

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390128** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.02.14**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.06.21**

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА**

---

(31) **202011026256**

(32) **2020.06.22**

(33) **IN**

(86) **PCT/US2021/038170**

(87) **WO 2021/262561 2021.12.30**

(71) Заявитель:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Шиевен Гари Л. (US), Дадхгаонкар  
Шайлеш (IN), Дойл Майкл Луис (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,  
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,  
Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)**

---

(57) Предложен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

**A1**

**202390128**

**202390128**

**A1**

## СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество в соответствии с индийской предварительной заявкой на выдачу патента США № 202011026256, поданной 22 июня 2020 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Описание изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к способу лечения пациента, имеющего ревматоидный артрит, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

### Предпосылки создания изобретения

TLR7 и TLR8 представляют собой эндосомальные рецепторы, которые распознают короткую богатую урацилом (U) одноцепочечную РНК (ssRNA) (Junt J and Barchet W., *Nat Rev Immunol.* 2015; 15:529-544). TLR7 экспрессируется в плазматоцитоподобных дендритных клетках (pDC) и В-клетках. Агонисты TLR7 индуцируют активацию В-клеток и продукцию цитокинов, а также продукцию IFN $\alpha$  pDC (Marshak-Rothstein A and Rifkin IR., *Ann Rev Immunol.* 2007; 25:419-41; Celhar T, Magalhaes R and Fairhurst AM., *Immunol Res.* 2012; 53:58-77). TLR8 экспрессируется в миелоидных дендритных клетках (mDC) и индуцирует экспрессию цитокинов, таких как IL-6, TNF $\alpha$  и IL-10 (Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ et al., *J Immunol.* 2005; 174:1259-1268; Cervantes JL, Weinerman B, Basole C. et al., *Cell Mol Immunol.* 2012;9:434-438). TLR8 также индуцирует экспрессию важных молекул клеточной поверхности, участвующих во взаимодействиях антигенпрезентирующих клеток с Т-клетками, включая CD40 и CD86, а также других маркеров, таких как CD319 (SLAMF7).

TLR7 действует на pDC IFN-независимым образом, индуцируя высокие уровни устойчивости к глюкокортикоидам (Guiducci C, Gong M, Xu Z et al., *Nature* 2010; 465:937-941). TLR7 активирует путь NF-kB в pDC, управляя ответами, включая экспрессию Bcl-2, что приводит к увеличению выживаемости pDC. Глюкокортикоиды

не влияют на активацию NF- $\kappa$ B в pDC. Это блокирует способность глюкокортикоидов ингибировать продукцию IFN pDC, а также вызывает сильную защиту от апоптоза, индуцированного глюкокортикоидами. Стимуляция TLR7 В-клеток индуцирует устойчивость клеток к глюкокортикоидам, подавляя способность глюкокортикоидов ингибировать ответы В-клеток и индуцировать апоптоз. Считается, что индукция резистентности к глюкокортикоидам является причиной того, что для лечения системной красной волчанки (SLE) требуются гораздо более высокие дозы глюкокортикоидов, чем при многих других аутоиммунных заболеваниях.

TLR7 и 8 обычно активируются ассоциированной с патогеном РНК, а также могут активироваться синтетическими низкомолекулярными агонистами. Однако они активируются собственной РНК как часть патофизиологии заболевания SLE и родственных аутоиммунных заболеваний, таких как синдром Шегрена (Celhar T, Magalhaes R and Fairhurst AM., *Immunol Res.* 2012; 53:58-77; Celhar T and Fairhurst AM., *Frontier Pharm.* 2014; 5:1-8). Активированные TLR7 и 8 вызывают множественные ответы в разных типах клеток, которые определяют патофизиологию заболевания при волчанке, формируя цикл заболевания, который действует как петля прямой связи для ускорения прогрессирования заболевания (Davidson A and Aranow C., *Nat Rev Rheum.* 2010; 6:13-20). Стимуляция TLR7 В-клеток индуцирует активацию В-клеток, продукцию провоспалительных цитокинов и необходима для образования спонтанных зародышевых центров, которые участвуют в выработке высокоаффинных аутоантител, участвующих в SLE. Это относится к антителам ко многим аутоантигенам, а не только к РНК-ассоциированным антигенам. Повышенная выработка аутоантител приводит к увеличению образования иммунных комплексов, что, в свою очередь, обеспечивает усиление стимуляции TLR7 и 8, все более и более сильно управляя циклом заболевания, что приводит к прогрессированию заболевания.

Ревматоидный артрит (RA) представляет собой хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание, поражающее 1% населения. Прогрессирование заболевания характеризуется деструктивным воспалением суставов, которое может привести к прогрессирующей инвалидизации и сокращению продолжительности жизни. Синовиальная оболочка при RA инфильтрируется активированными иммунными клетками, преимущественно макрофагами и Т-клетками, что приводит к хронической продукции провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ, что приводит к воспалению и деградациии хрящей и костей (Chou EH and Panayi GS., *N Engl J Med.* 2001; 344:907-916).

