(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992012 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.30

(22) Дата подачи заявки
2018.01.03

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ АКТИВНОСТИ C5a

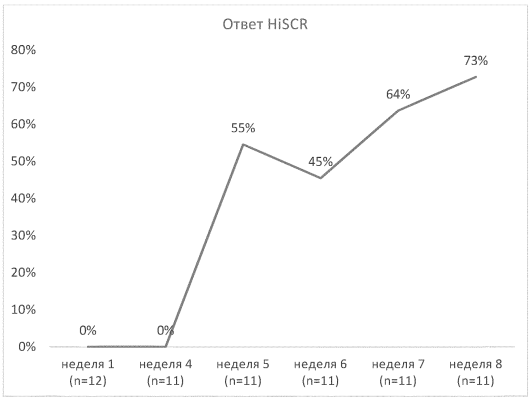
(31) **17164573.2; 17177657.8; 17189938.8**
(32) **2017.04.03; 2017.06.23; 2017.09.07**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/050146**
(87) **WO 2018/184739 2018.10.11**

(71) Заявитель:
ИНФЛАРКС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Гуо Ренфенг (US), Ридеманн Нильс К. (DE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к ингибиторам активности C5a и их применению при лечении кожных нейтрофильных воспалительных заболеваний у субъекта.



201992012 A1

201992012 A1

ЛЕЧЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ АКТИВНОСТИ C5A

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к ингибиторам активности C5a и их применению при лечении кожных нейтрофильных воспалительных заболеваний у субъекта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Мишень C5a в воспалении

C5a является продуктом расщепления на 74 аминокислоты его «материнской молекулы» C5 и является одной конечной точкой каскада активации комплемента. Он может быть получен путем активации по меньшей мере трех хорошо описанных путей (альтернативный, классический и лектиновый (маннозный) путь). Все пути объединяются на уровне C3 с образованием C5- или альтернативной C5-конвертазы, обеспечивающей расщепление C5 на C5a и C5b. Последний связывается с молекулами C6, C7, C8 и множеством молекул C9, что в конечном итоге приводит к образованию пор, например, в мембранах бактерий (терминальный мембраноатакующий комплекс = MAK). C5a образуется, когда система комплемента активируется в условиях воспаления и других иммунологических и воспалительных расстройств/заболеваний.

Среди продуктов активации комплемента C5a является одним из наиболее сильных отвечающих за воспаление пептидов с широким спектром функций. (Guo и Ward, 2005). C5a оказывает свое действие через высокоаффинные рецепторы C5a (C5aR и C5L2) (Ward, 2009). C5aR принадлежит к семейству родопсиновых рецепторов, связанных с G-белком, с семью трансмембранными сегментами; C5L2 имеет сходную структуру, но, по-видимому, не связан с G-белком. В настоящее время считается, что C5a выполняет свои биологические функции главным образом благодаря взаимодействию C5a-C5aR, поскольку было обнаружено мало биологических ответов для взаимодействия C5a-C5L2. Тем не менее, последние сообщения демонстрируют передачу сигналов также посредством активации C5L2. (Rittirsch и др., 2008).

C5aR широко экспрессируется на миелоидных клетках, включая нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты, и немиелоидных клетках во многих органах, особенно в легких и печени, что указывает на важность передачи сигналов C5a/C5aR.

Обширное положительное регулирование экспрессии C5aR происходит во время начала сепсиса, и блокировка взаимодействия C5a/C5aR молекулами анти-C5a, или антителами анти-C5aR, или антагонистами C5aR оказывает сильные защитные эффекты в моделях сепсиса на грызунах (Czermak и др., 1999; Huber-Lang и др., 2001; Riedemann и др., 2002).

C5a выполняет множество биологических функций (Guo и Ward, 2005). C5a является сильным хемоатрактантом для нейтрофилов, а также обладает хемотаксической активностью в отношении моноцитов и макрофагов. C5a вызывает окислительный взрыв (потребление O_2) в нейтрофилах и усиливает фагоцитоз и высвобождение гранулированных ферментов. Также было обнаружено, что C5a является сосудорасширяющим средством. Было показано, что C5a участвует в модуляции экспрессии цитокинов из различных типов клеток и повышает экспрессию молекул адгезии на нейтрофилах. Высокие дозы C5a могут привести к неспецифической хемотаксической «десенсибилизации» нейтрофилов, вызывая тем самым обширную дисфункцию. Многие воспалительные заболевания связаны с последствиями C5a, включая сепсис, острое повреждение легких, воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит и другие. В экспериментальных условиях сепсиса воздействие нейтрофилов на C5a может привести к дисфункции нейтрофилов и параличу сигнальных путей, что ведет к дефектной сборке НАДФН-оксидазы, параличу сигнальных каскадов МАРК, сильному снижению окислительного взрыва, фагоцитоза и хемотаксиса (Guo и др., 2006; Huber-Lang и др., 2002). Апоптоз тимоцитов и замедленный апоптоз нейтрофилов являются двумя важными патогенными событиями для развития сепсиса, которые зависят от присутствия C5a. Во время экспериментального сепсиса C5a усиливает экспрессию β2-интегрина на нейтрофилах, чтобы стимулировать миграцию клеток в органы, которая является одной из основных причин полиорганной недостаточности (ПОН). Также обнаружено, что C5a обусловлен активацией пути коагуляции, который происходит при экспериментальном сепсисе. C5a стимулирует синтез и высвобождение из лейкоцитов человека провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-α, IL-1β, IL-6, IL-8 и фактор ингибирования миграции макрофагов (от англ. macrophage migration inhibitory factor, MIF). Учитывая, что активация комплемента является событием, происходящим во время возникновения острого воспаления, C5a может начать действовать до появления большей части воспалительной «цитокиновой бури». По-видимому, C5a играет ключевую роль в организации и усилении работы цитокиновой сети и формировании синдрома системного воспалительного ответа (ССВО).

