
40-<55	80(54,4%)	145(49,7%)	225(51,3%)
≥55	47(32,0%)	107(36,6%)	154(35,1%)

Продолжительность заболевания рассеянным склерозом была сходна в обеих группах. Исходные результаты МРТ суммированы в таблице 4. Исходные характеристики МРТ были сходны в группах плацебо и ритуксимаба.

Таблица 4

Исходные результаты МРТ: соответствие между субъектами и назначенным лечением

Результат МРТ	Плацебо (n=147)	Ритуксимаб (n=292)	Всего субъектов (n=439)
Общее число усиленных гадолинием поражений	2		
N	147	290	437
Среднее (SD)	0,5 (1,26)	0,7 (2,96)	0,7 (2,52)
Срединное значение	0,0	0,0	0,0
Минимум-максимум	0-8	0-32	0-32
0	110 (74,8%)	220 (75,9%)	330 (75,5%)
1	23 (15,6%)	44 (15,2%)	67 (15,3%)
2	5 (3,4%)	10 (3,4%)	15 (3,4%)
3	5 (3,4%)	5 (1,7%)	10 (2,3%)
≥4	4 (2,7%)	11 (3,8%)	15 (3,4%)
Общий объем (мм <sup>3</sup> ) усиленных гадолинием поражений			
N	147	290	437
Среднее (SD)	27,56 (81,86)	49,50 (220,32)	42,12 (185,82)
Срединное значение	0,00	0,00	0,00
Минимум-максимум	0,00-556,40	0,00-2660,00	0,00-2660,00
Объем (мм <sup>3</sup> ) T2-поражений			
N	147	290	437
Среднее (SD)	8850,86	9336,66	9173,25

	(11808,95)	(13744,94)	(13113,98)
Срединное значение	5199,50	5240,50	5220,70
Минимум максимум	73,83-74534,0	174,00-155303,0	73,83-155303,0
Объем (см <sup>3</sup> ) головного мозга			
N	130	237	367
Среднее (SD)	1210,91 (128,89)	1202,92 (120,23)	1205,75 (123,25)
Срединное значение	1209,5	1204,0	1207,0
Минимум-максимум	642,0-1522,0	712,60-1508,0	642,0-1522,0

MPT=магнитно-резонансная томография.

Рандомизацию проводили в соответствии с объектом изучения; исходный уровень тяжести заболевания определяли по шкале EDSS ( $\leq 4,0$ ,  $>4,0$ ). Исходный уровень EDSS суммирован в таблице 5. В результате динамической рандомизации процент субъектов в каждой лечебной группе был схож на уровне факторов стратификации.

Таблица 5

Исходные факторы стратификации, соответствие между тяжестью заболевания субъектов и назначенным лечением

Фактор распределения по группам	Плацебо (n=147)	Ритуксимаб (n=292)	Всего субъектов (n=439)
EDSS			
N	147	292	439
2	6 (4,1%)	8 (2,7%)	14 (3,2%)
2,5	5 (3,4%)	11 (3,8%)	16 (3,6%)
3	11 (7,5%)	22 (7,5%)	33 (7,5%)
3,5	21 (14,3%)	36 (12,3%)	57 (13,0%)
4	25 (17,0%)	47 (16,1%)	72 (16,4%)
4,5	8 (5,4%)	19 (6,5%)	27 (6,2%)
5	6 (4,1%)	10 (3,4%)	16 (3,6%)

5,5	10 (6,8%)	10 (3,4%)	20 (4,6%)
6	28 (19,0%)	81 (27,7%)	109 (24,8%)
6,5	27 (18,4%)	48 (16,4%)	75 (17,1%)
Среднее (SD)	4,73 (1,395)	4,84 (1,369)	4,80 (1,377)
Срединное значение	4,50	5,00	5,00
Минимум-максимум	2,0-6,5	2,0-6,5	2,0-6,5

EDSS=Расширенная шкала инвалидизации.

Кроме того, указанные две лечебные группы на исходном уровне были сходны по другим системам оценки тяжести заболевания: EDSS, Шкале Повреждений Функциональных Систем по Куртцке, Функциональной Композиционной Шкале рассеянного склероза (MSFCS) и компонентам MSFCS (подшкалам MSFCS) (времени прохождения 25-футовой пешеходной дорожки, теста 9-Hole Peg Test и PASAT-3).

#### Результаты эффективности

В первичном анализе эффективности при данном испытании сравнивали, в течение 96-недельного периода, время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, между группами ритуксимаба и плацебо. Прогрессирование заболевания определяется как повышение на = 1,0 пункт от исходного уровня EDSS (Kurtzke J. *Neurology* 33(11): 1444-52 (1983)), если исходный уровень EDSS составляет от 2,0 до 5,5 пунктов (включительно), или как повышение на = 0,5, если исходный уровень EDSS составляет >5,5 пунктов, при условии, что указанное изменение нельзя отнести за счет другой этиологии (например, за счет температуры, наложившегося заболевания, рецидива или обострения РС или побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства).

Стратифицированный анализ показал, что ритуксимаб незначительно задерживает подтвержденное прогрессирование заболевания по сравнению с плацебо ( $p=0,1442$ , стратифицированный тест логарифмических рангов). Полученный процент пациентов с прогрессирующим заболеванием к 96 неделе

составлял 38,5% и 30,2% в группах плацебо и ритуксимаба, соответственно (таблица 6). Кривые Каплана-Мейера для времени до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, представлены на фигуре 8.

Таблица 6

Время (временной интервал) до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, в течение периода лечения субъектов и их соответствие назначенному лечению

	Плацебо (n=147)	Ритуксимаб (n=292)
Число субъектов с CDP(%)	53 (36,1%)	83 (28,4%)
Число проверенных субъектов (%)	94 (63,9%)	209 (71,6%)
Стратифицированное значение р Log-rank-тест		0,1442
Стратифицированный относительный риск (по отношению к плацебо)		0,773
95% доверительный интервал (CI) для части субъектов с CDP*		(0,546-1,093)
на 24 неделе	6,9%	9,1%
на 48 неделе	19,3%	20,2%
на 72 неделе	30,3%	28,0%
на 96 неделе	38,5%	30,2%

\*CDP-подтвержденное прогрессирующее заболевание (Confirmed Disease Progression)

Вторичные задачи, связанные с эффективностью, включали изменения к 96-й неделе, по сравнению с исходным уровнем, в общем объеме T2-поражений и изменения к 96-й неделе, по сравнению с исходным уровнем, в объеме головного мозга. При тестировании указанных двух вторичных показателей использовали метод Хохберга-Бонферрони для контроля цены ошибки I порядка. К 96 неделе изменение в объеме головного мозга не значимо отличалось между указанными двумя лечебными группами

( $p=0,6237$ ). См. таблицу 7.

Таблица 7

Изменение к 96 неделе в объеме головного мозга по сравнению с исходным уровнем

	Плацебо (N=130)	Ритуксимаб (N=237)	Значение p
Исходный объем головного мозга (см <sup>3</sup> )			
Среднее (SD)	1211(129)	1203(120)	
Срединное значение	1209,5	1204,0	
Изменение объема по сравнению с исходным к 96 неделе (LOCF)			
Среднее (SD)	-9,9(37,0)	-10,8(40,3)	0,62
Срединное значение	-14,0	-13,1	

Значимое различие наблюдали между указанными двумя лечебными группами в отношении изменения объема T2-поражений от исходного уровня до 96-й недели ( $p=0,0008$ ). Срединное значение увеличения в объеме T2-поражений составило 809,50 мм<sup>3</sup> и 301,95 мм<sup>3</sup> в группах плацебо и ритуксимаба, соответственно. (См. таблицу 8 и фигуру 9).

Таблица 8

Изменение к 96-й неделе по сравнению с исходным уровнем в общем объеме T2-поражений на МРТ-сканах головного мозга пациентов и соответствие назначенному лечению

	Плацебо (N=147)	Ритуксимаб (N=292)	Значение p
Общий объем T2-поражений на МРТ-сканах головного мозга (мм <sup>3</sup> )			
Исходный			
N	147	290	
Среднее (SD)	8850,86(11808,95)	9336,66(13744,94)	
Срединное значение	5199,50	5240,50	
Разброс	73,83-74534,00	174,00-155303,0	
SE	973,99	807,13	
CI 95%	(6925,93-10775,79)	(7748,06-10925,26)	
Неделя 96			
N	147	290	
Среднее (SD)	11055,55(14536,29)	10843,80(15827,44)	

Срединное значение	5526,60	5569,35	
Разброс	94,92-86232,00	179,30-170464,0	
SE	1198,93	929,42	
CI 95%	(8686,04-13425,05)	(9014,51-12673,09)	
Изменение к 96 неделе по сравнению с исходным уровнем			
N	147	290	
Среднее (SD)	2204,69(4306,24)	1507,14(3739,45)	
Срединное значение	809,50	301,95	
Разброс	-8557,00-26367,00	-4031,00-24076,00	
SE	355,17	219,59	
CI 95%	(1502,74-2906,63)	(1074,94-1939,33)	
Разница в группе лечения (против плацебо) (метод наименьших квадратов)		-718,24	
CI 95% различия (метод наименьших квадратов)		(-1504,48;68,00)	
t-тест ANOVA (стратифицированный)			0,0733
Ранговый дисперсионный анализ ANOVA по Фридману			0,0008
t-тест ANOVA (стратифицированный) процентного изменения от исходного уровня к 96 неделе			0,0006
Ранговый дисперсионный анализ ANOVA по Фридману процентного изменения от исходного уровня к 96 неделе			0,0005

Анализ всех исследуемых целевых задач, за исключением изменения в объеме T2-поражений, увеличения T2-поражений и образования новых T2-поражений, показал, что изменения между группами плацебо и ритуксимаба являются статистически недостоверными. По сравнению с плацебо, в группе ритуксимаба было обнаружено значительно меньшее увеличение объема T2-поражений к 48-й и 122-й неделям ( $p=0,0051$  и  $0,0222$ , соответственно); меньше образовывалось новых T2-поражений к 48-й и 96-й неделям ( $p<0,001$ ); обнаруживалось меньшее количество

увеличенных по размеру T2-поражений к 48-й и 96-й неделям ( $p=0,008$  и  $0,072$ , соответственно).

#### Анализ подгрупп

Анализ подгрупп с целью выяснения первичных задач исследования включал время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, в соответствии со следующими демографическими данными и исходными характеристиками заболевания: участки поражения, возраст, пол, происхождение, предыдущая терапия РС, исходный показатель по шкале EDSS, длительность заболевания с момента появления симптома РС и исходный уровень гадолинийсодержащих (Gd) очагов поражения, а также исходный показатель степени тяжести множественного склероза (MSSS) (показатель того, как быстро у пациента прогрессирует заболевание; см. Roxburgh et al. *Neurology* 64; 1144-1151 (2005)).

Результаты анализа подгрупп предполагают наличие эффекта лечения у пациентов, которые более молоды, у которых заболевание прогрессирует быстрее (более высокий уровень по шкале MSSS) или у которых исходно имели место гадолинийсодержащие (Gd) очаги поражения (фиг. 10). Кроме того, с использованием метода многофакторного анализа были подтверждены дополнительные предсказательные эффекты перспективности лечения, связанные с возрастом, наличием исходных Gd-поражений и MSSS (фиг. 11 и фиг. 12). См. также таблицу 9. На основе полученных данных, в сочетании с MSSS, была выделена подгруппа исследуемой популяции, исключаящая более пожилых пациентов с длительно протекающим заболеванием и медленным прогрессированием, с использованием модифицированных критериев включения/исключения (возраст  $<55$ ,  $3 \leq$  исходный показатель по шкале EDSS  $\leq 6,5$ , исключение пациентов с длительностью заболевания  $>10$  лет, если их исходный показатель по шкале EDSS  $<5$ , или с длительностью заболевания  $>15$  лет, если их исходный показатель по шкале EDSS  $>5$ ). Для указанной подгруппы был также получен значимый эффект лечения (стратифицированный тест логарифмических рангов (Log-rank), значение  $P=0,01$ ; фигура 13).

Таблица 9

Суммарные результаты по Времени до Подтверждения того, что  
Заболевание Прогрессирует, по подгруппам

Подгруппы	Всего N	CDP 96 нед. Плацебо	CDP 96 нед. Ритуксимаб	HR (относи- тельный риск)	HR 95% CI	Значение P (Log- rank)
Всего пациентов (Первичный анализ)	439	38,5%	30,2%	Не опреде- лено	Не опреде- лено	0,1442
Возраст <51	215	44,9%	27,5%	0,52	(0,32, 0,86)	0,0101
Gd+	107	52,8%	27,4%	0,41	(0,21, 0,80)	0,0069
Gd+ и возраст <51	72	51,6%	24,6%	0,33	(0,14, 0,79)	0,0088
Gd+ и возраст <55	93	49,5%	29,1%	0,40	(0,19, 0,84)	0,0126
MSSS≥5 и возраст <55	251	46,8%	29,6%	0,59	(0,38, 0,91)	0,0163

Результаты анализа подгрупп предполагают, что PPMS-пациенты с признаками активного заболевания проявляют значительные клинические признаки улучшения в связи с лечением, что измеряется временем до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, а также изменением по сравнению с исходным уровнем в показателях EDSS, MSFC и T2-поражений, обнаруживаемых при МРТ головного мозга (данные не показаны). Независимые факторы, которые представляются прогностическими в отношении прогрессирования заболевания в группе плацебо и потенциально прогностическими в отношении чувствительности к лечению в группе ритуксимаба, включают следующие: более молодой возраст, в частности, возраст менее чем 51 год; наличие на исходном уровне усиливающих контрастным веществом поражений при МРТ головного мозга; и более высокая степень тяжести РС. Указанные

наблюдения соответствуют гипотезе об определяющей роли в поддержании потенциального терапевтически благоприятного эффекта истощения В-клеток при подтвержденном прогрессировании заболевания у соответствующим образом отобранных пациентов с запуском процесса прогрессирующего РС.