Нарушение регуляции передачи сигналов TLR связано с несколькими аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, включая RA, где TLR являются важными медиаторами хронического воспаления, особенно в синовиальной оболочке (Thwaites R, Chamberlain G, and Sacre S., *Front Immunol.* 2014; 5:1). Сообщалось, что экспрессия нескольких TLR, включая эндосомальные TLR, выше в синовиальной ткани RA по сравнению с тканью, полученной либо от здоровых людей, либо от пациентов с остеоартритом. Было показано, что компоненты некротических клеток и поврежденных тканей, такие как белки, связывающие нуклеиновые кислоты, белки теплового шока и белки внеклеточного матрикса, активируют TLR, что приводит к повышающей регуляции цитокинов и хемокинов. Опубликованные отчеты о мышах с нокаутом TLR7 и селективных антагонистах TLR7 и 9 для выяснения роли TLR в моделях заболевания RA поддерживают применение TLR7 в лечении ревматоидного артрита. Кроме того, активация TLR8 человека в суставах способствует спонтанному и индуцированному артриту у мышей. В совокупности эти исследования показывают, что TLR7 и TLR8 играют ключевую роль в RA, и позволяют предположить, что нацеливание на TLR7 и/или TLR8 с помощью антагонистов может обеспечить новую стратегию для лечения RA (Thwaites R, Chamberlain G, and Sacre S., *Front Immunol.* 2014; 5:1; Alzabin S, Kong P, Medghalchi M, et al., *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R142; Hoffmann MH, Skriner K, Herman S et al. *Autoimmun.* 2011;36:288; Hayashi T, Gray CS, Chan M et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:2764; Guiducci C, Gong M, Cepika AM, et al. *J Exp Med.* 2013; 210:2903).

Желательны новые способы лечения ревматоидного артрита.

В настоящем документе раскрыт способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

#### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения ревматоидного артрита, включающему введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

Настоящее изобретение относится к способу лечения ревматоидного артрита, включающему введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7

или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

Эти и другие признаки изобретения будут изложены в расширенной форме по мере продолжения раскрытия.

#### Краткое описание чертежей

Изобретение проиллюстрировано со ссылками на прилагаемые чертежи, описанные ниже.

Фиг. 1А и фиг. 1В показывают ингибирование активности заболевания в модели коллаген-индуцированного артрита с помощью соединения (I), взятого в отдельности и в комбинации с mEnbrel.

Фиг. 2А и фиг. 2В показывают ингибирование антиколлагеновых антител и IL-6, соответственно, с помощью соединения (I), взятого в отдельности и в комбинации с mEnbrel.

Фиг. 3 показывает фармакокинетику соединения (I) и в комбинации с mEnbrel в модели коллаген-индуцированного артрита.

#### Определения

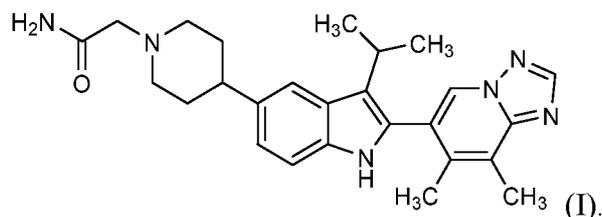
Для того, чтобы настоящее описание могло быть более понятным, вначале определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены на протяжении всего текста подробного описания.

«Ингибитор TLR7» ингибирует функцию TLR7. Ингибиторы TLR7 могут связываться с TLR7 обратимо или необратимо, и включают антитела, олигонуклеотиды, малые молекулы и миллимолекулярные соединения.

«Ингибитор TLR8» ингибирует функцию TLR8. Ингибиторы TLR8 могут связываться с TLR8 обратимо или необратимо, и включают антитела, малые молекулы и миллимолекулярные соединения.

«Ингибитор TLR7/8» ингибирует функцию TLR7, TLR8 или обоих TLR7 и TLR8. Ингибиторы TLR7/8 могут связываться с TLR7 и TLR8 обратимо или необратимо, и включают антитела, малые молекулы и миллимолекулярные соединения.

Соединение формулы (I) представляет собой ингибитор TLR7/8 и имеет структуру:



Химическое название соединения формулы (I): 2-(4-(2-(7,8-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)-3-изопропил-1H-индол-5-ил)пиперидин-1-ил)ацетамид. Открытие и синтез соединения формулы (I) описано в WO 2018/005586 A1.

«Ингибитор TNF $\alpha$ » представляет собой лекарственное средство, которое блокирует активность фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), и включает антитела, малые молекулы и миллимолекулярные соединения. Ингибиторы TNF $\alpha$  включают, но без ограничения, этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®), цертолизумаб (Cimzia®), голимумаб (Simponi®), адалимумаб (Humira®) и биоаналоги, такие как адалимумаб-adbm (Cyltezo®), адалимумаб-adaz (Hyrimoz®), адалимумаб-atto (Amjevita®), этанерцепт-szsz (Erelzi®), инфликсимаб-abda (Renflexis®) и инфликсимаб-dyyb (Inflectra®).

Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно вкладывают в них специалисты в данной области. Кроме того, если контекстом не требуется иное, термины в единственном числе будут включать множественное число, и термины во множественном числе будут включать единственное число.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» и «терапия» относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому на пациенте, или введению активного агента пациенту с целью вызывания обратного развития, облегчения, уменьшения интенсивности, ингибирования или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Лечение включает терапевтическое лечение и профилактические или предупредительные меры, целью которых является предупреждения или ослабление целевого состояния или нарушения.

Термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического агента относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у пациента. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество относится к количеству, эффективному, в дозах и в течение периодов времени, которые необходимы для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Способность терапевтического агента способствовать регрессу заболевания, или ингибировать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с помощью различных способов, известных специалисту в данной области, например, у субъектов-людей во время клинических испытаний, в модельных системах на животных, прогнозирующих эффективность у людей, или путем определения активности агента в анализах *in vitro*.

Терапевтически эффективные количества ингибитора TLR7/8 могут варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела пациента, а также способности ингибитора TLR7/8 вызывать желаемый ответ у пациента. Терапевтически эффективные количества ингибитора TLR7/8 включают количество, при котором любые токсические или вредные эффекты ингибитора TLR7/8 перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Термины «введение» и «назначение» относятся к физическому введению композиции, содержащей терапевтический агент, пациенту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Пути введения ингибитора TLR7/8 и ингибитора TNF $\alpha$  включают энтеральное, местное введение и введение через слизистую оболочку, такое как пероральное, местное, сублингвальное, ректальное, интраназальное и внутривенное введение, и парентеральное введение, такое как внутривенная, внутримышечная и подкожная инъекция.

Введение «в сочетании с» одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (параллельное) и последовательное (следующее одно за другим) введение в любом порядке. Например, пациент может проглотить пероральную дозированную форму ингибитора TLR7/8 и пероральную дозированную форму второго агента в любом порядке (последовательно); или может проглатывать обе пероральные лекарственные формы вместе (параллельно).

Термин «пациент» включает человека и других млекопитающих, которые получают терапевтическое лечение.

### Подробное описание изобретения

Признаки и преимущества изобретения могут быть более понятны специалистам в данной области техники после прочтения следующего подробного описания. Следует понимать, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны выше и ниже в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть объединены для формирования одного варианта осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть объединены с образованием их подкомбинаций. Варианты осуществления, определенные в настоящем документе как иллюстративные или предпочтительные, предназначены для иллюстрации, а не ограничения изобретения.

В настоящем документе обеспечен один или несколько способов лечения пациента, страдающего ревматоидным артритом.

В одном варианте осуществления обеспечен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ . В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I).

В одном варианте осуществления обеспечен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ . В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I).

В одном варианте осуществления обеспечен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ . В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I).

В одном варианте осуществления обеспечен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы

ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ , где указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят одновременно с указанным ингибитором TLR7/8. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I).

В одном варианте осуществления обеспечен способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ , где указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят последовательно с указанным ингибитором TLR7/8. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 вводят до введения указанного ингибитора TNF $\alpha$ . В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 вводят после указанного ингибитора TNF $\alpha$ . Кроме того, в этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I).

В одном варианте осуществления терапевтически эффективная доза соединения формулы (I) находится в диапазоне от 0,1 до 100 мг.

Терапевтически эффективную дозу ингибитора TLR7/8 можно вводить в виде однократной суточной дозы (q.d.), разделенной и вводимой два раза в сутки (b.i.d.), или разделенной и вводимой в виде трех или более доз в сутки.

Терапевтически эффективную дозу ингибитора TNF $\alpha$  можно вводить в соответствии с инструкциями по дозированию и применению. Ингибитор TNF $\alpha$  можно вводить в виде инфузии или подкожной инъекции. Схемы дозирования включают один раз каждые 1-8 недель.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу соединения формулы (I) вводят в виде однократной суточной дозы.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз в неделю.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые две недели.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые три недели.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые четыре недели.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые пять недель.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые шесть недель.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые семь недель.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TNF $\alpha$  вводят один раз каждые восемь недель.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы, и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз в неделю. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы, и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые две недели. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы, и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые три недели. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной

дозы; и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые четыре недели. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы; и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые пять недель. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы; и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые шесть недель. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы; и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые семь недель. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В одном варианте осуществления обеспечен способ, в котором терапевтически эффективную дозу указанного ингибитора TLR7/8 вводят в виде однократной суточной дозы; и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят один раз каждые восемь недель. В этот вариант осуществления включен способ, в котором указанный ингибитор TLR7/8 представляет собой соединение формулы (I). В этот вариант осуществления также включен способ, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт.