В иммунологической регуляторной сети, связанной с адаптивным иммунитетом, C5a влияет на перекрестные помехи между дендритными клетками (ДК) и δεТ-клетками, и это может привести к большой выработке медиаторов воспаления, таких как IL-17 (Xu и др., 2010). Существенная роль C5a была установлена и определена в генерации патогенных ответов клеток Th17 при системной красной волчанке (СКВ) (Pawaria и др., 2014). Кроме того, сообщалось, что C5a является ключевым регулятором для регуляторных Т-клеток, обеспечивающим мощный подавляющий эффект для распространения и индукции регуляторных Т-клеток. (Strainic и др., 2013). Учитывая тот факт, что регуляторные Т-клетки и клетки TH17 являются основными участниками аутоиммунных заболеваний, можно ожидать, что ингибирование передачи сигналов C5a значительно снизит сверхактивный иммунный статус при аутоиммунных заболеваниях.

IFX-1

IFX-1 представляет собой химерное моноклональное антитело IgG4, которое специфически связывается с растворимым продуктом расщепления компонента системы комплемента человека C5a. IFX-1 состоит из 1328 аминокислот, и его приблизительная молекулярная масса составляет 148472 дальтон. Последовательности CDR и FR IFX-1 приведены в таблице 3 ниже.

IFX-1 экспрессируется в клеточной линии CHO млекопитающих в виде рекомбинантного белка и используется для внутривенного введения в фосфатно-солевом буферном растворе. Связывание этого антитела с человеческим C5a облегчает высокоэффективную блокировку C5a-индуцированных биологических эффектов, отключая связывание C5a и реагирование с соответствующими клеточными рецепторами.

Были проведены различные неклинические исследования для оценки фармакологических и токсикологических аспектов IFX-1, которые можно разделить на тесты *in vitro*/*ex vivo* и исследования *in vivo*, включая токсикологические исследования GLP на яванских макаков (с использованием IFX-1). Ни один из проведенных неклинических тестов и исследований не выявил каких-либо токсикологических проблем или проблем с безопасностью в отношении IFX-1. Испытание фазы I на людях показало, что в лабораторных параметрах безопасности, основных показателях состояния организма и параметрах ЭКГ не было клинически значимых изменений, связанных со временем или дозой.

In vitro анализ IFX-1 демонстрирует сильную способность к связыванию с растворимым человеческим C5a, а также высокую блокирующую активность C5a-индуцированных биологических эффектов, таких как высвобождение лизоцима из человеческих нейтрофилов или повышенная регуляция CD11b в нейтрофилах цельной крови человека. Одно антитело IFX-1 достигает способности нейтрализовать действие 2 молекул C5a с эффективностью, близкой к 100%, в экспериментальных условиях *in vitro*. Клинические испытания с IFX-1 продолжаются, чтобы проверить его клиническую эффективность при некоторых воспалительных заболеваниях, включая дисфункцию септического органа и сложную операцию на сердце.

Нейтрофилы

Нейтрофилы, терминально дифференцированные клетки с короткой продолжительностью жизни в кровотоке, являются наиболее распространенными лейкоцитами в организме человека. В качестве первой линии защиты от вторжения микроорганизмов нейтрофилы характеризуются своей способностью действовать как фагоцитарные клетки, высвобождать литические ферменты из своих гранул и вырабатывать активные формы кислорода при стимуляции. В дополнение к микробным продуктам, другие стимулы, такие как иммунный комплекс, также могут вызывать респираторный взрыв в нейтрофилах, что приводит к усилению воспаления и пополнению воспалительных клеток (Kaplan, 2013).

После проникновения в воспаленные ткани нейтрофилы участвуют в процессах многих других типов клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки (ДК), клетки-натуральные киллеры, лимфоциты и мезенхимальные стволовые клетки, регулируют врожденный и адаптивный иммунный ответ. Например, нейтрофилы могут модулировать созревание ДК, а также пролиферацию и поляризацию Т-клеток, и они также могут непосредственно праймировать антиген-специфические клетки Т-хелперов типа 1 и Т-хелперов типа 17 (Abi Abdallah и др., 2011). Дегрануляцию нейтрофилов вызывают разнообразные факторы, в том числе C5a, формил-метионил-лейцил-фенилаланин (ФМЛФ), липополисахарид, фактор активации тромбоцитов и фактор некроза опухолей (ФНО) (Kaplan, 2013). Содержимое, высвобождаемое из дегранулирующих и окислительных видов клеток вместе с цитокинами и хемокинами, возникающими в результате активации нейтрофилами, является первичным медиатором воспаления, вызывающим повреждение ткани, и данный механизм, как полагают, связан со многими видами воспалительных повреждений тканей.

Гнойный гидраденит (ГГ)

ГГ – это хроническое поражающее кожу заболевание, затрагивающее участки, богатые апокринными железами, и оно считается одним из воспалительных заболеваний кожи, связанных с нейтрофилами. Узелки появляются в пораженных областях, они постепенно набухают и разрываются с выделением гноя. Данный процесс происходит неоднократно, что приводит к образованию свищевого хода и шрамов (Jemec, 2004). Течение этой болезни создает неприятную ситуацию как для пациентов, так и для докторов. Сообщается, что частота заболевания находится в диапазоне от 1% до 4% (Jemec и др., 1996).

Точная патофизиология ГГ не до конца определена. Курение, пищевые привычки и генетическая предрасположенность были связаны с ГГ (Kurzen и др., 2008; Slade и др., 2003). Увеличенный процент клеток естественных киллеров (NK-клеток) и уменьшенный процент CD4-лимфоцитов по сравнению с показателями здорового организма, вероятно, подразумевает наличие аутоиммунной склонности к заболеванию. Было обнаружено, что повышение экспресии IL-1β и IL-17 при поражении ГГ связано с активацией инфламмасомы (Lima и др., 2016). Гнойный гидраденит (ГГ) представлен большим количеством нейтрофильных инфильтратов в воспаленной коже, особенно на поздней стадии заболевания (Lima и др., 2016; Marzano, 2016). Активированные нейтрофилы могут быть важным типом эффекторных клеток, вызывающих повреждение тканей из-за прямого вредного воздействия или косвенного регуляторного эффекта по отношению к другим эффекторным клеткам, таким как активные Т-клетки и TH17 в данном заболевания.