Хотя в настоящем исследовании и не удалось показать первичную эффективность для всей популяции пациентов с PPMS, однако анализ эффективности по подгруппам показал, что пациенты, у которых на исходном уровне имеются усиливающиеся контрастным веществом очаги поражения, выявляемые при МРТ головного мозга, это такие пациенты, которые являются потенциально чувствительными к лечению под действием ритуксимаба, с 57% относительным уменьшением риска (1-HR) подтверждения наличия прогрессирующего заболевания в группе леченых пациентов по сравнению с группой плацебо, что в большой степени, но не полностью, определяется очень высоким процентом подтвержденного прогрессирующего заболевания (CDP) в группе плацебо, составляющим 52,8% через 96 недель (фигура 10). Пациенты с PPMS в возрасте моложе 51 года также могут испытывать благоприятное воздействие лечения, с 43% относительным уменьшением риска подтверждения наличия прогрессирующего заболевания и с 44,9% подтвержденным прогрессирующим заболеванием в группе плацебо. Хотя наличие усиливающихся контрастным веществом очагов поражения и возрастного показателя <51 года давали хорошую корреляцию, при post-hoc-анализе 72 пациентов, у которых имелись обе указанные характеристики, был выявлен более четко выраженный эффект, с 77% относительным уменьшением риска подтверждения наличия прогрессирующего заболевания (таблица 9). В указанной подгруппе 51,6%-ая оценка в группе плацебо была не выше, чем оценка в отношении всех пациентов, имеющих на исходном уровне усиливающиеся контрастным веществом очаги поражения, выявляемые при МРТ головного мозга, однако в указанной подгруппе более низкий процент прогрессии в группе ритуксимаба (24,6%) относят за счет потенциально более высокой степени уменьшения риска при лечении. Такие данные, полученные с использованием плацебо

OLYMPUS, подтверждают наблюдения за естественным ходом развития заболевания в отношении клинической и МРТ-гетерогенности пациентов с PPMS (Sastre-Garriga et al. *Neurology* 65(4): 633-5 (2005), Ingle et al. *Brain* 126(Pt 11): 2528-36 (2003), Tremlett et al. *Mult Scler.* 14(3): 314-24 (2008), Tremlett et al. *Neurology* 65(12): 1919-23 (2005), Kremenchutzky et al. *Brain* 129(Pt 3): 584-94. (2006)). Кроме того, при клиническом исследовании MAGNIMS и МРТ-обследовании группы людей (когортное исследование) была описана субпопуляция пациентов с PPMS с повышенной воспалительной МРТ-активностью на ранних стадиях развития заболевания и плохим прогнозом в отношении прогрессирующей нетрудоспособности (Ingle et al. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(9): 1255-8 (2005)); данные, полученные с использованием плацебо OLYMPUS, впервые подтвердили указанные наблюдения.

**Пример 3: фаза III исследования действия окрелизумаба при прогрессирующем множественном склерозе**

Была предпринята фаза III многоцентрового рандомизированного, двойного слепого, проводимого в параллельных группах, исследования с целью оценки безопасности и эффективности 600 мг окрелизумаба по сравнению с плацебо у взрослых с прогрессирующим множественным склерозом.

Всего 630 пациентов с прогрессирующим множественным склерозом (315 с прогрессирующим началом и 315 с рецидивирующим началом РС) были включены в состав испытуемых и были разделены (рандомизация 2:1) на группы окрелизумаба или плацебо, стратифицированные по участкам поражения и типам множественного склероза. Настоящее исследование состоит из следующих трех периодов, которые распространялись на всех пациентов: периода скрининга, периода лечения и периода последующего наблюдения, когда лечение уже не проводилось. В первом курсе лечения исследуемое лекарственное средство (2× инфузии по 300 мг окрелизумаба или плацебо) вводили на дни 1 и 15. В последующих курсах лечения пациентам вводили лекарственное средство (600 мг окрелизумаба в виде однократной инфузии) каждые 24 недели, до тех пор, пока последний участвующий в испытаниях пациент не

получит предназначенный ему/ей последний курс лечения, вводимый на 96-й неделе.

Перед каждой инфузией исследуемого лекарственного средства пациентам назначали обезболивающее/жаропонижающее средство, такое как ацетаминофен/парацетамол (1 грамм), а также антигистамин, в/в или перорально (например, дифенгидрамин, 50 мг), и 100 мг метилпреднизолона внутривенно, или же их эквиваленты, для уменьшения количества случаев потенциально возможных реакций на инфузии. У пациентов с реакциями на инфузию 3-ей степени или выше (тяжелую), согласно Общей Терминологии Побочных Явлений (СТСАЕ), с ассоциированными дыхательными симптомами (стерторозное дыхание, хриплое дыхание со свистом или бронхоспазм), может быть показано дополнительное лечение бронхорасширяющими средствами.

В течение всего периода испытаний проводили рутинные лабораторные исследования, с дополнительными тестами после проведения курсов лечения исследуемыми лекарственными средствами. Осуществляли также панель «иммунного статуса», в сыворотке определяли человеческие антитела против антигенов человека (НАНА) и проводили тироидные тесты. Образцы сыворотки всех пациентов отбирали на предмет проведения фармакокинетических анализов, а образцы крови отбирали на предмет определения количества В-клеток. Количество В-клеток отслеживали в качестве фармакодинамического маркера окрелизумаба.

#### *Популяция пациентов и критерии отбора*

Целевая популяция в данном исследовании включает пациентов с прогрессирующим РС с наступлением или без наступления отчетливых периодов рецидивов. Пациенты с прогрессирующим РС, отобранные для участия в настоящем исследовании, характеризуются диагнозом, в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005), и документированной необратимой потерей неврологической функции, продолжающейся в течение 6 или более месяцев в отсутствие рецидивов. Пациентов выбирали с признаками активного заболевания и более высокого риска ускоренного прогрессирования инвалидности, используя критерии,

идентифицируемые в предшествующих клинических испытаниях среди пациентов с прогрессирующим РС как факторы потенциального риска. Такие факторы включают более молодой возраст, наличие воспаления в спинномозговой жидкости (СМЖ) (олигоклональные полосы или повышенный индекс IgG), усиливающиеся контрастным веществом поражения, выявляемые при МРТ головного мозга, высокую активность рецидивов, накладывающихся на не связанное с рецидивами прогрессирование заболевания, а также более быстрое накопление признаков инвалидности в предшествующий период.

Все пациенты, вызвавшиеся добровольно и отобранные для участия в данном исследовании, были подвергнуты скринингу на предмет подтверждения наличия следующих критериев включения и исключения:

*Критерии включения предусматривают следующее:*

1. Диагноз множественного склероза в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005).

2. Прогрессирующий множественный склероз, характеризующийся документированной необратимой потерей неврологической функции, стойко продолжающейся в течение 6 месяцев, которую нельзя объяснить клиническим рецидивом.

3. Возраст 18-55 включительно.

4. Показатель по шкале EDSS при скрининге от 3,0 до 6,5 пунктов;

5. Показатель = 2,0 по шкале оценки функциональных систем (FS) в отношении пирамидальной системы или в отношении ходьбы, который обусловлен более низкими полученными предельными значениями.

6. Присутствие по меньшей мере одного из следующих лабораторных показателей в образце СМЖ, полученном в период скрининга, или документированных в течение предшествующего 6-месячного периода, таких, например, как повышенный индекс IgG и/или олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования.

7. Наличие по меньшей мере одного из следующих критериев:

- возраст <50

- Gd+ поражений при МРТ-скрининге головного мозга или в

результате скрининга, осуществляемого в течение предшествующего 6-месячного периода

- увеличения по меньшей мере на 1,5 пункта по шкале EDSS в течение предшествующего 2-летнего периода, которое нельзя отнести за счет рецидива

- наличие в анамнезе двух рецидивов в течение предшествующего 2-летнего периода

*Критерии исключения включают следующее:*

1. Возвратно-ремиттирующий множественный склероз на момент скрининга (1-е посещение врача);

2. Длительность болезни, с момента появления симптомов РС, составляющая более 15 лет у пациентов с показателем по шкале EDSS при скрининге, составляющим  $>5,0$ , или более 10 лет у пациентов с показателем по шкале EDSS=5,0, полученном при скрининге.

*Анализ эффективности*

Первоочередной задачей в данном исследовании было изучение временного периода до получения подтверждения того, что заболевание прогрессирует. Прогрессирование заболевания определяется как повышение на  $=1,0$  пункт от исходного уровня EDSS, если исходный уровень EDSS составляет от 2,0 до 5,5 пунктов (включительно), или как повышение на  $=0,5$  пунктов, если исходный уровень EDSS составляет  $>5,5$  пунктов, при условии, что указанное изменение нельзя отнести за счет другой этиологии (например, за счет температуры, наложившегося заболевания, рецидива или обострения РС или побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства).

Шкала EDSS основана на стандартном неврологическом обследовании; производится количественная оценка в баллах по семи категориям EDSS, представляющим функциональные системы (пирамидальную, мозжечковую, систему ствола головного мозга, сенсорную, систему пищеварительного тракта и мочевого пузыря, систему зрения и церебральную и/или ментальную, плюс "другое") (в совокупности, оценка функциональных систем, или FSS). Каждая оценка FSS представляет собой последовательную клиническую оценку по шкале, имеющей диапазон от 0 до 5 или 6. Затем такие

оценки используются в сочетании с результатами осмотра и информацией, связанной со способностью к ходьбе и с использованием при этом вспомогательных устройств, для определения оценки по шкале EDSS. Шкала EDSS является шкалой нетрудоспособности, или инвалидности, имеющей цену деления в 0,5 пунктов и изменяющейся от 0 (норма) до 10 (смерть).

Вторичные задачи, связанные с эффективностью, в подтверждение эффективности первичных задач исследования, включают следующее: изменение, по сравнению с исходным уровнем, к 120-й неделе в общем объеме T2-поражений, обнаруживаемых при МРТ-сканировании головного мозга, изменение, по сравнению с исходным уровнем, к 120-й неделе во времени прохождения 25-футовой дорожки, временного периода до получения подтвержденного прогрессирования заболевания, с подтверждением, имеющем место по меньшей мере через 24 недели (=168 дней) после начавшегося прогрессирования заболевания.

#### *Установление (оценка) рецидива*

Пациентов на предмет наличия рецидива оценивали проводившие лечение исследователи при каждом посещении в течение всего периода изучения и, в случае необходимости, при внеплановых посещениях с целью подтверждения рецидивов, возникших между посещениями. В соответствии с критериями наличия рецидива, определяемого протоколом, рецидив определяется как возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов, связанных с РС и непосредственно предваряемых относительной стабильностью или улучшением неврологического состояния в течение по меньшей мере 30 дней. Симптомы должны сохраняться в течение >24 часов и должны быть таковыми, которые нельзя отнести за счет сопутствующих клинических факторов (например, за счет температуры, инфекции, повреждения, побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства). Возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов должно сопровождаться объективным неврологическим ухудшением, согласующимся с увеличением по меньшей мере на пол-балла, по шкале EDSS, или на 2 пункта, согласно одной из соответствующих систем функциональной оценки (FSS), или на 1

пункт по двум или нескольким соответствующим FSS. Указанное изменение должно отражаться на выбранных системах FSS (то есть на пирамидальном пути, на походке, должно иметь мозжечковую природу, природу, связанную со стволом головного мозга, сенсорную или связанную со зрением природу). Эпизодических спазмов, половой дисфункции, усталости, изменения настроения или неотложных позывов к мочеиспусканию или дефекации или недержания недостаточно для установления наличия рецидива.

#### *Визуализация МРТ головного мозга*

Визуализацию магнитного резонанса головного мозга и шейного отдела позвоночника получали в процессе проведения данного исследования во многих временных точках, включая время начала исследования. МРТ головного мозга включает получение следующих сканов в каждой временной точке: T2-weighted МРТ-скан и T1-weighted МРТ-скан (без усиления гадолинием).

Изменение, от исходного уровня до уровня на 120 неделе, в общем объеме T2-поражений и во времени прохождения 25-футовой дорожки, сравнивали в группах окрелизумаба и плацебо с использованием рангового вариационного анализа. Такая модель включает два стратификационных фактора, указанных в первичном анализе.