В другом варианте осуществления обеспечен способ лечения пациента, имеющего ревматоидный артрит, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$  и в комбинации с одним или несколькими дополнительными третьими агентами. Примеры подходящих третьих агентов включают кортикостероиды, такие как преднизон; ролипрам, кальфостин, цитокин-супрессивные противовоспалительные лекарственные средства (CSAID), интерлейкин-10, глюкокортикоиды, салицилаты, оксид азота и другие иммуносупрессоры; ингибиторы ядерной транслокации, такие как дезоксиспергуалин (DSG); противовоспалительные лекарственные средства, такие как сульфасалазин; нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), такие как ибупрофен, целекоксиб и рофекоксиб; стероиды, такие как дексаметазон; антипролиферативные агенты, такие как метотрексат, лефлуномид, FK506 (такролимус, PROGRAF®); противомаларийные средства, такие как гидроксихлорохин; цитотоксические лекарственные средства, такие как азатиоприн и циклофосфамид; и рапамицин (сиролимус или RAPAMUNE®) или его производные. Вышеупомянутые третьи агенты при использовании в сочетании с комбинациями соединения (I) и ингибитора TNF $\alpha$  можно применять, например, в количествах, указанных в *Physicians' Desk Reference* (PDR) или определенных специалистом в данной области иным способом. В способах по настоящему изобретению один или более третьих агентов можно вводить до, одновременно с или после введения соединения (I) или второго агента.

#### Получение мышинового препарата энбрел (mEnbrel)

Полностью мышинная версия Enbrel® была разработана с использованием мышинового TNFR1B (референсная последовательность NP\_035740) и мышинового изоформа IgG2A (MuTNFR1B(V23-G258)-muIgG2A). Его экспрессировали из стабильно трансфицированных клеток яичника китайского хомячка (CHO) с сигнальной последовательностью остеоонектина. Используемая область внеклеточного домена (ECD) muTNFR1B представляла собой остатки от Val-23 до Gly-258. ECD сливали непосредственно с амино-концом верхней шарнирной области мышинной тяжелой цепи IgG2A по аналогии с конструкцией Enbrel человека.

Мышиный Enbrel экспрессировали в клетках CHO в биореакторах объемом 90 л и собирали на 13-й день. Его захватывали белком А (mAb Select), промывали

фосфатным буфером с pH 7,2 и ацетатным буфером с pH 6,5, элюировали 50 мМ уксусной кислоты, и буфер заменяли на фосфатный буфер с pH 6,8. Конечная концентрация составила 3,1 мг/мл на основе вычисленного коэффициента экстинкции 1,06 мл/(мг\*см). Было обнаружено, что mEnbrel является гомогенным на >97% только с 3% высокой молекулярной массы по данным аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC), и содержание эндотоксина было определено на уровне 0,035 ЕЭ/мг. Материал замораживали при -80°C до использования.

## Исследование ревматоидного артрита на мышах

### Материалы и способы

Все методики эксперимента на животных были рассмотрены и утверждены Институциональным комитетом по формированию этики в отношении животных (Institutional Animal Ethics Committee, IAEC) и проводились в соответствии с методиками, установленными Комитетом по контролю и надзору за экспериментами на животных (Committee For The Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animals, CPCSEA). Мышей помещали в группах в исследовательском центре Syngene Laboratory Animal Research Facility (SLAR, Bangalore India; аккредитовано AAALAC) и содержали в условиях нормального цикла 12-часов света/12-часов темноты со свободным доступом к пище и воде. По окончании исследований животных подвергали эвтаназии путем асфикции CO<sub>2</sub> для сбора плазмы и тканей.

### Коллаген-индуцированный артрит у мышей

Самцов мышей линии DBA/1 (возраст 9-11 недель, Harlan) праймировали бычьим коллагеном типа II (Chondrex #20021) в адьюванте (адьювантная система Sigma, Sigma Aldrich #S6322) у основания хвоста в 1-й день и на 21-й день. Мышей рандомизировали на 7 групп исходя из массы тела и назначали на получение носителя (10% этанола, 45% PEG 300, 5% плуроника F-68, 40% 20 мМ цитратного буфера); соединения (I) в дозах 0,25 и 2,5 мг/кг или mEnbrel (мышиного Enbrel) в дозе 10 мг/кг, или комбинации соединения (I) с mEnbrel в дозах 0,25+10 мг/кг и 2,5+10 мг/кг, или mCTLA4 (мышиного CTLA4-Ig) (в качестве эталонного соединения) в дозе на уровне 3 мг/кг. Соединение (I) вводили с 21-го дня через пероральный зонд один раз в сутки, тогда как mEnbrel и mCTLA4 вводили со дня первичной иммунизации два раза в неделю путем внутрибрюшинной инъекции. Активность заболевания контролировали и оценивали два раза в неделю с использованием стандартных критериев (0:

нормальное; 1: легкое, но отчетливое покраснение и отек лодыжки или запястья, или явное покраснение и отек, ограниченные отдельными пальцами, независимо от количества пораженных пальцев; 2: умеренное покраснение и отек лодыжки или запястья; 3: сильное покраснение и отек всей лапы, включая пальцы; 4: максимально воспаленная конечность с вовлечением нескольких суставов). Перед завершением эксперимента у мышей брали кровь в различные моменты времени после дозирования (1 ч, 3 ч, 7 ч, 24 ч) для определения полного фармакокинетического профиля соединения (I). Кроме того, на момент завершения эксперимента собирали образцы сыворотки и плазмы для измерения титра IL-6 и антиколлагеновых антител, соответственно. Лапы собирали для гистологического анализа.