В последние годы была выдвинута гипотеза о влиянии какого-либо аутоиммунного или аутовоспалительного механизма на патогенез ГГ. Эта гипотеза подкрепляется положительными результатами в управлении антагонистами ФНО в предполагаемых плацебо-контролируемых исследованиях, которые приводят к утверждению адалимумаба (антитела, направленного против фактора некроза опухоли α) у пациентов с ГГ средней и тяжелой степени тяжести. Один из основных, но пока нерешенных вопросов, заключается в том, как нейтрофилы привлекаются к пораженному участку кожи, и в какой степени активированные нейтрофилы будут способствовать развитию заболевания.

Широкий диапазон возможных патогенных механизмов, предлагаемых различными исследованиями, может означать, что ГГ связан с механизмами хозяина, а

не с экзогенными факторами. Принимая во внимание парадокс, что как противоинфекционные (антибиотики), так и проинфекционные (анти-ФНО, кортикостероиды, иммунодепрессивные лекарственные средства) методы лечения могут быть полезны, ГГ может проявляться как аутовоспалительное заболевание, связанное с дефектом врожденного иммунитета волосяного фолликула (Revuz, 2009), что подтверждается тем фактом, что провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин (IL)-1β и фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), заметно повышены в поврежденной коже и по периферии от повреждения (Wollina and others, 2013).

Нейтрофильные дерматозы

Нейтрофильные дерматозы (НД) представляют собой группу нарушений, характеризующихся поражениями кожи, при которых гистологическое исследование выявляет интенсивные воспалительные инфильтраты, состоящие в основном из нейтрофилов, без признаков инфекции. НД в основном включают в себя синдром Свита (СС), гангренозную пиодермию (ГП), субкорнеальный пустулезный дерматоз (СПД), другие четко определенные заболевания и их нетипичные или переходные формы (Prat и др., 2014). Гнойный гидраденит (ГГ) недавно был отнесен к семейству НД на основании большого количества нейтрофильных инфильтратов, наблюдаемых в воспаленной коже (Lima и др., 2016; Marzano, 2016).

Гангренозная пиодермия (ГП) и гнойный гидраденит (ГГ) представляют собой прототипные нейтрофильные дерматозы, которые по своему происхождению рассматриваются как аутовоспалительное заболевание с признаком накопления нейтрофилов в коже. (Braun-Falco и др., 2012; Marzano и др., 2014). Аутовоспалительный синдром представляет собой возникающую группу воспалительных состояний, которые отличаются от аутоиммунных, аллергических и инфекционных заболеваний. С патофизиологической точки зрения все аутовоспалительные синдромы такие как ПАГА (пиогенный артрит, ГП и акне), ГАГГ (ГП, акне и гнойный гидраденит) или ПААГГГ (пиогенный артрит, акне, ГП и гнойный гидраденит) имеют общие механизмы, состоящие из чрезмерной активации врожденной иммунной системы и «стерильного» богатого нейтрофилами кожного воспаления (Cugno и др., 2017).

Нейтрофилы и аутоиммунные заболевания

Аутоиммунные заболевания определяются дефектной дифференциацией собственных и чужеродных молекул, что приводит к неправильному распознаванию

собственных молекул и тканей как чужеродных структур и сопутствующей иммунной атаке на органы организма-хозяина. Патогенез аутоиммунных заболеваний обычно можно разделить на две фазы: фаза иммунизации и эффекторная фаза. Фаза иммунизации характеризуется появлением аутореактивных Т-лимфоцитов. Затем эти Т-клетки запускают вторичный ответ, приводящий к фазе повреждения ткани, активируя различные другие типы клеток (В-клетки, цитотоксические Т-клетки, NK-клетки, нейтрофилы, макрофаги, остеокласты, фибробласты и т.д.). Активация этих эффекторных клеток аутореактивными Т-клетками может рассматриваться как эффекторная фаза, которая может быть опосредована несколькими уровнями, включая продукцию аутоантител, цитокиновые сети или прямые межклеточные контакты. (Nemeth и Mocsai, 2012).

Роль нейтрофилов в патофизиологическом развитии аутоиммунных заболеваний была ограничена, но все больше принимается во внимание. Нейтрофилы могут участвовать в нескольких этапах процесса аутоиммунного заболевания, включая презентацию антигена, регуляцию активности других типов иммунных клеток и прямое повреждение тканей. Нейтрофилы могут выставлять/высвобождать аутоантигены при активации, или при смерти от апоптоза, или во время образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (от. англ. neutrophil extracellular traps, NET). Они также могут способствовать отложению аутоантител в тканях или, как тип эффекторных клеток, могут вызывать самоповреждение тканей. Накопленные данные исследований показали, что нейтрофилы играют активную роль в развитии аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз, АНЦА-ассоциированный васкулит, семейная средиземноморская лихорадка, криопирин-ассоциированные периодические расстройства (от англ. cryopyrin-associated periodic disorders, CAPS), подагра и т.д. (Nemeth и Mocsai, 2012; Nemeth и др., 2016). Поскольку кожа является легкой мишенью для иммунных реакций, воспаление кожи является одним из наиболее частых синдромов, вызываемых этими аутоиммунными заболеваниями.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как объяснено выше, в уровне техники существовала потребность в эффективных способах лечения нейтрофильных дерматозов, таких как гнойный гидраденит (ГГ) и кожные нейтрофильные аутоиммунные заболевания.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что молекулы, ингибирующие передачу сигналов C5a, например антитело против C5a, исключительно хорошо подходят для лечения гнойного гидраденита. Авторы настоящего изобретения дополнительно изучили физиологический механизм, приводящий к активации нейтрофилов, и обнаружили, что C5a является ключевым фактором активации нейтрофилов.