#### **Пример 4: фаза III изучения действия окрелизумаба при первично прогрессирующем множественном склерозе**

Была предпринята фаза III рандомизированного, двойного слепого, проводимого в параллельных группах многоцентрового исследования с целью оценки безопасности и эффективности одной или двух доз лечения окрелизумабом по сравнению с плацебо у взрослых с первично прогрессирующим РС.

Указанными двумя исследуемыми схемами лечения окрелизумабом были следующие: 1) схема лечения окрелизумабом в дозе 1000 мг, состоящая из двух инфузий окрелизумаба, каждая по 1000 мг, в качестве 1-го цикла лечения, с последующими однократными инфузиями по 1000 мг, вводимыми при каждом последующем цикле лечения, и 2) схема лечения окрелизумабом в дозе 600 мг, состоящая из двух инфузий по 300 мг, в качестве 1-го цикла лечения, с последующими однократными инфузиями по 600

мг в последующих циклах лечения.

Всего 630 пациентов с первично прогрессирующим множественным склерозом были включены в состав испытуемых и были разделены (рандомизация 2:1) на группы окрелизумаба или плацебо, стратифицированные в соответствии с участками поражения и типами множественного склероза. Настоящее исследование состоит из следующих трех периодов, которые распространялись на всех пациентов: периода скрининга, периода лечения и периода последующего наблюдения. В первом курсе лечения исследуемое лекарственное средство (2× инфузии окрелизумаба или плацебо) вводили на дни 1 и 15. В последующих курсах лечения пациентам вводили окрелизумаб или плацебо в виде однократной инфузии каждые 24 недели, до тех пор, пока последний участвующий в испытаниях пациент не получит предназначенный ему/ей последний курс лечения, вводимый на 96-й неделе.

Перед каждой инфузией исследуемого лекарственного средства пациентам назначали обезболивающее/жаропонижающее средство, такое как ацетаминофен/парацетамол (1 грамм), а также антигистамин, в/в или перорально (такой как дифенгидрамин, 50 мг), и 100 мг метилпреднизолона внутривенно, или же их эквиваленты, для уменьшения количества случаев потенциально возможных реакций на инфузии. У пациентов с реакциями на инфузию 3-ей степени или выше (тяжелой), согласно Общей Терминологии Побочных Явлений (СТСЯЕ), с ассоциированными дыхательными симптомами (стерторозное дыхание, хриплое дыхание со свистом или бронхоспазм), может быть показано дополнительное лечение бронхорасширяющими средствами.

В течение всего периода испытаний проводили рутинные лабораторные исследования, с дополнительными тестами после проведения курсов лечения исследуемыми лекарственными средствами. Осуществляли также панель «иммунного статуса», в сыворотке определяли человеческие антитела против антигенов человека (НАНА) и проводили тироидные тесты. Образцы сыворотки всех пациентов отбирали на предмет проведения фармакокинетических анализов, а образцы крови отбирали на

предмет определения количества В-клеток. Количество В-клеток отслеживали в качестве фармакодинамического маркера окрелизумаба.

*Популяция пациентов и критерии отбора*

Целевая популяция в данном исследовании включает пациентов с первично прогрессирующим РС. Пациенты с прогрессирующим РС, отобранные для участия в настоящем исследовании, характеризуются диагнозом, в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005). Выбирали пациентов, имеющих признаки активного заболевания и подверженных более высокому риску развития ускоренной инвалидности, используя критерии, идентифицируемые в предшествующих клинических испытаниях среди пациентов с прогрессирующим РС как факторы потенциального риска. Такие факторы включают более молодой возраст, наличие признаков воспаления в спинномозговой жидкости (СМЖ) (олигоклональные полосы или повышенный индекс IgG), а также более быстрое накопление признаков инвалидности в предшествующий период.

Все пациенты, вызвавшие добровольно и отобранные для участия в данном исследовании, были подвергнуты скринингу на предмет подтверждения наличия следующих критериев включения и исключения:

*Критерии включения предусматривают следующее:*

1. Диагноз первично прогрессирующего множественного склероза в соответствии с пересмотренными критериями McDonald (2005).
2. Возраст 18-55 включительно.
3. Показатель по шкале EDSS при скрининге от 3,0 до 6,5 пунктов.
4. Показатель  $\geq 2,0$  по шкале оценки функциональных систем (FS) в отношении пирамидальной системы, который обусловлен полученными более низкими предельными значениями.
5. Присутствие по меньшей мере одного из следующих лабораторных показателей в образце СМЖ или документированных в предшествующий период, таких, например, как повышенный индекс IgG и/или олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом

изоэлектрического фокусирования.

6. Длительность заболевания, с момента появления начальных симптомов РС, составляющая менее 15 лет у пациентов с показателем по шкале EDSS при скрининге, составляющим  $>5,0$ , или менее 10 лет у пациентов с показателем по шкале EDSS=5,0, полученном при скрининге.

*Критерии исключения включают следующее:*

1. Предыстория возвратно-ремиттирующего, вторично прогрессирующего или прогрессирующе-ремиттирующего множественного склероза на момент скрининга (1-е посещение врача).

*Анализ эффективности*

Первоочередной задачей в данном исследовании было изучение прогрессирования заболевания. Прогрессирование заболевания определяется как повышение на  $=1,0$  пункт от исходного уровня EDSS), если исходный уровень EDSS составляет от 2,0 до 5,5 пунктов (включительно), или как повышение на  $=0,5$  пункта, если исходный уровень EDSS составляет  $>5,5$  пунктов, при условии, что указанное изменение нельзя отнести за счет другой этиологии (например, за счет температуры, наложившегося заболевания, рецидива или обострения РС или побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства).

Шкала EDSS основана на стандартном неврологическом обследовании; производится количественная оценка в баллах по семи категориям EDSS, представляющим функциональные системы (пирамидальную, мозжечковую, систему ствола головного мозга, сенсорную, систему пищеварительного тракта и мочевого пузыря, систему зрения и церебральную и/или ментальную, плюс "другое") (в совокупности, оценка функциональных систем, или FSS). Каждая оценка FSS представляет собой последовательную клиническую оценку по шкале, имеющей диапазон от 0 до 5 или 6. Затем такие оценки используются в сочетании с результатами осмотра и информацией, связанной со способностью к ходьбе и с использованием при этом вспомогательных устройств, для определения оценки по шкале EDSS. Шкала EDSS является шкалой нетрудоспособности, или инвалидности, имеющей цену деления в

0,5 пунктов и изменяющейся от 0 (норма) до 10 (смерть).

Вторичные целевые задачи эффективности, в подтверждение первичных целевых задач эффективности, включают изменения, от исходного уровня до 120 недели, в полном объеме T2-поражений на МРТ-сканах головного мозга, изменения, от исходного уровня до 120 недели, в рассчитанной по времени ходьбе на 25 футов, во временном периоде до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, с подтверждением, получаемым по меньшей мере через 24 недели (=168 дней) после начала прогрессирования заболевания.

#### *Установление (оценка) рецидива*

Пациентов на предмет наличия рецидива оценивали проводившие лечение исследователи при каждом посещении в течение всего периода изучения и, в случае необходимости, при внеплановых посещениях с целью подтверждения рецидивов, возникших между посещениями. В соответствии с критериями наличия рецидива, определяемого протоколом, рецидив определяется как возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов, связанных с РС и непосредственно предваряемых относительной стабильностью или улучшением неврологического состояния в течение по меньшей мере 30 дней. Симптомы должны сохраняться в течение >24 часов и должны быть таковыми, которые нельзя отнести за счет сопутствующих клинических факторов (например, за счет температуры, инфекции, повреждения, побочных реакций на сопутствующие лекарственные средства). Возникновение новых или ухудшение неврологических симптомов должно сопровождаться объективным неврологическим ухудшением, согласующимся с увеличением по меньшей мере на полбалла, по шкале EDSS, или на 2 пункта, согласно одной из соответствующих систем функциональной оценки (FSS), или на 1 пункт по двум или нескольким соответствующим FSS. Указанное изменение должно отражаться на выбранных системах FSS (то есть на пирамидальном пути, на походке, должно иметь мозжечковую природу, природу, связанную со стволом головного мозга, сенсорную или связанную со зрением природу). Эпизодических спазмов, половой дисфункции, усталости, изменения настроения

или неотложных позывов к мочеиспусканию или дефекации, или недержания недостаточно для установления наличия рецидива.

*Визуализация МРТ головного мозга*

Визуализацию магнитного резонанса головного мозга и шейного отдела позвоночника получали в процессе проведения данного исследования во многих временных точках, включая время начала исследования. МРТ головного мозга включает получение следующих сканов в каждой временной точке: T2-weighted МРТ-скан и T1-weighted МРТ-скан (без усиления гадолинием).

Изменение, от исходного уровня до уровня на 120 неделе, в общем объеме T2-поражений и во времени прохождения 25-футовой дорожки, сравнивали в группах окрелизумаба и плацебо с использованием рангового вариационного анализа. Такая модель включает два стратификационных фактора, указанных в первичном анализе.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.  
SMITH, Craig  
CHIN, Peter S.

<120> СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО МНОЖЕСТВЕННОГО СКЛЕРОЗА

<130> 146392006140

<140> PCT/US2009/057151

<141> 2009-09-16

<150> US 61/097,464

<151> 2008-09-16

<160> 25

<210> 1

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro  
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro  
35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg  
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
65 70 75

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
95 100 105

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 2

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

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

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro

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

Lys Arg

<210> 3  
 <211> 108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

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

Ile Lys Arg

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His						
1				5					10						

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 5  
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Mus musculus

<400> 6  
Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 122  
<212> БЕЛОК  
<213> Mus musculus

<400> 7  
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly  
1 5 10 15  
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30  
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
50 55 60  
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser  
65 70 75  
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
80 85 90  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser  
95 100 105  
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val  
110 115 120  
Ser Ser

<210> 8  
<211> 122  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 8  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

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

<210> 9  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 9  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr  
 50 55 60  
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu  
 95 100 105  
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 10  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 11  
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 12  
 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 213  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 13  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90  
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 110 115 120  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 125 130 135  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 140 145 150  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 170 175 180  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val  
 185 190 195  
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 14  
 <211> 452  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 14  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30  
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser  
 95 100 105  
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 110 115 120  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 125 130 135  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 140 145 150  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 155 160 165  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 170 175 180  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 185 190 195  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 215 220 225  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 275 280 285  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 320 325 330  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 335 340 345  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 350 355 360  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 365 370 375  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 395 400 405  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 410 415 420  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 425 430 435  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 440 445 450

Gly Lys

<210> 15

<211> 452

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 15

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr



Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 440 445 450

Gly Lys

<210> 16

<211> 213

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 16

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

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

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 155 160 165  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 170 175 180  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val  
 185 190 195  
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 17

<211> 452

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30  
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg  
 95 100 105  
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 110 115 120  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 125 130 135  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 140 145 150  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 155 160 165  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 170 175 180  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 185 190 195  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

	200		205		210
Pro Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys Lys	Val Glu Pro Lys Ser	Cys		
	215		220		225
Asp Lys Thr His	Thr Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Glu Leu	Leu		
	230		235		240
Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys Asp	Thr		
	245		250		255
Leu Met Ile Ser	Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp		
	260		265		270
Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys	Phe Asn Trp Tyr Val	Asp		
	275		280		285
Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln		
	290		295		300
Tyr Asn Ala Thr	Tyr Arg Val Val Ser	Val Leu Thr Val Leu	His		
	305		310		315
Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn		
	320		325		330
Ala Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Ala Ala	Thr Ile Ser Lys Ala	Lys		
	335		340		345
Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg		
	350		355		360
Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys		
	365		370		375
Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly		
	380		385		390
Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser		
	395		400		405
Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser		
	410		415		420
Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu		
	425		430		435
Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro		
	440		445		450

Gly Lys

<210> 18

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> Вариант

<222> 9

<223> Хаа представляет собой М или L

<400> 18

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His  
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> Вариант

<222> 4

<223> Хаа представляет собой S или A

<400> 19

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr  
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> Вариант

<222> 8

<223> Хаа представляет собой D или A

<400> 20

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 21

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> Вариант

<222> 6

<223> Хаа представляет собой N, A, Y, W или D

<220>

<221> Вариант

<222> 7

<223> Хаа представляет собой S или R

&lt;400&gt; 21

Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30  
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser  
 95 100 105  
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 110 115 120  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 125 130 135  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 140 145 150  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 155 160 165  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 170 175 180  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 185 190 195  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 200 205 210  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 215 220 225  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 275 280 285  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 320 325 330  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 335 340 345  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 350 355 360  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 365 370 375  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 395 400 405  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 410 415 420  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 425 430 435  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 440 445 450

Gly

<210> 23

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
95 100 105

Lys Arg

<210> 24

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 24

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg  
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
110 115 120

Ser Ser

<210> 25

<211> 451

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 25

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

				35						40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				110					115					120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
				125					130					135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
				140					145					150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
				155					160					165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				170					175					180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				185					190					195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				200					205					210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				215					220					225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				275					280					285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				290					295					300	
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
				305					310					315	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				320					325					330	
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
				335					340					345	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
				350					355					360	

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 365 370 375  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 395 400 405  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 410 415 420  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 425 430 435  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 440 445 450  
 Gly

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, где указанное лечение основано на том, что пациент имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, составляющего приблизительно менее чем 55 лет, (б) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

2. Способ по п. 1, согласно которому прогрессирующий множественный склероз является первично прогрессирующим множественным склерозом.