Соединение (I) тестировали в полутерапевтическом режиме лечения на модели коллаген-индуцированного артрита у мышей. Введение доз начинали после иммунизации антигеном (с 21-го дня) и продолжали до 45-го дня. Как показано на фигуре 1A, соединение (I) ингибировало клинические признаки заболевания уже через 7 дней после введения дозы (фигура 3.5-1A). Значительное дозозависимое подавление артритного показателя наблюдалось по завершении исследования (фигура 1B) с дозозависимым снижением уровня IL-6 в плазме и титра антиколлагеновых антител в сыворотке (фигуры 2A и 2B).

Соединение (I) тестировали в комбинации с блокирующим TNF $\alpha$  агентом mEnbrel на модели коллаген-индуцированного артрита, где введение дозы соединения (I) начинали после иммунизации антигеном, тогда как mEnbrel вводили со дня первичной иммунизации. Как показано на фигуре 1, комбинация дозы IC<sub>90</sub> (0,25 мг/кг) и фиксированной дозы mEnbrel (10 мг/кг) привела к более высокому подавлению клинических показателей по сравнению с любым лечением, взятым в отдельности. Доза 0,25 мг/кг соединения (I) дала такой же положительный эффект в комбинации с mEnbrel, что и в 10 раз более высокая доза, что указывает на то, что минимальный охват IC<sub>90</sub> обеспечивает устойчивую и максимальную эффективность комбинации с блокадой TNF $\alpha$  агентом mEnbrel. Улучшение эффективности, наблюдаемое в комбинации, было значительнее, чем аддитивный эффект каждого лечения по отдельности. В частности, группа, получавшая 0,25 мг/кг соединения (I), показала индекс активности заболевания, равный 82% от контроля, и группа, получавшая дозу mEnbrel, показала индекс активности заболевания, который составил 56% от контроля. Если бы действие двух препаратов было аддитивным, то ожидаемое значение

составило бы 31% от контроля ( $0,82 \cdot 0,56 = 0,31$ ). Однако комбинация показала индекс активности заболевания, который составил лишь 18% от контроля, что указывает на то, что комбинация обеспечила благоприятный эффект, который был значительно больше, чем мог ожидать от аддитивного взаимодействия. Увеличенная эффективность была очевидной до завершения исследования (фигура 1A) и была значительной по завершении исследования (фигура 1B). Повышенная активность также отражалась в титре антиколлагеновых антител (фигура 2A).

Как показано на фигуре 3, в этом исследовании соединение (I) показало дозозависимое увеличение концентрации лекарственного средства в цельной крови. Концентрация соединения (I) в цельной крови не изменялась в присутствии mEnbrel. Результаты данного исследования показали, что увеличение эффективности комбинации не было обусловлено увеличением концентрации соединения (I) в цельной крови.

Фигура 1: Ингибирование индекса активности артрита с помощью соединения (I), взятого в отдельности и в комбинации с mEnbrel. Мышей лечили соответствующими методами лечения. В течение всего курса исследования (A) и по завершении (B) заболевание оценивали путем измерения клинического показателя (индекса активности артрита). Данные взяты из одного эксперимента с 10 мышами в группе. \*\*\*P < 0,0001 по сравнению с носителем с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с критерием Даннета.

Фигура 2: Ингибирование циркулирующих маркеров соединением (I), взятым в отдельности и в комбинации с mEnbrel. Мышей лечили соответствующими методами лечения. На момент завершения (A) оценивали титр антиколлагеновых антител в сыворотке и (B) IL-6 в плазме. Данные взяты из одного эксперимента с 10 мышами в группе. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,0001 по сравнению с носителем с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с критерием Даннета.

Фигура 3: Фармакокинетический анализ соединения (I) в модели CIA артрита. Мышам перорально вводили соединение (I) в течение 25 дней. После 19 дней введения цельную кровь брали в разные моменты времени и измеряли концентрации лекарственного средства в образцах DBS с помощью LCMS. Данные взяты из одного эксперимента, в котором уровни лекарственного средства измерялись в образцах, взятых в указанные моменты времени у 3 мышей на группу из 10 мышей на группу, получавших дозу в эксперименте. Данные представляют средние концентрации лекарственного средства в нМ.

MouseTNFR1B(V23-G258)-muIgG2A. Сигнальная последовательность

остеонектина подчеркнута. Мышиный IgG2a выделен жирным шрифтом.