Таким образом, авторы настоящего изобретения ожидают, что ингибирование активности C5a будет подходящим терапевтическим подходом для лечения различных связанных с нейтрофилами расстройств, особенно кожных нейтрофильных воспалительных заболеваний.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к соединению для применения при лечении кожного нейтрофильного воспалительного заболевания у субъекта, где указанное соединение представляет собой ингибитор активности C5a, при этом указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из групп, состоящих из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения кожного нейтрофильного воспалительного заболевания у субъекта, включающему этап:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтического количества соединения, причем соединение представляет собой ингибитор активности C5a и при этом кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного

артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры, и синдрома Шницлера.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для лечения кожного нейтрофильного воспалительного заболевания, где соединение представляет собой ингибитор активности C5a, и где кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры, и синдрома Шницлера.

Приведенное краткое описание изобретения не обязательно описывает все признаки настоящего изобретения. Другие варианты реализации станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Блокирующая активность IFX-1 в отношении повышения экспрессии рекомбинантного человеческого C5a (rhC5a)-индуцированного CD11b нейтрофилами крови. IFX-1-004 и IFX-1-012 означают две разные производственные партии. Цельную кровь человека инкубировали с буфером, одним антителом, одним rhC5a или комбинациями различных концентраций антител и rhC5a. После инкубации клетки окрашивали анти-мышиным CD11b: FITC и CD11b MFI анализировали методом проточной цитометрии. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (СО). Отмечен (стрелкой) процент блокирующей активности IFX-1 C5a-индуцированной экспрессии CD11b. Статистические различия были рассчитаны методом One-Way-ANOVA, уровень значимости $p<0,05$ являлся статистически значимым.

Фигура 2. Блокирующая активность IFX-1 в отношении повышения экспрессии эндогенной C5a (eC5a)-управляемой CD11b на нейтрофилах. В качестве источника eC5a была использована активированная зимозаном человеческая плазма (от англ. Zymosan-activated human plasma, ZAP). Цельную кровь инкубировали с буфером, одним IFX-1, одним ZAP или комбинациями IFX-1 и ZAP. После инкубации клетки окрашивали анти-мышиным CD11b: FITC и анализировали методом проточной цитометрии. Результаты представлены как среднее значение ± среднеквадратическое отклонение. Отмечен (стрелкой) процент блокирующей активности IFX-1 C5a-индуцированной экспрессии CD11b. Статистические различия были рассчитаны методом One-Way-ANOVA, уровень значимости $p<0,05$ являлся статистически значимым.

Фигура 3. Активация нейтрофилов крови с помощью зимозана и блокирующей активности IFX-1. Цельную кровь инкубировали только со сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), rhC5a и зимозаном A или комбинациями различных концентраций IFX-1 и rhC5a или зимозана A. После инкубации клетки окрашивали анти-мышиными CD11b: FITC, и CD11b MFI анализировали методом проточной цитометрии. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (CO). Отмечен (стрелкой) процент блокирующей активности IFX-1 C5a-индуцированной экспрессии CD11b. Статистические различия были рассчитаны методом One-Way-ANOVA, уровень значимости $p<0,05$ являлся статистически значимым.

Фигура 4. IFX-1 ингибирует индуцированную зимозаном генерацию IL-8 в цельной крови человека. Концентрации IL-8 были получены с помощью метода иммуноферментного анализа (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) после инкубации цельной крови человека с различными концентрациями зимозана A, как указано на оси x, в присутствии (пустые кружки) или в отсутствие (заполненные кружки) IFX-1. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (CO).

Фигура 5. Концентрации C3a (Фиг. 5A), C5a (Фиг. 5B) и C5b-9 (Фиг. 5C) в плазме крови 14 здоровых людей и 54 пациентов с гнойным гениталитом (ГГ). Круги обозначают выбросы, а звездочки – крайние значения. Уровень значимости p символизирует значительные различия между пациентами и контрольной группой.

Фигура 6. Влияние плазмы с ГГ на активацию нейтрофилов в крови и потенциальную роль C5a. Образцы плазмы с ГГ инкубировали с плазмой человека в присутствии и в отсутствие IFX-1, и экспрессию CD11b на нейтрофилах крови

определяли с помощью метода проточной цитометрии. Уровни C5a в контрольной группе и образцах с ГГ были помечены в приложенной таблице.

Фигура 7. Ответ HiSCR после лечения IFX-1 у пациентов с ГГ. Клинический ответ гнойного гидраденита (от англ. Hidradenitis Suppurativa Clinical Response, HiSCR) определяется как уменьшение количества воспалительных повреждений на 50% (≥ 50%) (абсцессы + воспалительные узелки) и отсутствие увеличения абсцессов или дренирующих свищей по сравнению с исходным уровнем.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Прежде чем настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение.

Предпочтительно термины, используемые в настоящем описании, определены, как описано в глоссарии «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010, Basel, Switzeland).

Во всем описании настоящего изобретения, включая следующую за ним формулу изобретения, если из контекста не следует иное, слово «включать» («содержать») и варианты, такие как «включает» («содержит») и «включающий» («содержащий»), подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий.

В тексте настоящего описания цитируется несколько документов (например, патенты, заявки на патенты, научные публикации, описания производителя, инструкции, представленные последовательности базы генетических данных (англ. GenBank Accession Number) и т. д.). Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано

как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому описанию в силу предшествующего изобретения. Некоторые из документов, цитируемых в настоящем описании, характеризуются как «*включенные посредством ссылки*». В случае противоречия между определениями или положениями таких включенных ссылок и определениями или положениями, приведенными в настоящем описании, приоритет имеет текст настоящего описания.

Последовательности: Все последовательности, упомянутые в настоящем описании, раскрыты в прилагаемом перечне последовательностей, который со всем своим содержанием и раскрытием является частью этого описания.

В контексте настоящего изобретения C5a, в частности, относится к человеческому C5a. Человеческий C5a представляет собой пептид из 74 аминокислот со следующей аминокислотной последовательностью:

TLQKKIEEIA AKYKHSVVKK CCYDGACVNN DETCEQRAAR ISLGPRCIKA FTECCVVASQ LRANISHKDM QLGR (SEQ ID NO: 1).