3. Способ по п. 1, согласно которому прогрессирующий множественный склероз является вторично прогрессирующим множественным склерозом.

4. Способ по п. 1, согласно которому прогрессирующий множественный склероз является прогрессирующе-рецидивирующим множественным склерозом.

5. Способ по п. 1, согласно которому на момент начала лечения возвратно-ремиттирующий множественный склероз у пациента не диагностировался.

6. Способ по п. 1, согласно которому в образце, взятом у пациента, дополнительно обнаруживается воспаление.

7. Способ по п. 6, согласно которому указанным образцом является образец спинномозговой жидкости.

8. Способ по п. 7, согласно которому на воспаление указывает повышенный показатель IgG.

9. Способ по п. 7, согласно которому на воспаление указывают олигоклональные полосы IgG, детектируемые методом изоэлектрического фокусирования.

10. Способ по п. 1, согласно которому у пациента показатель EDSS превышает приблизительно 5,0 в течение менее

чем приблизительно 15-летнего периода.

11. Способ по п. 1, согласно которому у пациента показатель EDSS меньше или равен приблизительно 5,0 в течение менее чем приблизительно 10-летнего периода.

12. Способ по п. 1, согласно которому повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания.

13. Способ по п. 1, согласно которому повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения составляет повышение по меньшей мере приблизительно на 1,5 пункта по шкале EDSS.

14. Способ по п. 13, согласно которому повышение показателя EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения не связано с рецидивом заболевания.

15. Способ по п. 1, согласно которому возраст пациента составляет приблизительно менее 51 года.

16. Способ по п. 1, согласно которому пациент дополнительно перенес два или более рецидивов в течение двухлетнего периода перед началом лечения.

17. Способ по п. 1, согласно которому показатель EDSS на момент начала лечения составляет приблизительно от 3,0 примерно до 6,5.

18. Способ по п. 1, согласно которому указанное лечение сокращает время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует.

19. Способ по п. 18, согласно которому подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двенадцати недель.

20. Способ по п. 18, согласно которому подтверждением прогрессирования заболевания является повышение показателя EDSS, который поддерживается в течение двадцати четырех недель.

21. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антитело содержит а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три области CDR, включающие SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую три области CDR, включающие SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

22. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является окрелизумаб.

23. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является ритуксимаб.

24. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является офатумумаб.

25. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является TRU-015 или SBI-087.

26. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является GA101.

27. Способ по п. 1, согласно которому анти-CD20-антителом является hA20.

28. Способ по п. 1, согласно которому пациенту вводят эффективное количество анти-CD20-антитела для обеспечения первоначального воздействия анти-CD20-антитела, количество которого приблизительно составляет от 0,3 примерно до 4,0 граммов, с последующим вторым воздействием анти-CD20-антитела, количество которого приблизительно составляет от 0,3 примерно до 4,0 граммов.

29. Способ по п. 28, согласно которому первоначальное воздействие анти-CD20-антитела и/или второе воздействие анти-CD20-антитела составляют приблизительно от 0,3 примерно до 1,5 граммов.

30. Способ по п. 29, согласно которому указанное второе воздействие осуществляют не ранее чем приблизительно через 16-60 недель после первоначального воздействия.

31. Способ по п. 30, согласно которому каждое из указанных воздействий анти-CD20-антителом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз анти-CD20-антитела.

32. Способ лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела, при условии, что пациент имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (б) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) повышения по меньшей мере

приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов.

33. Способ лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающий:

(a) выбор пациента с прогрессирующим множественным склерозом, при условии, что пациент имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей выше чем приблизительно 5 пунктов, и

(b) введение выбранному таким образом пациенту эффективного количества анти-CD20-антитела.

34. Способ определения, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом чувствителен к лечению анти-CD20-антителом, включающий определение у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, при этом одна или более из таких характеристик у пациента указывает на то, что пациент будет реагировать на указанное лечение.

35. Способ идентификации пациента с прогрессирующим множественным склерозом, который окажется чувствительным к лечению анти-CD20-антителом, при этом указанный способ включает

(a) установление у пациента одной или более характеристик,

выбранных из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов; и

(b) идентификации пациента, соответствующего по одной или нескольким характеристикам, выбранным из группы, состоящей из (i) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (ii) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (iii) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (iv) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов.

36. Способ маркетинга анти-CD20-антитела или содержащей его фармацевтически приемлемой композиции для применения в отношении субпопуляции пациентов с прогрессирующим множественным склерозом, при этом указанный способ включает информирование целевой аудитории о применении анти-CD20-антитела для лечения пациентов указанной субпопуляции, характеризующихся как пациенты такой субпопуляции, которая имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (a) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (c) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS) составляет выше чем приблизительно 5 пунктов.

37. Изделие, содержащее совместно упакованные фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD20-антитело и фармацевтически приемлемый носитель, и этикетку, на которой

отмечено, что указанное анти-CD20-антитело или фармацевтическая композиция предназначены для лечения пациентов со множественным склерозом, которые имеют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS) составляет выше чем приблизительно 5 пунктов.

38. Способ предсказания того, будет ли пациент с прогрессирующим множественным склерозом отвечать на лечение лекарственным средством, используемым для лечения множественного склероза, включающий установление у пациента одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из (а) возраста, приблизительно составляющего менее чем 55 лет, (b) наличия одного или более окрашивающихся гадолинием поражений, (с) наличия повышения по меньшей мере приблизительно на один пункт показателя, согласно Расширенной шкале инвалидизации (EDSS), в течение двухлетнего периода перед началом лечения, и (d) оценки по Шкале тяжести множественного склероза (MSSS), составляющей более чем приблизительно 5 пунктов, при этом возрастной показатель, наличие окрашивающихся гадолинием поражений, повышение показателя по шкале EDSS в течение двухлетнего периода перед началом лечения или сочетание указанных признаков указывает на то, что пациент окажется чувствительным к указанному лечению.

39. Способ лечения прогрессирующего множественного склероза у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества окрелизумаба для обеспечения первоначального воздействия окрелизумаба в количестве, приблизительно составляющем от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с последующим введением, в качестве второго воздействия, окрелизумаба в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 0,6 граммов, при этом второе воздействие окрелизумаба осуществляют

приблизительно не ранее чем через 16-60 недель после первоначального воздействия, и каждое из воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба.

40. Способ по п. 39, согласно которому первоначальное воздействие окрелизумаба включает первую дозу и вторую дозу окрелизумаба, при этом первая доза и вторая доза окрелизумаба составляет приблизительно 0,3 грамма.

41. Способ по п. 40, согласно которому второе воздействие окрелизумаба осуществляется в виде однократной дозы окрелизумаба, при этом однократная доза окрелизумаба составляет 0,6 граммов.

42. Способ по п. 41, согласно которому второе воздействие окрелизумаба осуществляется приблизительно через 24 недели после первого воздействия окрелизумаба.

43. Способ по п. 42, дополнительно предусматривающий третье воздействие окрелизумабом.

44. Способ по п. 43, дополнительно предусматривающий четвертое воздействие окрелизумабом.

45. Способ по п. 44, дополнительно предусматривающий пятое воздействие окрелизумабом.

46. Способ по п. 42, дополнительно включающий приблизительно от одного примерно до трех последовательных воздействий окрелизумабом.

47. Изделие, содержащее:

(a) контейнер, содержащий окрелизумаб; и

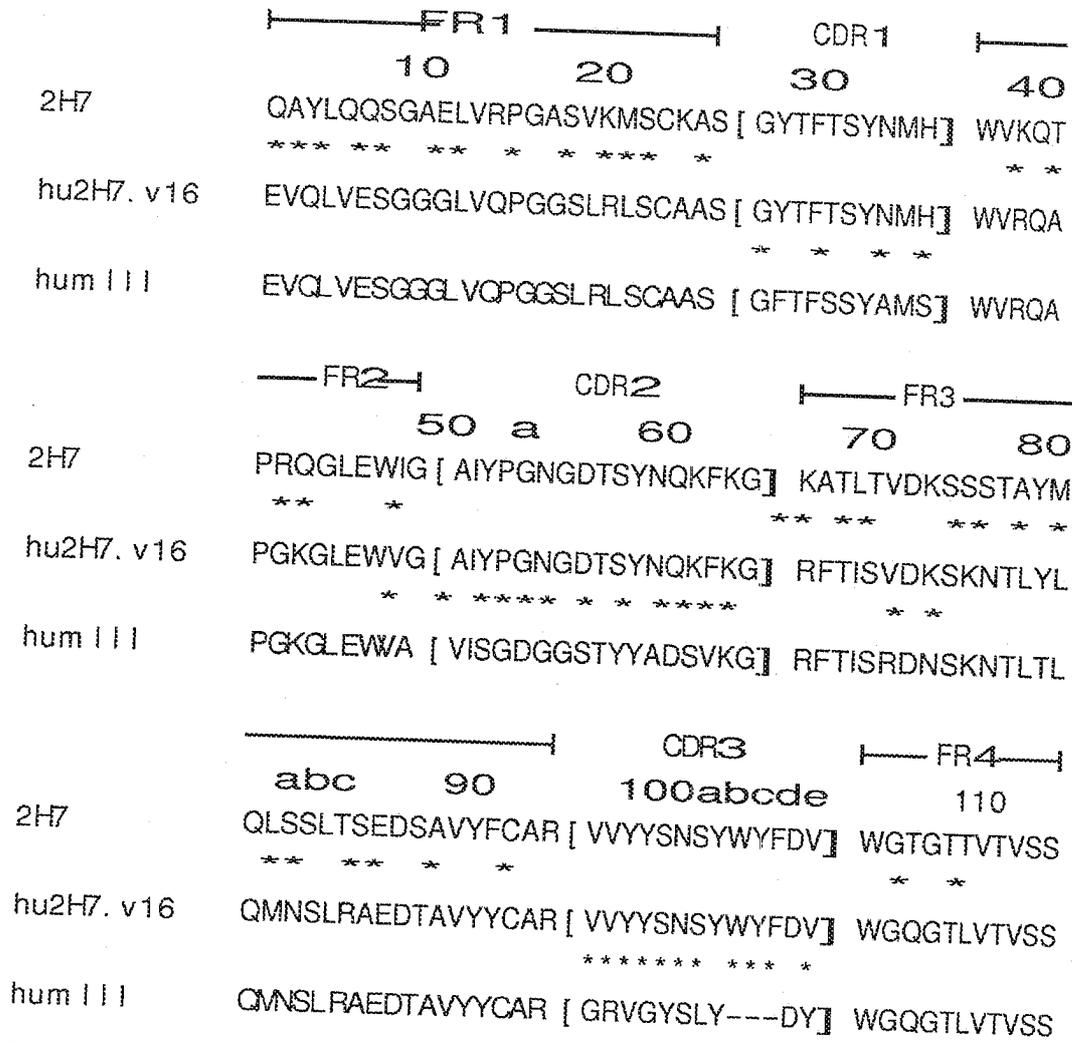
(b) вкладыш в упаковку с инструкциями в отношении лечения множественного склероза у пациента, при этом в инструкциях указано, что пациенту вводят количество окрелизумаба, которое эффективно для обеспечения первоначального воздействия окрелизумаба и которое приблизительно составляет от 0,3 примерно до 0,6 граммов, с последующим введением для второго воздействия окрелизумаба в количестве приблизительно от 0,3 примерно до 0,6 граммов, при этом второе воздействие окрелизумаба осуществляют приблизительно не ранее чем через 16-60 недель после первоначального воздействия и что каждое из

воздействий окрелизумабом обеспечивают пациенту в виде одной или двух доз окрелизумаба.