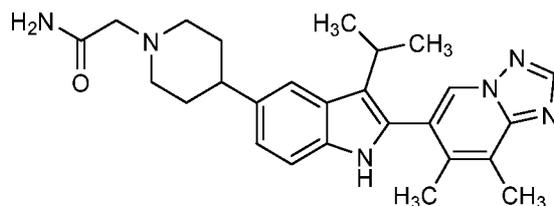
1     MRAWIFFLLC LAGRALAVPA QVVLTPYKPE PGYECQISQE YYDRKAQMCC  
51     AKCPPGQYVK HFCNKTSDTV CADCEASMYT QVWNQFRTCL SCSSSCTTDQ  
101    VEIRACTKQQ NRVCACEAGR YCALKTHSGS CRQCMRLSKC GPGFGVASSR  
151    APNGNVLCKA CAPGTFSDDT SSTDVCRPHR ICSILAIIPGN ASTDAVCAPE  
201    SPTLSAIPRT LYVSQPEPTR SQPLDQEPGP SQTPSILTSL GSTPIIEQST  
251    **KGGEPRGPTI** **KPCPPCKCPA** **PNLLGGPSVF** **IFPPKIKDVL** **MISLSPIVTC**  
301    **VVVDVSEDDP** **DVQISWVNN** **VEVHTAQTQT** **HREDYNSTLR** **VVSALPIQHQ**  
351    **DWMSGKEFKC** **KVNNKDLPA** **IERTISKPKG** **SVRAPQVYVL** **PPPEEEMTKK**  
401    **QVTLTCMVD** **FMPEDIYVEW** **TNNGKTELNY** **KNTEPVLDSD** **GSYFMYSKLR**  
451    **VEKKNWVERN** **SYSCSVVHEG** **LHNHHTTKSF** **SRTPGK**

(SEQ ID NO: 1)

## Формула изобретения

1. Способ лечения ревматоидного артрита, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы ингибитора TLR7/8 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с терапевтически эффективной дозой ингибитора TNF $\alpha$ .

2. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TLR7 представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой этанерцепт или его биоаналог.

4. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой инфликсимаб или его биоаналог.

5. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой цертолизумаб или его биоаналог.

6. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой голимумаб или его биоаналог.

7. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  представляет собой адалимумаб или его биоаналог.

8. Способ по п. 1, в котором указанная терапевтически эффективная доза указанного ингибитора TLR7 составляет от 0,1 до 100 мг в сутки.

9. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TLR7/8 и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят одновременно.

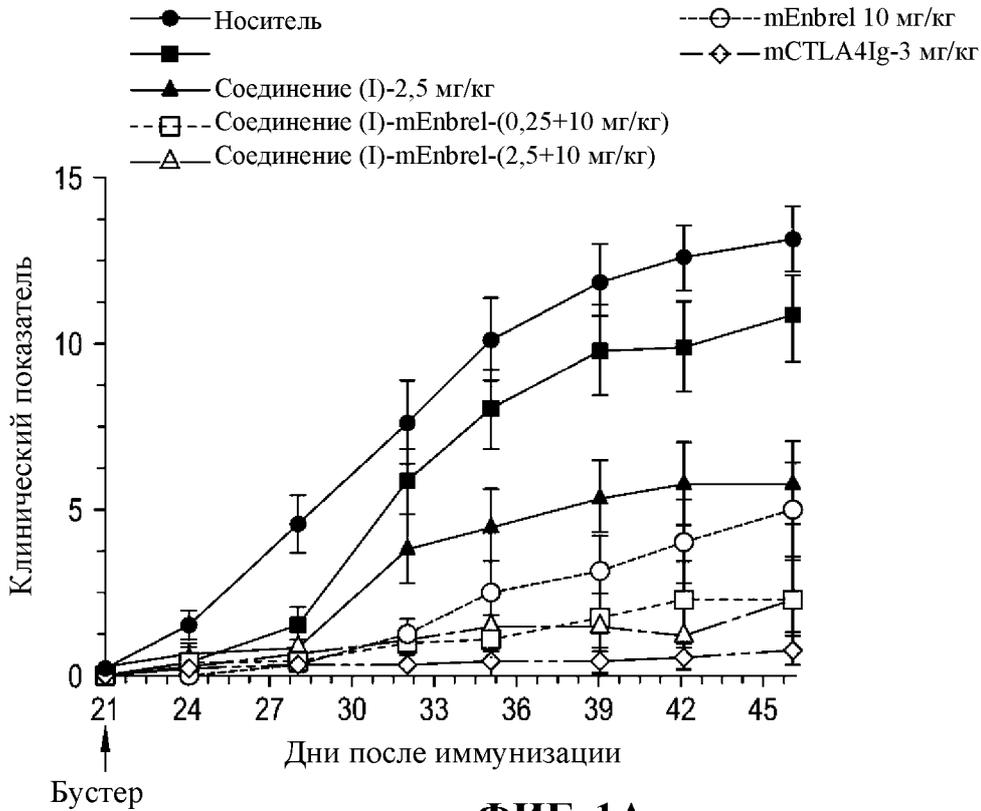
10. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TLR7/8 и указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят последовательно.

11. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TLR7/8 вводят до введения указанного ингибитора TNF $\alpha$ .

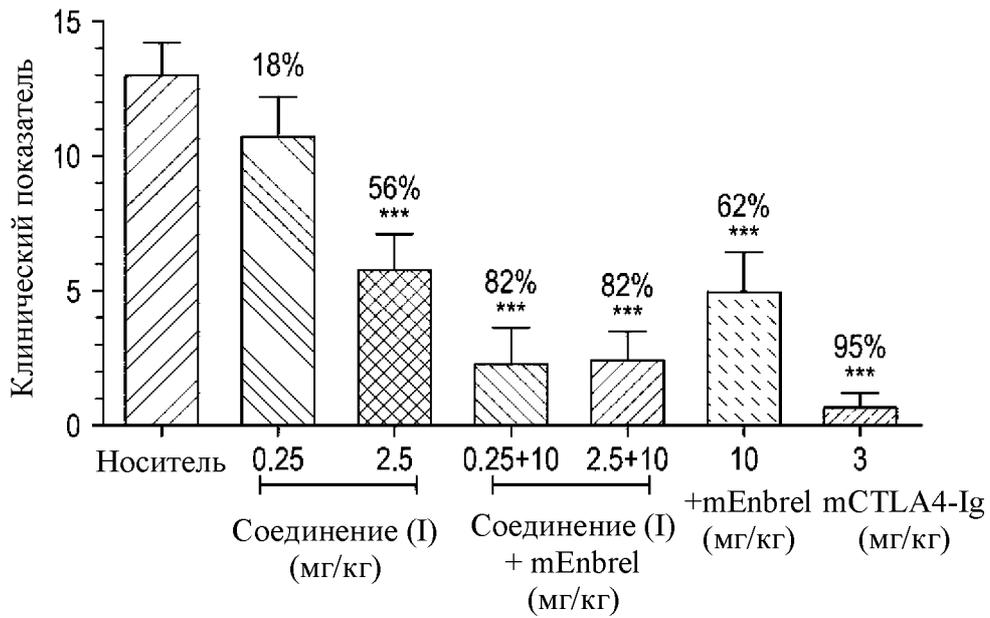
12. Способ по п. 1, в котором указанный ингибитор TNF $\alpha$  вводят до введения указанного ингибитора TLR7/8.

13. Полипептид, содержащий аминокислотные остатки 18-486 SEQ ID NO:1.

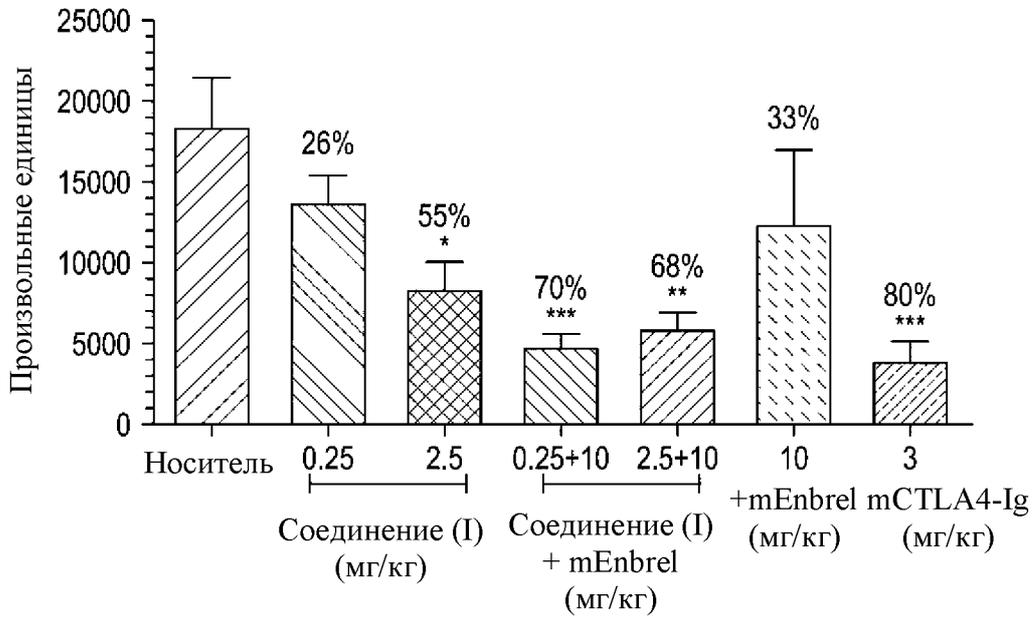
14. Полипептид по п. 13, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.