Аминокислотная последовательность человеческого C5 может быть найдена под номером доступа UniProtKB P01031 (CO5_HUMAN).

Термин «ингибитор активности C5a» в настоящем описании означает любое соединение, которое каким-либо образом снижает активность C5a. Это снижение активности может быть достигнуто путем прямого или косвенного снижения концентрации C5a, или путем снижения активности C5a, или путем предотвращения того, что C5a оказывает свое воздействие на один или несколько его рецепторов (например, на C5aR или C5L2), или путем снижения концентраций или активности одного или нескольких рецепторов C5a.

В контексте настоящего изобретения выражение «рецептор C5a» относится к любому потенциальному лиганду, связывающему C5a на поверхности клетки, особенно к любому рецепторному белку, с которым C5a может связываться и вызывать реакцию на указанном рецепторе (например, активацию или ингибирование рецептора). Термин «рецептор C5a», в частности, охватывает два рецептора C5aR и C5L2. Альтернативные названия для C5aR – C5aR1 и CD88. Альтернативное название для C5L2 – C5aR2.

В контексте настоящего изобретения выражение «белковый лиганд» относится к любой молекуле, состоящей из аминокислот, соединенных пептидными связями, независимо от общего размера молекулы, и которая способна специфически связываться с другой молекулой. Соответственно, выражение «белковый лиганд» включает олигопептиды (≤ 100 аминокислот) и полипептиды (> 100 аминокислот). Выражение

«белковый лиганд» также включает циклические пептиды независимо от их размера. Выражение «белковый лиганд», в частности, охватывает антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, антителоподобные белки и пептидомиметики.

Используемый в настоящем описании термин «первое соединение» (например, белковый лиганд или аптамер нуклеиновой кислоты) считается «связывающимся» со вторым соединением (например, целевым белком), если его константа диссоциации K_d с указанным вторым соединением составляет 1 мМ или менее, предпочтительно 100 мкМ или менее, предпочтительно 50 мкМ или менее, предпочтительно 30 мкМ или менее, предпочтительно 20 мкМ или менее, предпочтительно 10 мкМ или менее, предпочтительно 5 мкМ или менее, более предпочтительно 1 мкМ или менее, более предпочтительно 900 нМ или менее более предпочтительно 800 нМ или менее, более предпочтительно 700 нМ или менее, более предпочтительно 600 нМ или менее, более предпочтительно 500 нМ или менее, более предпочтительно 400 нМ или менее, более предпочтительно 300 нМ или менее, более предпочтительно 200 нМ или менее, еще более предпочтительно 100 нМ или менее, еще более предпочтительно 90 нМ или менее, еще более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более предпочтительно 70 нМ или менее, еще более предпочтительно 60 нМ или менее, еще более предпочтительно 50 нМ или менее, еще более предпочтительно 40 нМ или менее, еще более предпочтительно 30 нМ или менее, еще более предпочтительно 20 нМ или меньше и еще более предпочтительно 10 нМ или менее.

Термин «связывание» согласно настоящему изобретению предпочтительно относится к специфическому связыванию. «Специфическое связывание» означает, что соединение (например, белковый лиганд или аптамер нуклеиновой кислоты) сильнее связывается с мишенью, такой как эпитоп, для которого оно специфично, по сравнению со связыванием с другой мишенью. Соединение с первой мишенью сильнее связывается, чем со второй мишенью, если оно связывается с первой мишенью с константой диссоциации (K_d), которая ниже, чем константа диссоциации для второй мишени. Предпочтительно константа диссоциации (K_d) для мишени, с которой соединение связывается специфически, более чем в 10 раз, предпочтительно более чем в 20 раз, более предпочтительно более чем в 50 раз, еще более предпочтительно более чем в 100 раз, в 200 раз, В 500 раз или в 1000 раз ниже, чем константа диссоциации (Kd) для мишени, с которой соединение связывается не специфически.

Термин «K_d» (обычно измеряемый в «моль/л», иногда сокращенно обозначаемый как «М») в настоящем описании означает константу равновесия при диссоциации

конкретного взаимодействия между соединением (например, белковым лигандом) и молекулой-мишенью.

Методы определения связывания аффинных соединений, то есть определения константы диссоциации K_D, известны специалисту в данной области техники и могут быть выбраны, например, из следующих методов, известных в данной области техники: технология поверхностного плазмонного резонанса (англ. Surface Plasmon Resonance, SPR), биослойная интерферометрия (англ. Bio-layer interferometry, BLI), иммуноферментный анализ (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), проточная цитометрия, изотермическая титрационная калориметрия (англ. isothermal titration calorimetry, ITC), аналитическое ультрацентрифугирование, радиоиммуноанализ (англ. Radioimmunoassay, RIA или IRMA) и усиленная хемилюминесценция (англ. enhanced chemiluminescence, ECL). Как правило, константа диссоциации K_D определяется при 20 ° C, 25 ° C, 30 ° C или 37 ° C. Если специально не указано иное, значения K_D, приведенные в данном описании, определяют при 20 ° C с помощью метода ELISA.

«Эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, является частью макромолекулы, которая распознается иммунной системой, в частности антителами, B-клетками или T-клетками. Термин «эпитоп» в настоящем описании означает часть макромолекулы, способную связываться с соединением (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом), как описано в настоящем документе. В этом контексте термин «связывание» предпочтительно относится к спецефическому связыванию. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахара, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы можно отличить тем, что у первых связывание теряется в присутствии денатурирующих растворителей, в отличие от вторых.

«Паратоп» - это часть антитела, которая связывается с эпитопом. В контексте настоящего изобретения «паратоп» представляет собой часть соединения (например, белкового лиганда), как описано в настоящем документе, которая связывается с эпитопом.