По доверенности



Выравнивание последовательностей переменного домена тяжелой цепи



Фиг.1В

Легкая цепь гуманизованного антитела 2H7.v16

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSVSVMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK  
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

## Фиг.2

Тяжелая цепь гуманизованного антитела 2H7.v 16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYPGNGDTSYNQK  
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY  
TQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

## Фиг.3

Тяжелая цепь гуманизованного антитела 2H7.v 31

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYPGNGDTSYNQK  
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY  
TQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

## Фиг.4

## Выравнивание легкой цепи

```

          1                               32
hu2H7. v16  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP
          *****
hu2H7. v511  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP

          52
hu2H7. v16  SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG
          *****
hu2H7. v511  SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG

          102
hu2H7. v16  TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
          *****
hu2H7. v511  TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

          152
hu2H7. v16  NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
          *****
hu2H7. v511  NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL

          202           214
hu2H7. v16  SSPVTKSFNRGEC
          *****
hu2H7. v511  SSPVTKSFNRGEC

```

Фиг.5

Выравнивание тяжелой цепи

```

1
hu2H7. v 1 6   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW
*****
hu2H7. v 5 1 1   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW

37              52a              82abc
hu2H7. v 1 6   VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
*****
hu2H7. v 5 1 1   VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL

83              1 0 0 a b c d e              1 1 3
hu2H7. v 1 6   RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS
*****
hu2H7. v 5 1 1   RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGLTVTVSS

1 1 8
hu2H7. v 1 6   ASTKGPSVFPLAPS
*****
hu2H7. v 5 1 1   ASTKGPSVFPLAPS

1 3 2
hu2H7. v 1 6   SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
*****
hu2H7. v 5 1 1   SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

1 8 2
hu2H7. v 1 6   LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
*****
hu2H7. v 5 1 1   LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA

2 3 2
hu2H7. v 1 6   PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
*****
hu2H7. v 5 1 1   PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

2 8 2
hu2H7. v 1 6   VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
*****
hu2H7. v 5 1 1   VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAP

3 3 2
hu2H7. v 1 6   IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
*
*****
hu2H7. v 5 1 1   IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

3 8 2
hu2H7. v 1 6   ESNQGPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
*****
hu2H7. v 5 1 1   ESNQGPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

4 3 2              4 4 7
hu2H7. v 1 6   LHNHYTQKSLSLSPGK
*****
hu2H7. v 5 1 1   LHNHYTQKSLSLSPGK

```

Фиг. 6

## Общее представление плана исследования и схемы лечения

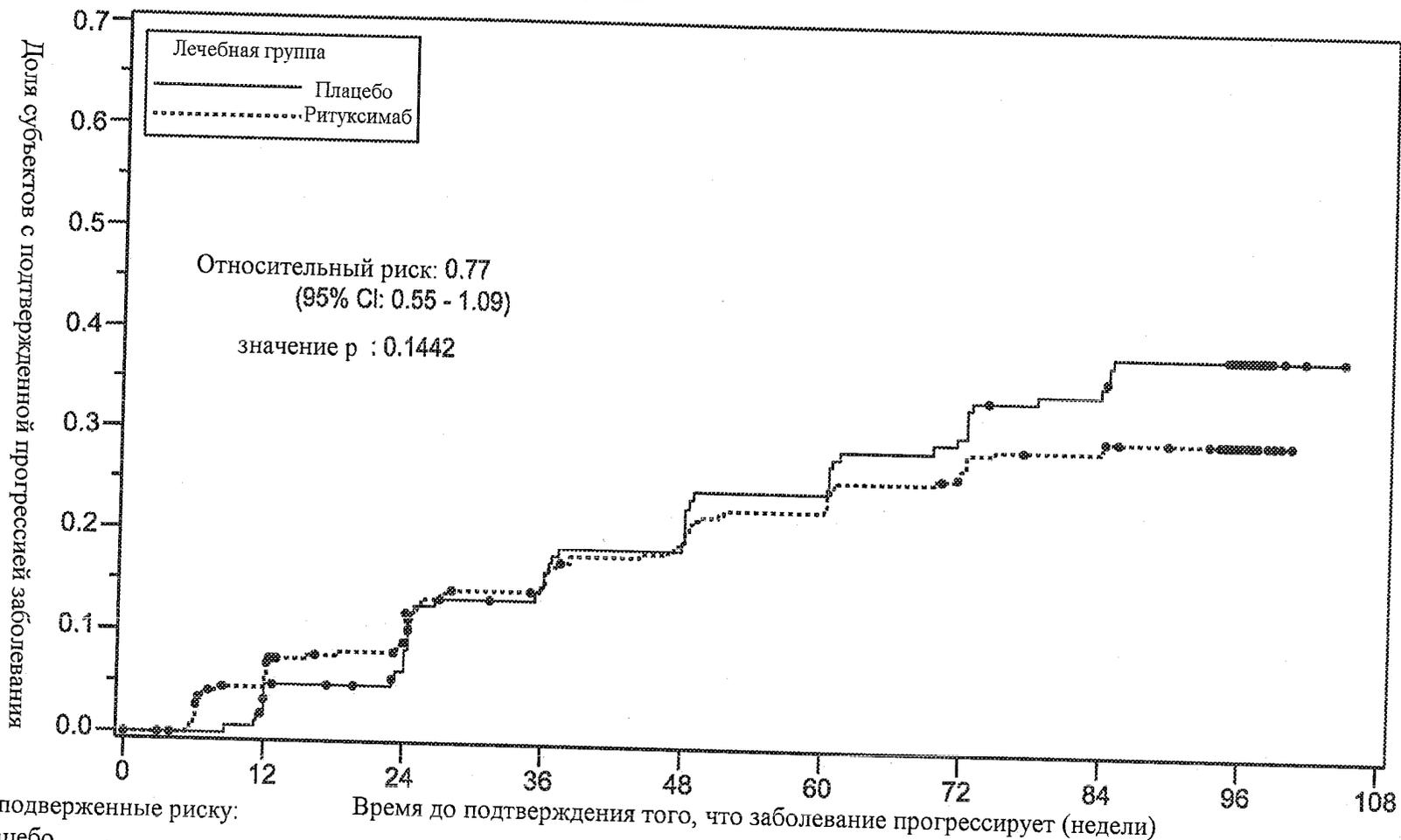
Скрининг	Рандомизация	Период лечения						Период отсутствия лечения		
		Период лечения 96-недельного испытания (4 цикла лечения <sup>1</sup> )						Период последующего наблюдения	Период мониторинга В-клеток	Период наблюдения
28 дней	Группа	1-й цикл		2-й цикл <sup>2,7</sup>		3-й цикл <sup>3,7</sup>	4-й цикл <sup>7</sup>	24 недели	Изменяемый	24 недели
		День 1	День 15	День 1	День 15	День 1	День 1			
	<b>A</b> (режим дозирования 1000 мг)	Окрелизумаб 1000 мг в/в	Окрелизумаб 1000 мг в/в	Окрелизумаб 1000 мг в/в	Плацебо в/в	Окрелизумаб 1000 мг в/в <sup>5</sup>	Окрелизумаб 1000 мг в/в <sup>5</sup>			
	<b>B</b> (режим дозирования 600 мг)	Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 600 мг в/в	Плацебо в/в	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>			
	<b>C</b> (Плацебо)	Плацебо в/в	Плацебо в/в	Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>			
	<b>D<sup>4</sup></b> (Авонекс)	Авонекс 30 мкг в/м еженедельно		Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 300 мг в/в	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>	Окрелизумаб 600 мг в/в <sup>6</sup>			

6 / 18

1. Каждый цикл лечения имеет продолжительность в 24 недели.
2. Всем группам назначают двойную инфузию, то есть две внутривенные инфузии с интервалом в 14 дней. Для поддержания слепого метода в группах А, В и С, пока база данных закрыта для первичного анализа, двойной инфузией будет либо инфузия окрелизумаба с последующей инфузией плацебо (группы А и В), либо инфузия окрелизумаба с последующей инфузией окрелизумаба (группа С).
3. Что касается третьего цикла лечения, во всех группах вводят единственную инфузию окрелизумаба. Однако пациенты, которые пропускают свой 2-й цикл лечебной дозировки, получают дозировку 2-го лечебного цикла (две инфузии с интервалом в 14 дней) в процессе 3-его цикла лечения.
4. Пациентам из группы D (Авонекс) предлагают вводить окрелизумаб на добровольной основе.
5. Пациентов будут лечить дозой в 1000 мг до тех пор, пока на основании первичного анализа не будет выбрана предпочтительная доза, и в это время исследователи и члены комитета по этике будут проинформированы относительно предпочтительной дозы. После того как предпочтительная доза будет выбрана, пациенты в последующих циклах (последующем цикле) лечения будут получать предпочтительную дозу (600 мг или 1000 мг).
6. Пациентов будут лечить дозой в 600 мг до тех пор, пока на основании первичного анализа не будет выбрана предпочтительная доза, и в это время исследователи и члены комитета по этике будут проинформированы относительно предпочтительной дозы. После того как предпочтительная доза будет выбрана, пациенты в последующих циклах (последующем цикле) лечения будут получать предпочтительную дозу (600 мг или 1000 мг).
7. Перед 2-м, 3-им и 4-м циклами введения дозировок предпринимают клиническую оценку для того, чтобы удостовериться, что пациенты все еще удовлетворяют критериям отбора для дальнейшего лечения.

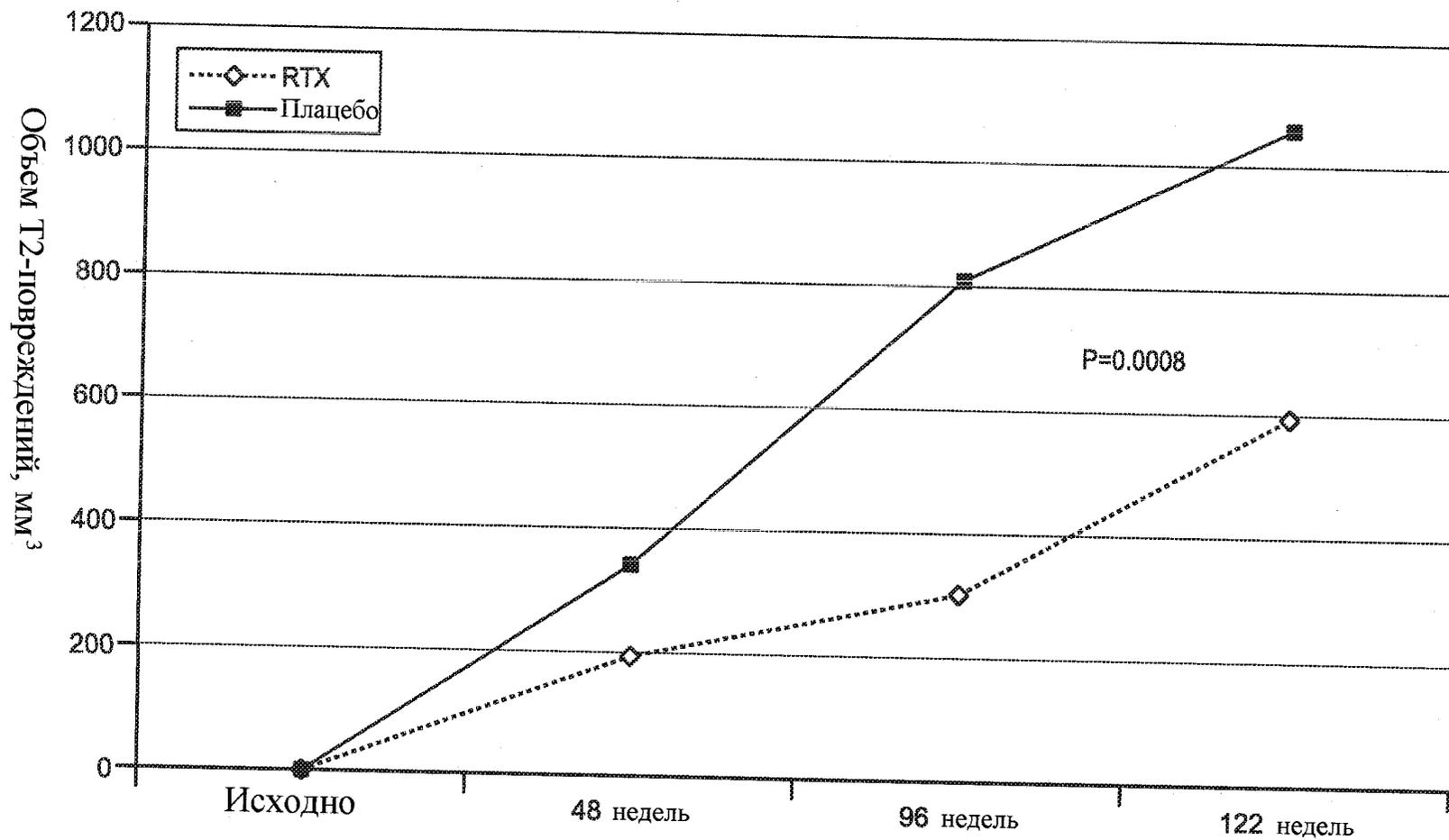
Фиг.7

Время до подтверждения того, что заболевание прогрессирует, в период лечения субъектов, в зависимости от назначенного лечения



Субъекты, подверженные риску:	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
Плацебо	147	142	131	116	110	103	95	87	58	0
Ритуксимаб	292	269	253	231	216	208	194	185	136	1