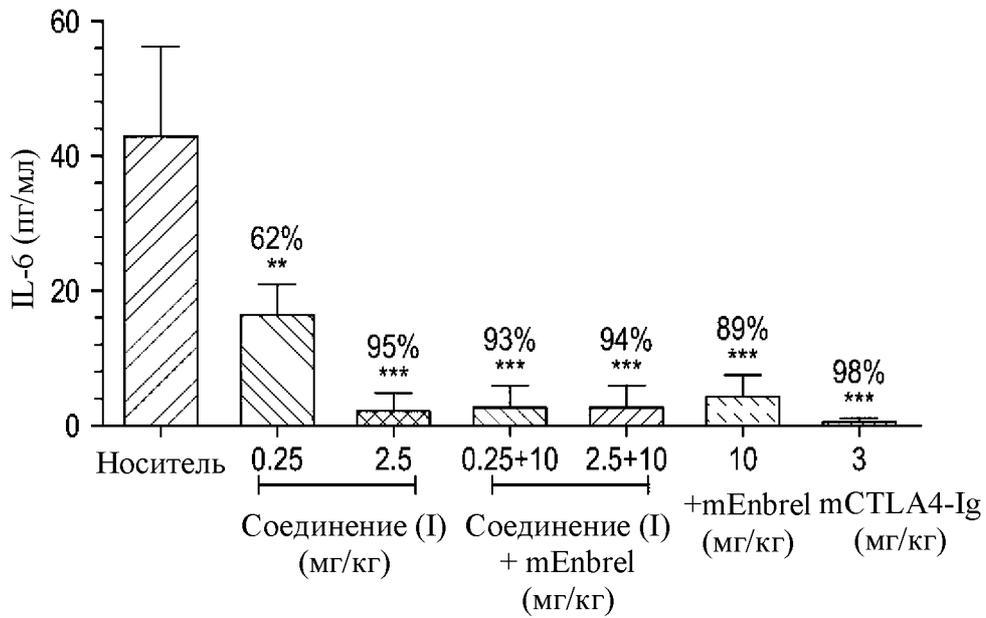
ФИГ. 1А



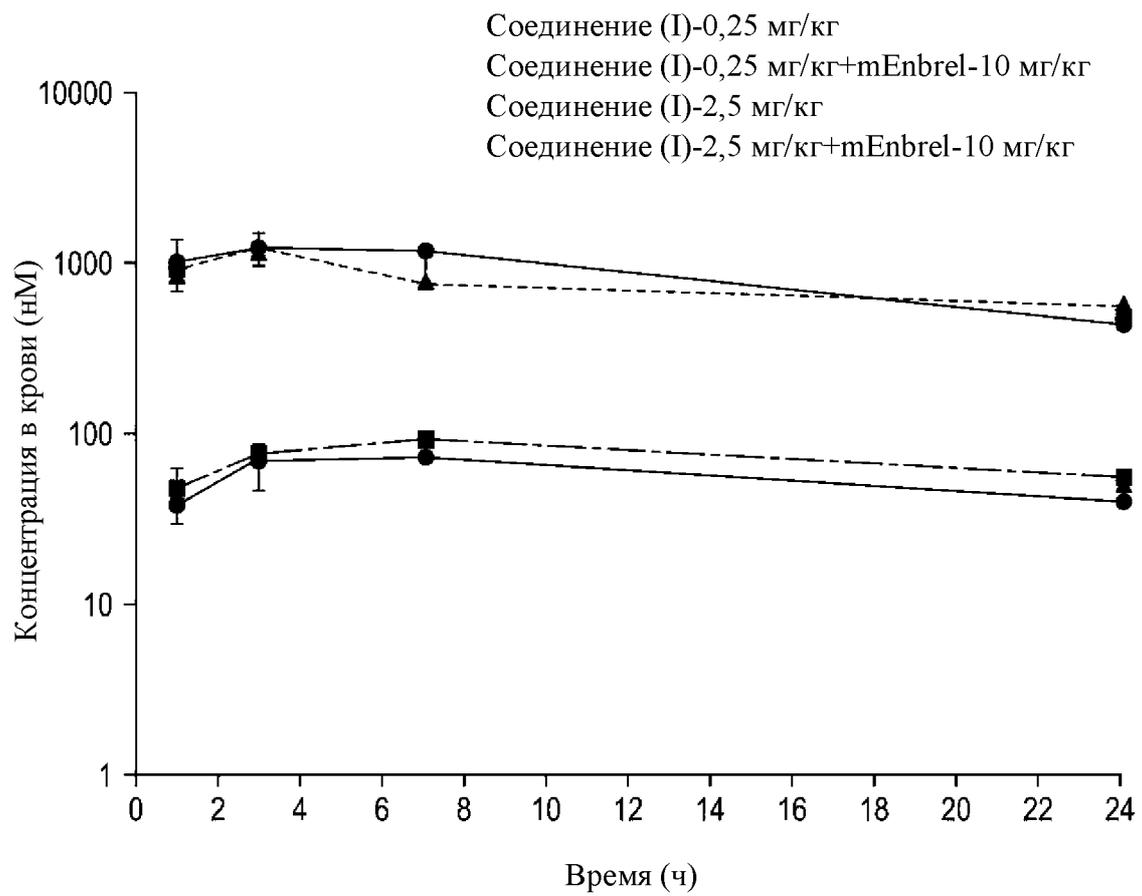
ФИГ. 1В



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 3