Термин «антитело» обычно относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Термин «антитело» также

включает все рекомбинантные формы антител, в частности антител, описанных в настоящем документе, например, антитела, экспрессируемые в прокариотах, негликозилированные антитела, антитела, экспрессируемые в эукариотах (например, клетках линии CHO), гликозилированные антитела и любые фрагменты и производные антигенсвязывающих антител, как описано ниже. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VH или V_H) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как VL или V_L) и константной области легкой цепи. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (от англ. complementarity determining regions, CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (от англ. framework regions, FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «связывающая часть») в настоящем описании означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагменты, одновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) F(ab')2 - фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), которые состоят из домена VH; (vi) выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и (vii) комбинации двух или более выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и

VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть образованными в виде единой белковой цепи, в которой VL и VH-области образуют пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Следующим примером является слитый белок связывающего домена иммуноглобулина, содержащий (i) полипептид связывающего домена, который слит с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с шарнирной областью, и (iii) константную область CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с константной областью CH2. Полипептид связывающего домена может быть вариабельной областью тяжелой цепи или вариабельной областью легкой цепи. Слитые белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Другими примерами «антигенсвязывающих фрагментов» являются так называемые микроантитела, которые получены из отдельных CDR. Например, Heap с соавторами в 2005 году описывали микроантитело из 17 аминокислотных остатков, полученное из CDR3 тяжелой цепи антитела, направленного против гликопротеина оболочки gp120 ВИЧ-1 (Heap C.J. et al. (2005) *Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody.* J. Gen. Virol. 86:1791-1800). Другие примеры включают миметики малых антител, содержащие две или более области CDR, которые слиты друг с другом, предпочтительно с помощью родственных каркасных областей. Такой небольшой миметик антител, содержащий V_H CDR1 и V_L CDR3, связанный с родственным VH FR2, был описан Qiu и соавторами в 2007 году (Qiu X.-Q. et al. (2007) *Small antibody mimetics comprising two complementary-determining regions and a framework region for tumor targeting.* Nature biotechnology 25(8):921-929).

Таким образом, термин «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего описания относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифично связывает антиген. Также включены иммуноглобулиноподобные белки, которые отбираются с

помощью методик, включая, например, фаговый дисплей для специфического связывания с молекулой-мишенью или эпитопом-мишенью. Молекулы иммуноглобулина в настоящем изобретении могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, предпочтительно IgG2a и IgG2b, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела или фрагменты происходят от человека, шимпанзе, грызуна (например, мыши, крысы, морской свинки или кролика), курицы, индейки, свиньи, овцы, козы, верблюда, коровы, лошади, осла, кошки или собаки. Особенно предпочтительно, чтобы антитела имели человеческое или мышиное происхождение. Антитела в настоящем изобретении также включают химерные молекулы, в которых константная область антитела, полученная из одного вида, предпочтительно человека, объединена с антигенсвязывающим сайтом, полученным из другого вида, например, мыши. Кроме того, антитела в настоящем изобретении включают гуманизированные молекулы, в которых антигенсвязывающие участки антитела, полученные от нечеловеческого вида (например, от мыши), объединены с константными и каркасными областями человеческого происхождения.

Как показано в настоящем описании в качестве примера, антитела в настоящем изобретении могут быть получены непосредственно из гибридом, которые экспрессируют антитело, или могут быть клонированы и рекомбинантно экспрессированы в клетке-хозяине (например, клетке CHO или лимфоцитарной клетке). Дополнительными примерами клеток-хозяев являются микроорганизмы, такие как E.coli, и грибы, такие как дрожжи. В качестве альтернативы они могут быть получены рекомбинантно из трансгенного животного, не являющегося человеком, или растения.

Термин «химерное антитело» относится к тем антителам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелых и легких цепей гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу, тогда как оставшийся сегмент цепи гомологичен соответствующим последовательностям другого вида или класса. Обычно вариабельная область легкой и тяжелой цепей имитирует вариабельные области антител, полученных от одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных из другого. Одно явное преимущество таких химерных форм состоит в том, что вариабельную область можно легко получить из

известных в настоящее время источников, используя легкодоступные В-клетки или гибридомы из организмов-хозяев, не являющихся человеком, в сочетании с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека. В то время как вариабельная область имеет преимущество в простоте получения, и источник не влияет на специфичность, константная область, являющаяся человеческой, с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ от человека, когда вводятся антитела, чем константная область от нечеловеческого источника. Однако определение не ограничивается этим конкретным примером.

Термин «гуманизированное антитело» относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий сайт, который в основном происходит от иммуноглобулина из нечеловеческого вида, при этом остальная часть структуры молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полные вариабельные домены, слитые с константными доменами, либо только области, определяющие комплементарность (CDR), привитые на соответствующие каркасные области в вариабельных доменах. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами, например, модифицированный, чтобы больше походить на человеческие иммуноглобулины. Некоторые формы гуманизированных антител сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антитела мыши). Другие формы имеют одну или несколько CDR, которые изменены относительно исходного антитела.

Специалистам в данной области известны различные способы гуманизации антител, которые были рассмотрены Almagro и Fransson, в 2008 году, Frontiers in Bioscience, 13: 1619-1633, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Обзорная статья Almagro и Fransson кратко изложена в национальной заявке US 2012/0231008 A1 международной заявки WO 2011/063980 A1. Содержание US 2012/0231008 A1 и WO 2011/063980 A1 включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

Термин «антитела человека» в настоящем описании означает антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека в настоящем изобретении могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например,

мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Антитела человека в настоящем изобретении включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или животных, трансгенных для одного или нескольких человеческих иммуноглобулинов и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati и Jakobovits.

Термин «моноклональное антитело» в настоящем описании означает препарат молекул антитела одного молекулярного состава. Моноклональное антитело демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. В одном варианте реализации моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от нечеловеческого животного, например, мыши, слитой с иммортализованной клеткой.

Термин «рекомбинантное антитело» в настоящем описании включает все антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как (a) антитела, выделенные от животного (например, мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными в отношении к генам иммуноглобулина или гибридоме, полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Термин «трансфектома» в настоящем описании включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки CHO, клетки NS/0, клетки HEK293, клетки HEK293T, клетки растений или грибов, включая клетки дрожжей.