Фиг.8

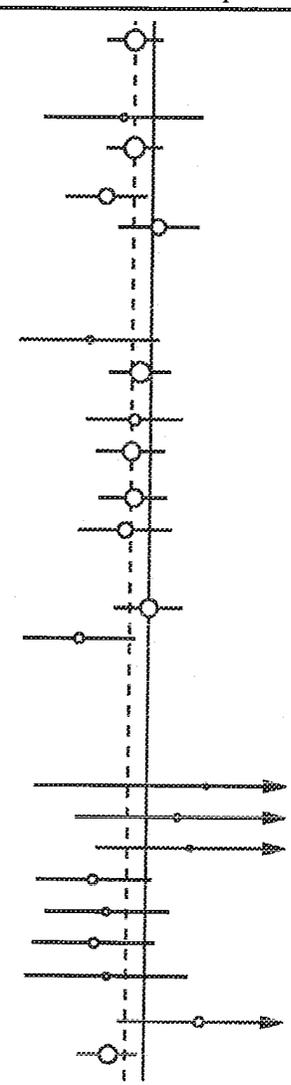


Фиг.9

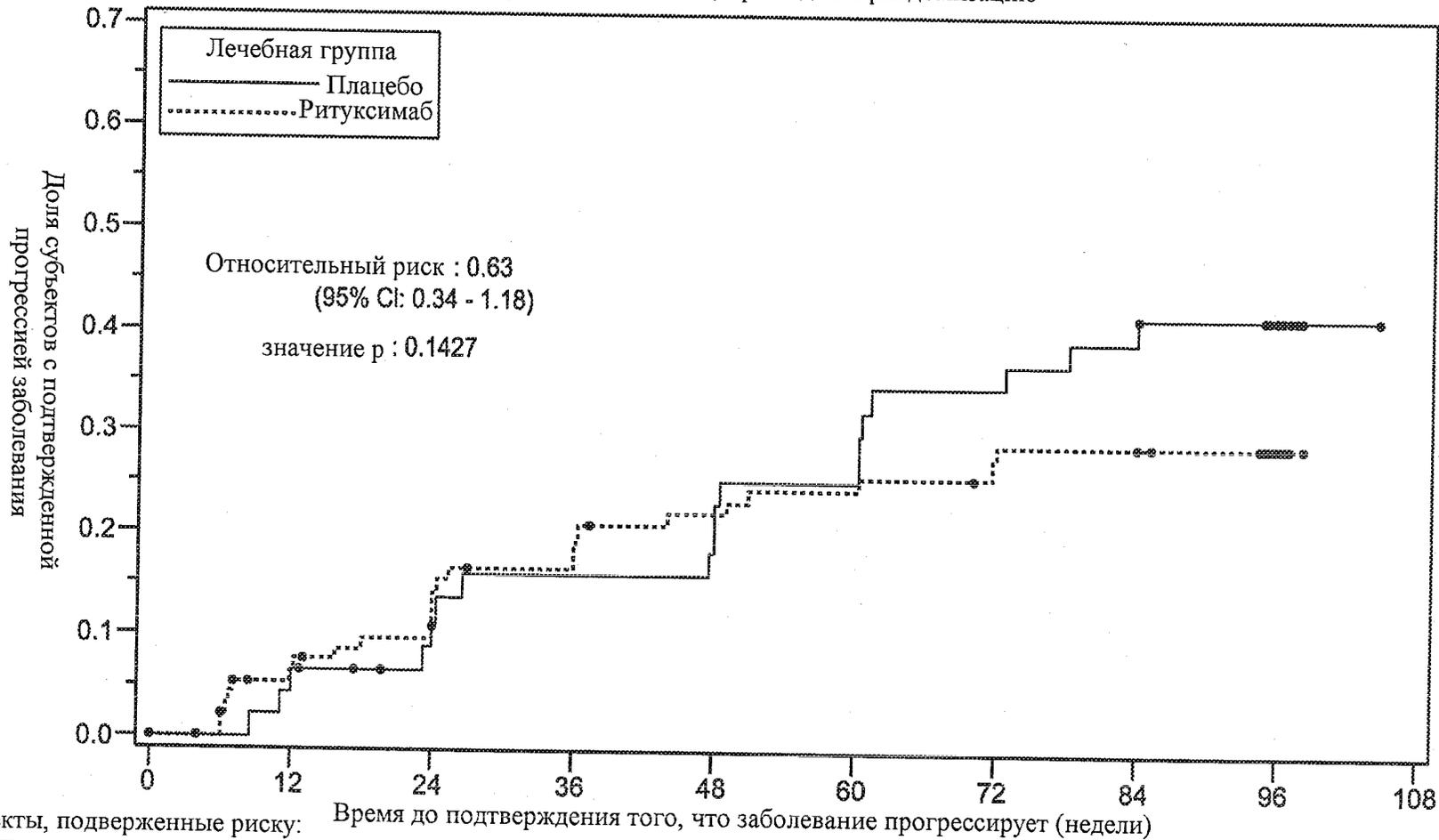
Фиг.10

Исходные характеристики	Всего n	Относительное содержание субъектов с CDP						Относительный риск	(95% CI)	Относительный риск
		Плацебо		Ритуксимаб						
		n	неделя 48	неделя 96	n	неделя 48	неделя 96			
Все субъекты	439	147	19.3%	38.5%	292	19.8%	30.2%	0.79	(0.56, 1.12)	
Возраст (годы)										
< 40	60	20	22.0%	38.7%	40	18.8%	27.3%	0.69	(0.26, 1.81)	
>= 40	379	127	18.9%	38.5%	252	19.9%	30.7%	0.81	(0.56, 1.17)	
< 51	215	70	24.4%	44.9%	145	18.3%	27.5%	0.57	(0.35, 0.93)	
>= 51	224	77	14.8%	32.9%	147	21.2%	32.8%	1.08	(0.66, 1.77)	
Продолжительность болезни РС										
<= 3 год.	66	25	28.0%	48.0%	41	21.0%	23.8%	0.47	(0.20, 1.12)	
> 3 год.	373	122	17.4%	36.4%	251	19.6%	31.2%	0.88	(0.60, 1.29)	
<= 5 год.	128	50	20.5%	39.3%	78	21.6%	31.8%	0.83	(0.45, 1.52)	
> 5 год.	311	97	18.6%	38.1%	214	19.1%	29.7%	0.79	(0.52, 1.20)	
<= 10 год.	287	94	19.4%	39.3%	193	23.9%	30.7%	0.82	(0.54, 1.26)	
> 10 год.	152	53	19.2%	37.1%	99	11.7%	29.2%	0.75	(0.42, 1.35)	
Исходный уровень GD-повреждений										
0	330	110	16.1%	33.8%	220	22.0%	31.0%	0.98	(0.65, 1.47)	
>= 1	107	37	29.0%	52.8%	70	13.5%	27.4%	0.43	(0.22, 0.83)	
MSSS										
1 <- 2					2	0.0%	50.0%			
2 <- 3	11	3	0.0%	0.0%	8	12.5%	37.5%			
3 <- 4	29	8	12.5%	12.5%	21	15.3%	25.9%	2.11	(0.25, 18.05)	
4 <- 5	50	22	9.1%	18.2%	28	19.6%	24.3%	1.47	(0.41, 5.21)	
5 <- 6	37	15	30.0%	30.0%	22	34.5%	49.6%	1.74	(0.54, 5.54)	
6 <- 7	87	29	26.4%	53.5%	58	21.1%	29.8%	0.52	(0.26, 1.06)	
7 <- 8	73	22	18.7%	52.2%	51	16.1%	34.5%	0.61	(0.29, 1.30)	
8 <- 9	94	28	30.0%	46.1%	66	22.3%	25.7%	0.54	(0.25, 1.14)	
9 <- 10	56	20	5.3%	38.7%	36	15.1%	24.5%	0.62	(0.23, 1.72)	
<= 5.0	92	33	9.1%	15.2%	59	16.3%	28.0%	2.01	(0.73, 5.53)	
> 5.0	347	114	22.5%	45.9%	233	20.6%	30.8%	0.65	(0.45, 0.94)	

9 / 18



Возраст <51; исходный уровень GD-повреждений =0  
в популяции пациентов, прошедших рандомизацию

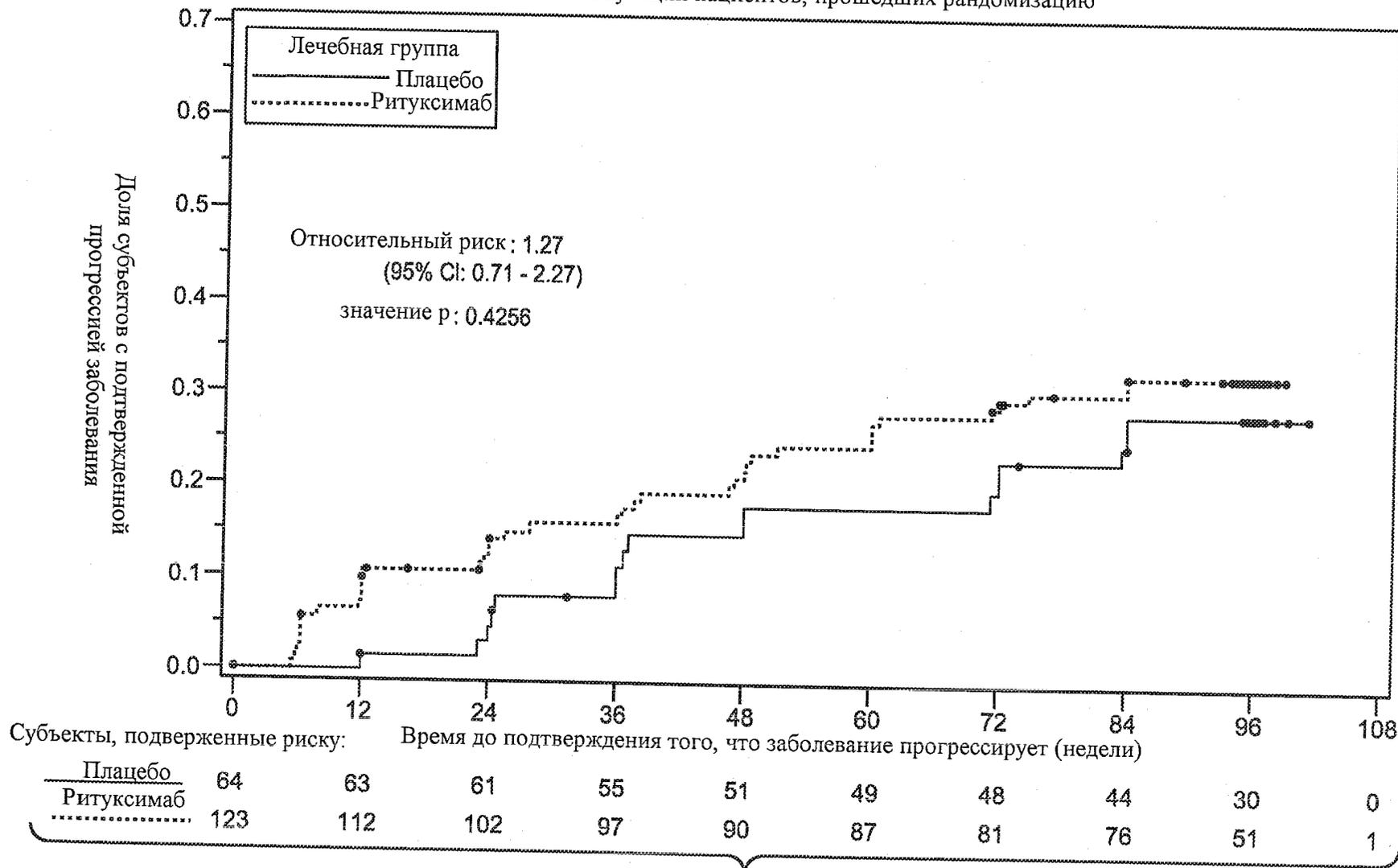


Субъекты, подверженные риску:

	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
Плацебо	46	44	39	36	35	32	28	26	19	0
Ритуксимаб	97	86	82	74	68	66	62	61	44	0

Фиг.11А

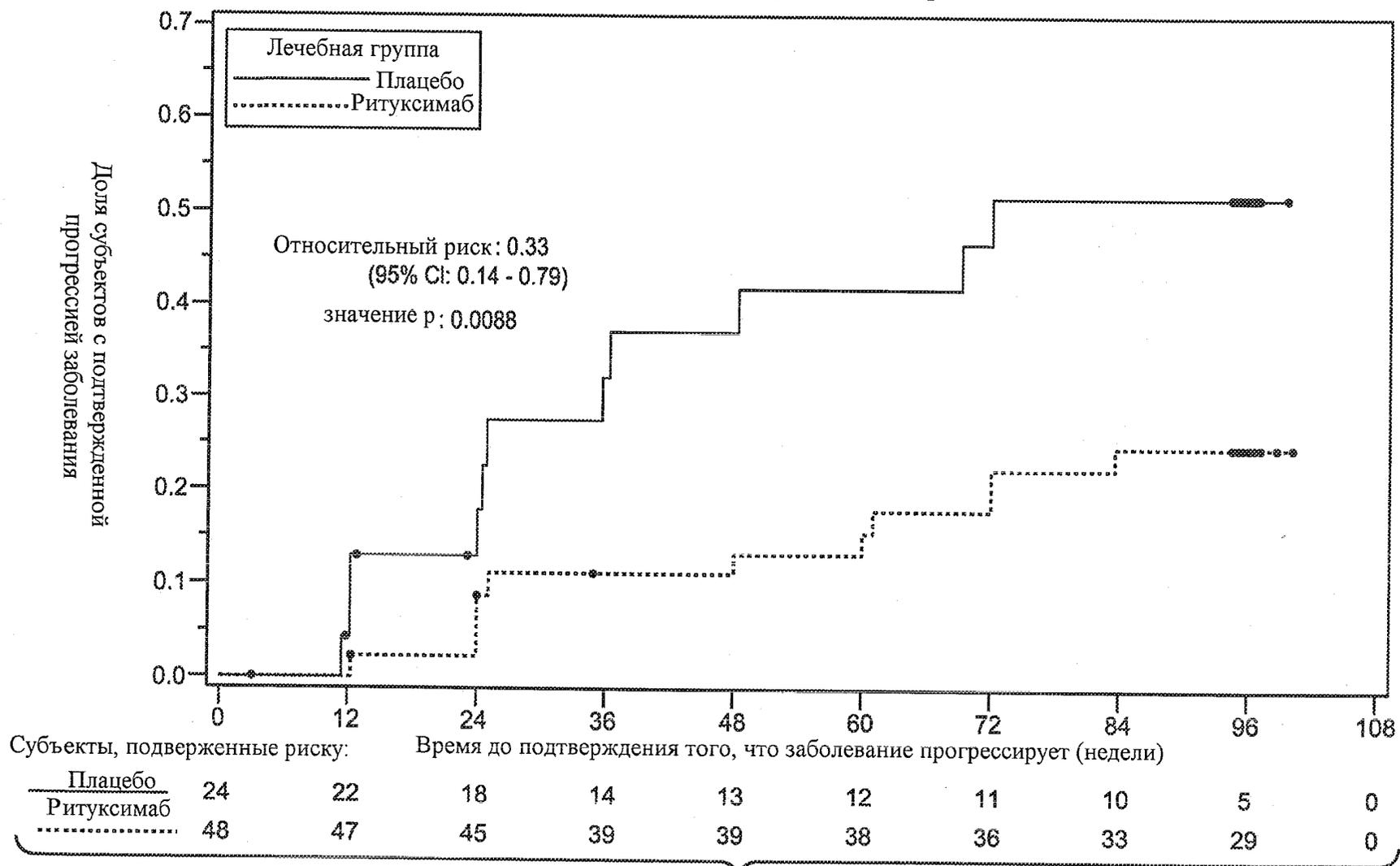
Возраст  $\geq 51$ ; исходный уровень GD-повреждений = 0  
в популяции пациентов, прошедших рандомизацию



11 / 18

Фиг.11В

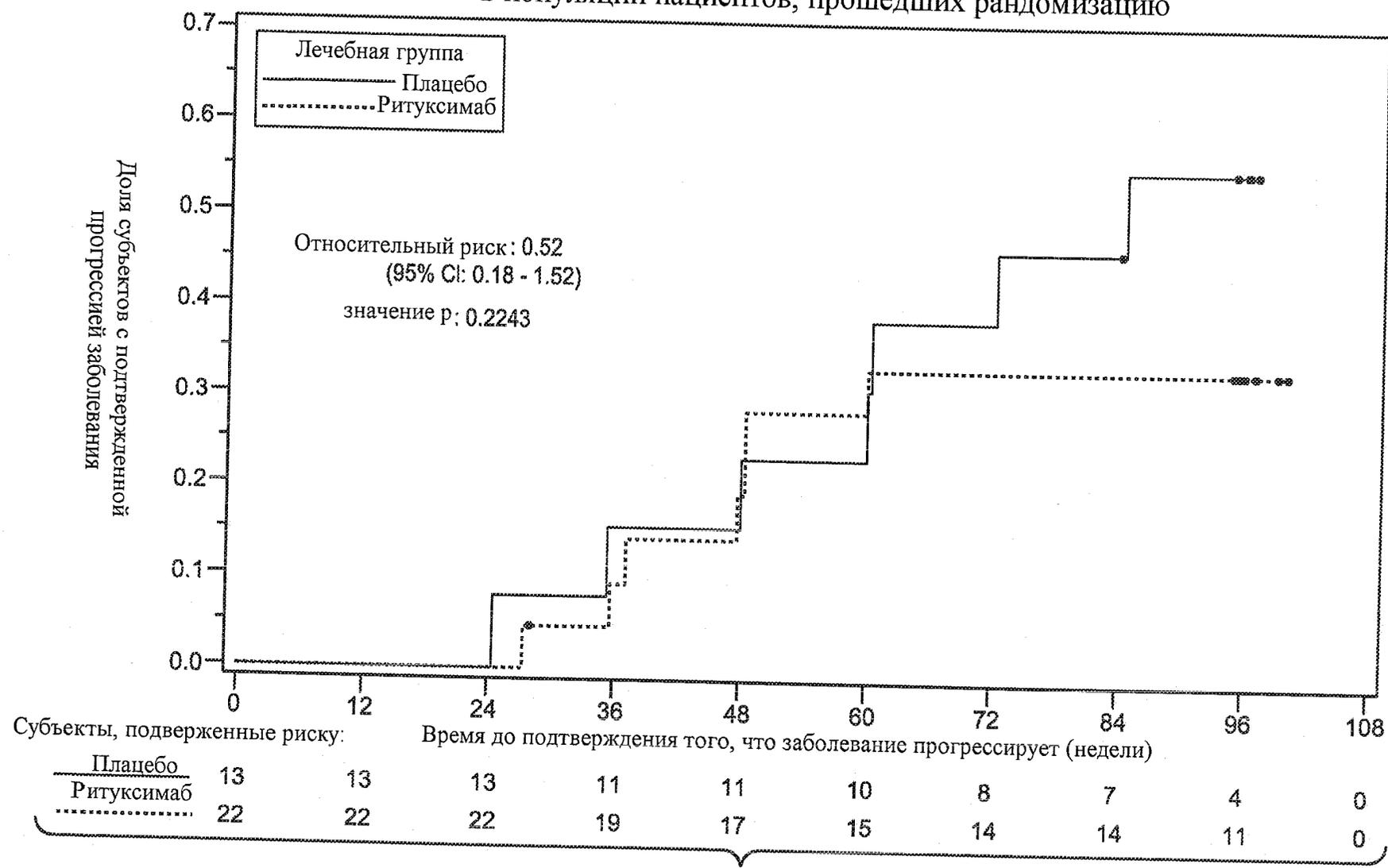
Возраст <51; исходный уровень GD-повреждений  $\geq 1$   
в популяции пациентов, прошедших рандомизацию



12 / 18

Фиг.11С

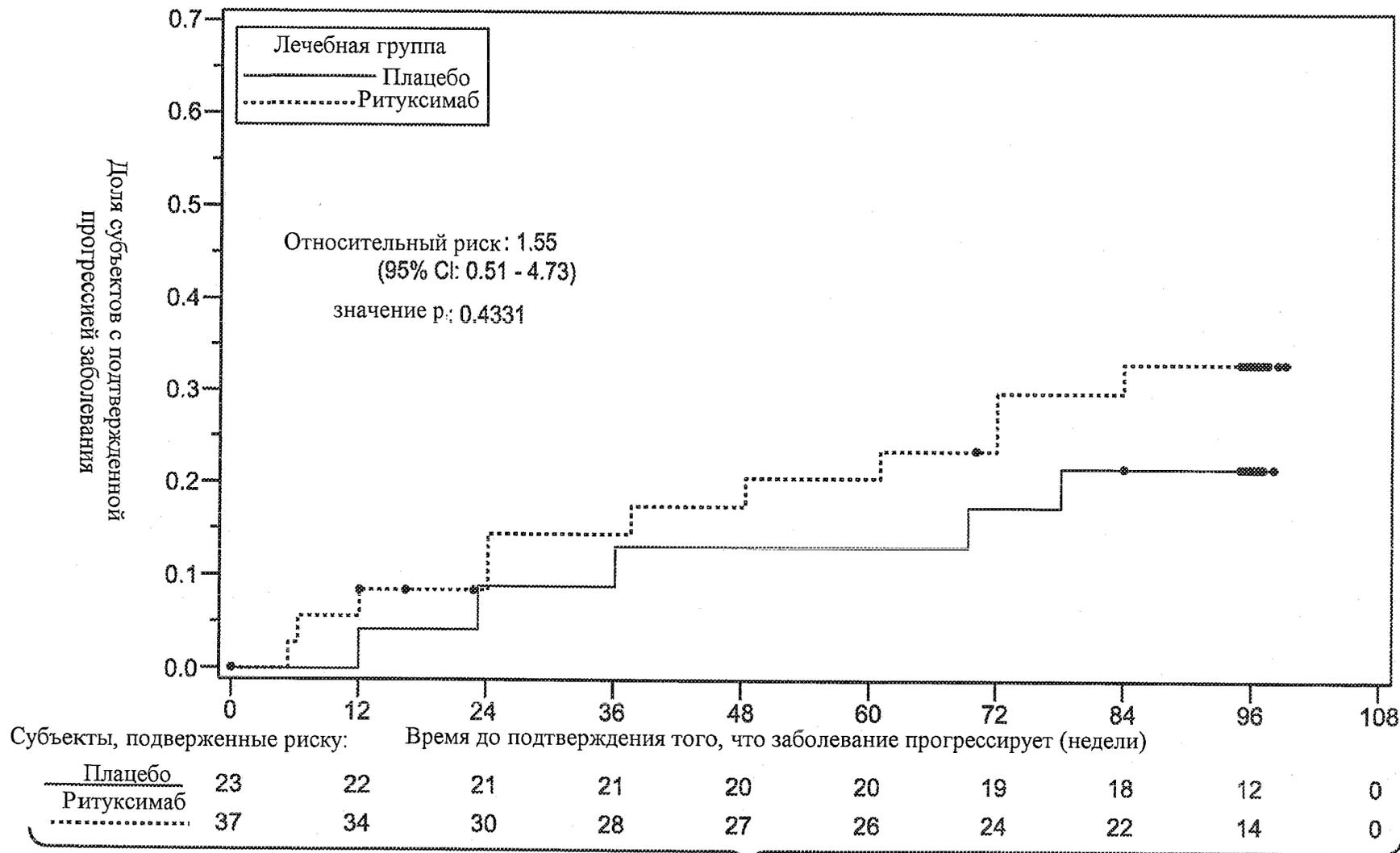
Возраст  $\geq 51$ ; исходный уровень GD-повреждений  $\geq 1$   
 в популяции пациентов, прошедших рандомизацию



13 / 18

Фиг.11D

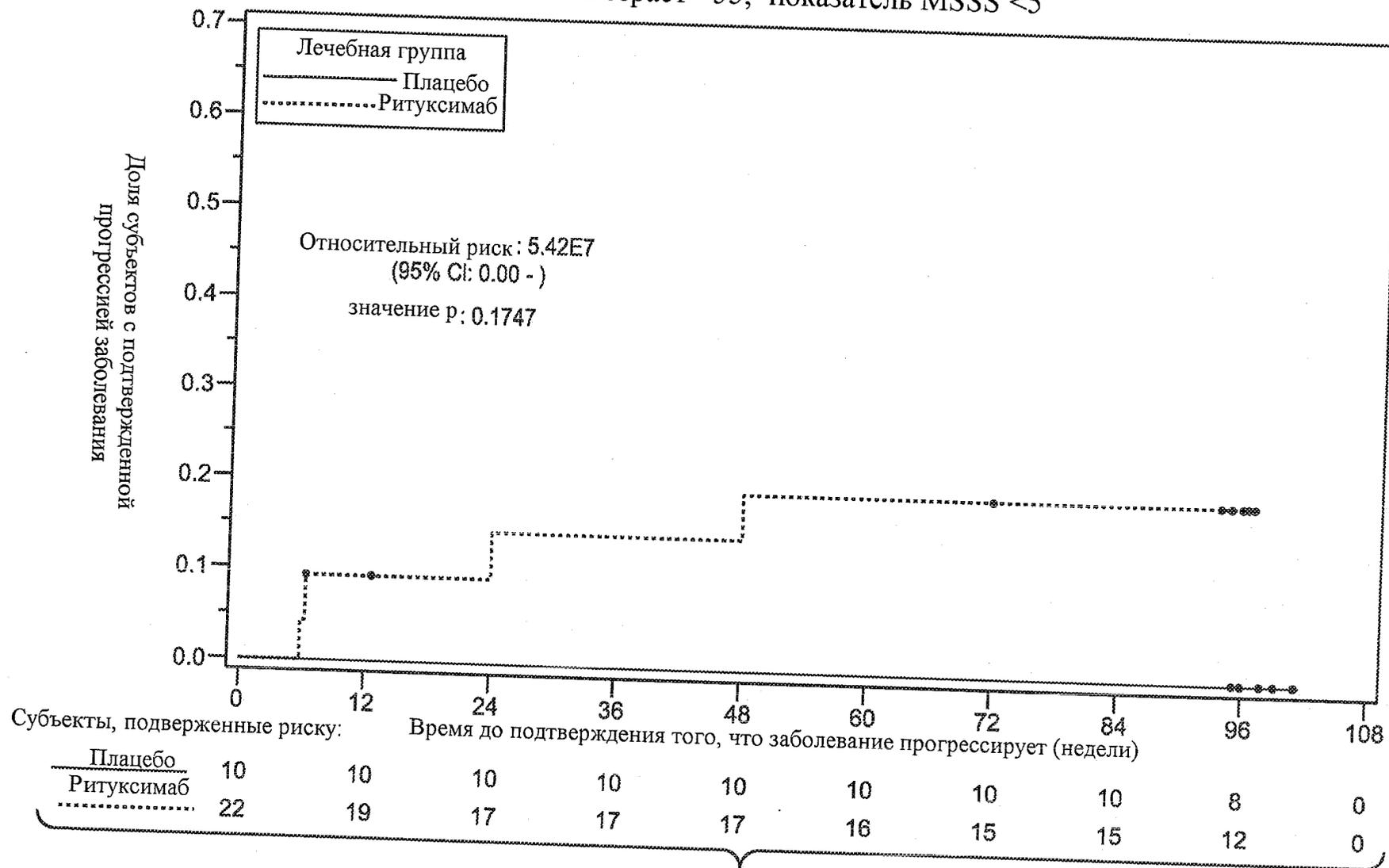
Возраст  $\leq 55$ ; показатель MSSS  $< 5$