Термин «гетерологичное антитело» в настоящем описании означает трансгенный организм, продуцирующий такое антитело. Данный термин относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую последовательности, обнаруженной в организме, не являющемся трансгенным организмом, и, как правило, происходящем из вида, отличного от трансгенного организма.

Термин «гетерогибридное антитело» в настоящем описании относится к антителу, содержащему легкие и тяжелые цепи различного происхождения. Например,

антитело, содержащее тяжелую цепь человека, связанную с легкой цепью мыши, представляет собой гетерогибридное антитело.

Таким образом, «антитела и их антигенсвязывающие фрагменты», подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, моновалентные, биспецифичные, гетероконъюгатные, мультиспецифичные, рекомбинантные, гетерологичные, гетерогибридные, химерные, гуманизированные (в частности, CDR-привитые), деиммунизированные или человеческие антитела, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')2, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, Fd, Fv, дисульфид-связанные Fvs (dsFv), одноцепочечные антитела (например, scFv), диатела или тетратела (Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448), нанотела (также известные как однодоменные антитела), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам, описанным в настоящем документе) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанного.

Антитела, описанные в настоящем документе, предпочтительно являются выделенными. Термин «выделенное антитело» в настоящем описании относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих различной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с C5a, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от C5a). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом C5a человека, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, из других видов (например, гомологи C5a у другого вида, например, крысиный C5a). Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободным от других клеточных материалов и/или химических веществ. В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинация «выделенных» моноклональных антител относится к антителам, обладающим различной специфичностью и объединенным в четко определенную композицию.

Термин «встречающийся в природе» в настоящем описании означает объект, который можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, встречается в природе.

Термин «аптамер нуклеиновой кислоты» в настоящем описании относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована посредством повторных циклов отбора *in vitro* или SELEX (систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением) для связывания с молекулой-мишенью (см. Обзор: Brody E.N. and Gold L. (2000), *Aptamers as therapeutic and diagnostic agents.* J. Biotechnol. 74(1):5-13). Аптамер нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу ДНК или РНК. Аптамеры могут содержать модификации, например модифицированные нуклеотиды, такие как 2'-фторзамещенные пиримидины, и/или могут содержать один или несколько нуклеотидов с L-рибозными единицами (или L-дезоксирибозой) вместо стандартных единиц D-рибозы (или единиц D-дезоксирибозы).

Термин «антителоподобный белок» в настоящем описании относится к белку, который был сконструирован (например, путем мутагенеза петель) для специфического связывания с молекулой-мишенью. Как правило, такой антителоподобный белок содержит по меньшей мере одну вариабельную пептидную петлю, присоединенную на обоих концах к каркасу белка. Это двойное структурное ограничение значительно увеличивает аффинность связывания антителоподобного белка до уровней, сопоставимых с антителами. Длина вариабельной пептидной петли обычно составляет от 10 до 20 аминокислот. Каркасный белок может представлять собой любой белок, имеющий хорошие характеристики растворимости. Предпочтительно каркасный белок представляет собой небольшой глобулярный белок. Антителоподобные белки включают в себя, без ограничения, аффитела, аффилины, аффимеры, аффитины, альфатела, антикалины, авимеры, DARP-ины (разработанные анкириновые повторные белки; от англ. designed ankyrin repeat proteins), финомеры, пептиды домена Куница и монотела (см. Обзор: Binz H.K. et al. (2005) *Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains.* Nat. Biotechnol. 23(10):1257-1268). Антителоподобные белки могут быть получены из больших библиотек мутантов, например, быть панорамированными из больших библиотек фагового дисплея и могут быть выделены по аналогии с обычными антителами. Также антителоподобные связывающие белки могут быть получены путем комбинаторного мутагенеза поверхностно-экспонированных остатков в глобулярных белках. Антителоподобные белки иногда называют «пептидными аптамерами» или «миметиками антител».

Термин «пептидомиметик» в настоящем описании означает небольшую белкоподобную цепь, предназначенную для имитации пептида. Пептидомиметики обычно возникают в результате модификации существующего пептида с целью

изменения свойств молекулы. Например, они могут возникать в результате модификаций для изменения стабильности молекулы или биологической активности. Это может играть роль в разработке соединений, подобных лекарственным средствам, из существующих пептидов. Эти модификации включают изменения в пептиде, которые не встречаются в природе (такие как измененные основные цепи и включение не встречающихся в природе аминокислот).

В контексте настоящего изобретения термин «малая молекула» относится к молекуле с молекулярной массой 2 кДа или менее, предпочтительно с молекулярной массой 1 кДа или менее. Термин «малая молекула», в частности, относится к молекулам, которые не являются ни олигопептидами, ни олигонуклеотидами.

В контексте настоящего изобретения общее выражение «причем А конкурирует с В за связывание с С» (например, в выражении «*причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (а), за связывание с C5a*») используется для определения свойств связывания соединения, указанного в позиции А. Указанное соединение А связывается с С, и соединение В также связывается с С, но соединение А и соединение В не могут связываться с С одновременно; т.е. А и В связываются с одним и тем же эпитопом (или по меньшей мере с перекрывающимися эпитопами) на С. Такая конкуренция в связывании может быть определена с помощью конкурентного ELISA или с помощью технологии на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или с помощью любого из других методов, перечисленных выше в контекст определения связывающего сродства. Если прямо не указано иное, конкурирующие свойства связывания соединения определяют с помощью метода ELISA при 20° С с использованием эквимолярных концентраций двух конкурирующих соединений.

Термин «кожное нейтрофильное воспалительное заболевание» в настоящем описании относится к любому заболеванию, которое связано с воспалением кожи и с нейтрофильным инфильтратом в коже (например, в эпидермисе) индивидуума, пораженного указанным заболеванием. Термин «кожное нейтрофильное воспалительное заболевание», в частности, относится к гнойному гидрадениту (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенному артриту, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойному гидрадениту); ПААГГГ (пиогенному артриту, акне, ГП и гнойному гидрадениту); синдрому Свита (СС); субкорнеальному пустулезному дерматозу (СПД); приобретенному буллезному эпидермолизу, стойкой возвышающейся эритеме (СВЭ);

нейтрофильному панникулиту; семейной средиземноморской лихорадке, криопирин-ассоциированным расстройстам, подагре и синдрому Шницлера.