14 / 18

Фиг.12А

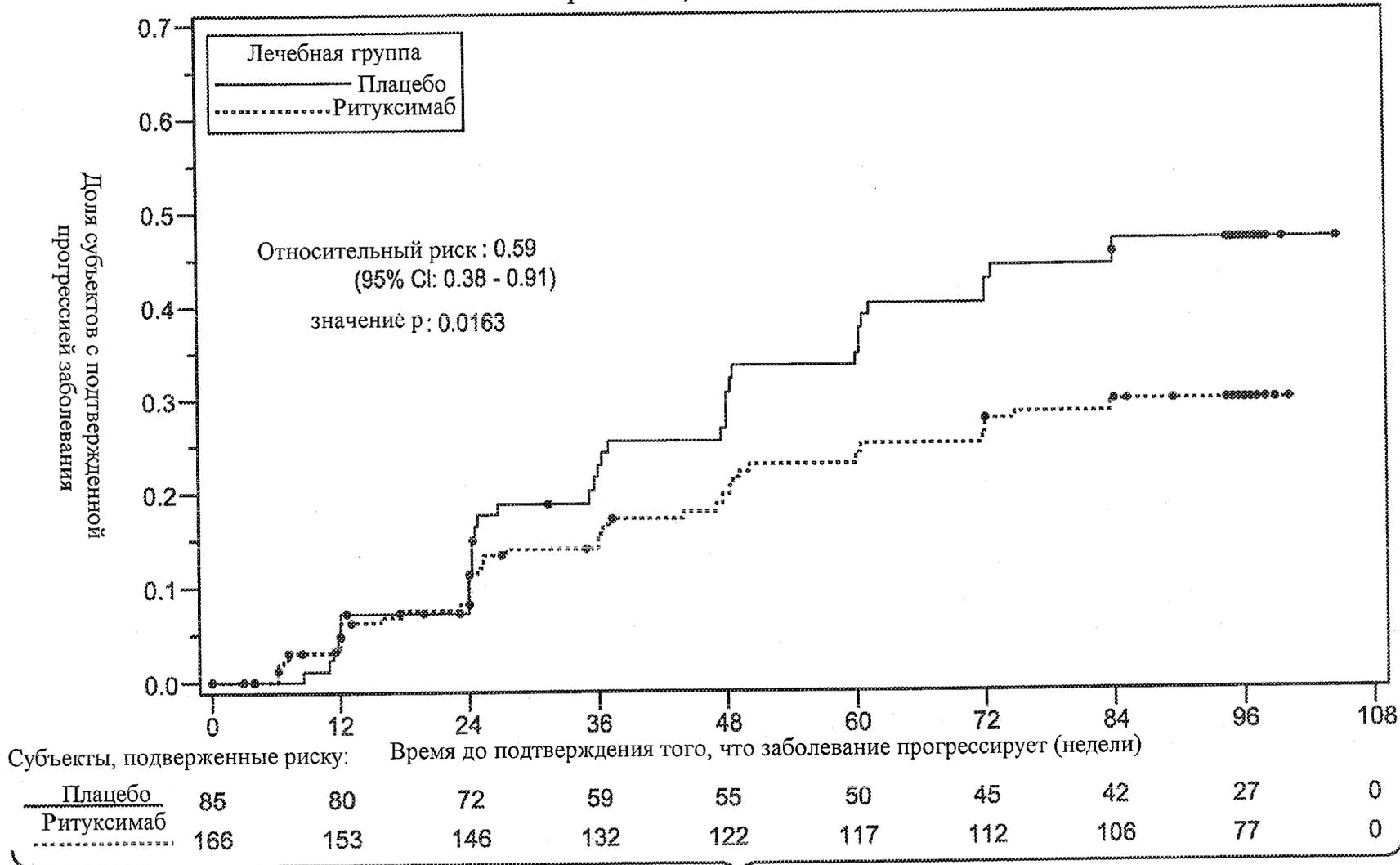
Возраст > 55; показатель MSSS < 5



15 / 18

Фиг.12В

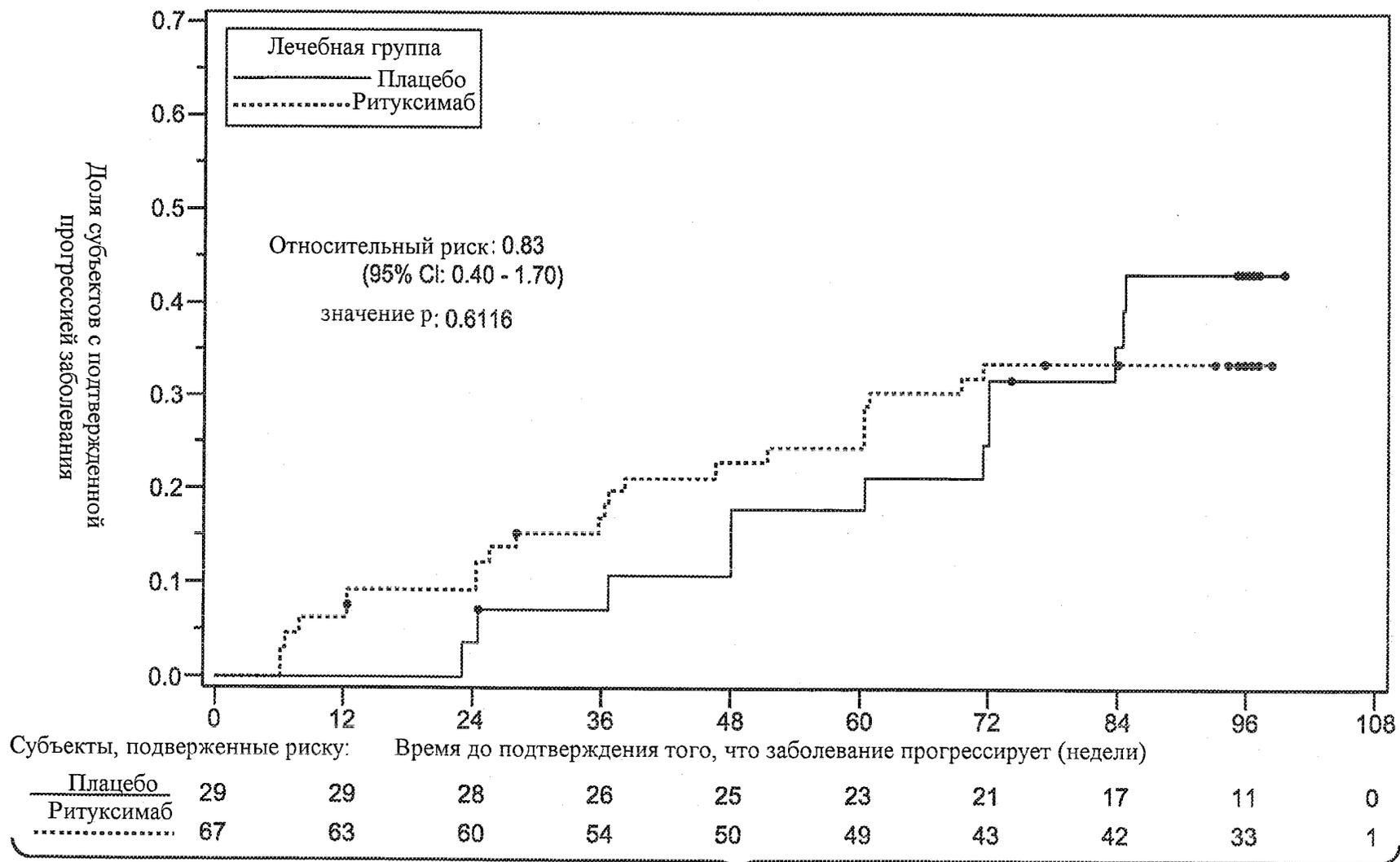
Возраст  $\leq 55$ ; показатель MSSS  $\geq 5$



16 / 18

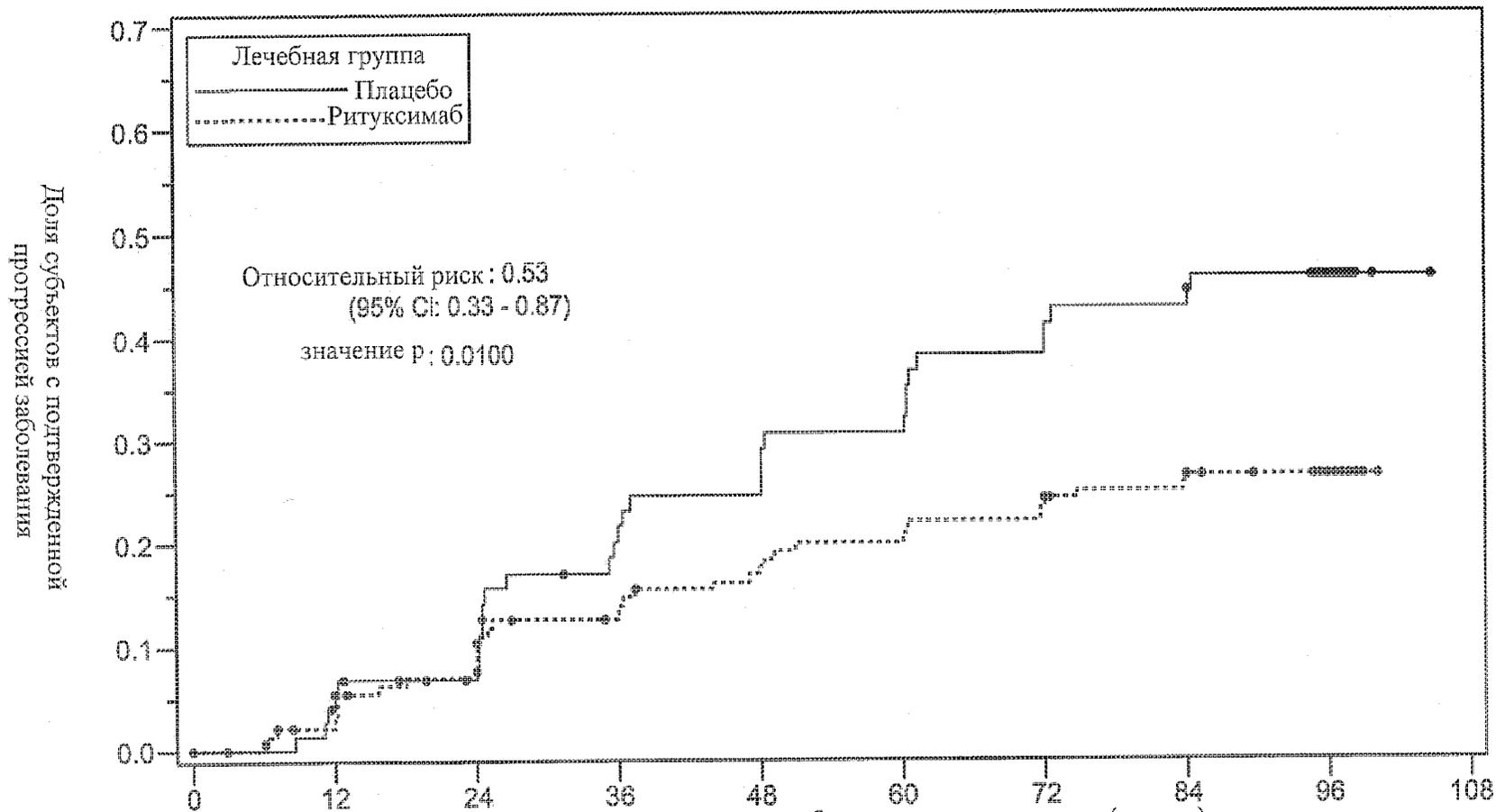
Фиг.12С

Возраст >55; показатель MSSS  $\geq 5$



17 / 18

Фиг.12D



18 / 18

Субъекты, подверженные риску:

Плацебо	75	70	64	53	50	46	41	38	23	0
Ритуксимаб	151	141	133	121	113	110	105	100	73	0

Фиг.13