Выражение «заболевание, связанное с ГГ» в настоящем описании включает, без ограничения, гангренозную пиодермию (ГП); ПАГА (пиогенный артрит, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойный гидраденит); ПААГГГ (пиогенный артрит, акне, ГП и гнойный гидраденит); синдром Свита (СС); и субкорнеальный пустулезный дерматоз (СПД).

IFX-1 (альтернативное название: CaCP 29; InflaRx GmbH, Германия) представляет собой антитело, специфически связывающееся с C5a. Последовательности CDR и последовательности FR IFX-1 раскрыты в WO 2015/140304 A1 (в таблице 3 на странице 38), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

INab708 (InflaRx GmbH, Германия) представляет собой другое антитело, специфически связывающееся с C5a. Последовательности CDR и последовательности FR IFX-1 также раскрыты в WO 2015/140304 A1 (в таблице 3 на странице 38), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. MEDI-7814 (МедИммун) представляет собой рекомбинантное гуманизированное антитело против C5a. Кристаллическая структура человеческого C5a в комплексе с MEDI7814 доступна в Банке Белковых Данных RCSB под номером доступа 4UU9 (DOI: 10.2210/pdb4uu9/pdb).

ALXN-1007 (Алексион) представляет собой гуманизированное антитело против C5a.

NOX-D21 (Ноксон) представляет собой пегилированный смешанный L-РНК/ДНК-аптамер (Spiegelmer ™) с последовательностью 40 кДа-ПЭГ-аминогексил--GCG AUG (dU)GG UGG UGA AGG GUU GUU GGG (dU)GU CGA CGC A(dC)G C (SEQ ID NO: 34). NOX-D21нацелен на C5a (Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Beylier T, Ruegg UT, Vater A, and Takeda S. 2017. *Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation.* Am. J. Pathol., 187(5):1147-1161; electronically published ahead of print: March 18, 2017).

Экулизумаб (альтернативные названия: Солирис (Soliris ™), 5G1-1; h5G1.1; Alexion Pharmaceuticals) представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное IgG2/4;к-антитело, продуцируемое мышиной миеломной клеточной культурой и очищенное по стандартной технологии биопроцесса. Экулизумаб содержит человеческие константные области из последовательностей человеческого IgG2 и

последовательностей человеческого IgG4 и мышиные области, определяющие комплементарность, трансплантированные в человеческие вариабельные каркасные области легкой и тяжелой цепей. Экулизумаб состоит из двух 448 аминокислотных тяжелых цепей и двух 214 аминокислотных легких цепей и его молекулярная масса приблизительно составляет 148 кДа. Тяжелая цепь и легкая цепь экулизумаба раскрыты, например, в WO 2016/061066 A1 как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 34, соответственно. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют тяжелые и легкие цепи экулизумаба, раскрыты, например, в патенте США № 6355245.

ALXN1210 (альтернативное название: BNJ441; Alexion Pharmaceuticals) представляет собой антитело против C5. Тяжелые и легкие цепи ALXN1210 раскрыты в WO 2016/209956 A1 как SEQ ID NOs: 14 и 11, соответственно.

ALXN5500 (Алексион) представляет собой гуманизированное антитело против C5. Это кандидат в следующее поколение Экулизумаба.

LFG316 (альтернативное название: Тесидолумаб (Tesidolumab), NOV-4; Морфосис (Morphosys), Новартис (Novartis)) представляет собой антитело против C5.

Коверсин (Coversin™) (альтернативное название: EV 576; PAS-коверсин (PAS-coversin); rEV 576; Коверсин целевой ткани (Tissue targeted Coversin™) - Akari; Akari Therapeutics, Evolutec) представляет собой молекулу рекомбинантного белка (16,7 кДа), полученную из молекулы слюны из клеща *Ornithodros moubata*, причем указанный белок помогает паразиту питаться, не вызывая иммунный ответ хозяина. Аминокислотная последовательность белка EV576 (то есть Коверсина), а также его кодирующая нуклеотидная последовательность показаны на Фиг. 2 of WO 2008/029167. Коверсин (Coversin™) связывается с C5.

RA101495 (Ra Pharma) является макроциклическим синтетическим пептидным ингибитором C5 (Ricardo A, Arata M, DeMarco S, Dhamnaskar K, Hammer R, Fridkis-Hareli M, Rajagopal V, Seyb K, Tang G-Q, Tobe S and Treco D. 2015. *Preclinical Evaluation of RA101495, a Potent Cyclic Peptide Inhibitor of C5 for the Treatment of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.* Blood 126:939).

Зимура (Zimura®) (альтернативные названия: аптамер Anti-C5; ARC-187; ARC-1905; Авацинкаптад пегол натрия; OphthoTech Corporation, Archemix Corporation) является пегилированным РНК-аптамером, который ингибирует фактор комплемента C5. Нуклеотидная последовательность ARC1905 (т.е. Зимуры) показана, например, в WO 2005/079363 A2 как SEQ ID NO: 67, а ее структура показана на Фиг. 22 WO 2005/079363 A2.

AMY-201 (Amyndas Pharmaceuticals) представляет собой инженерную форму фактора H, которая напрямую связывает регуляторные и поверхностно-узнаваемые домены; Таким образом, это своего рода молекула мини-FH.

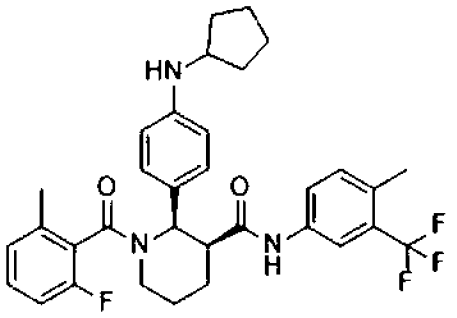
Микрокоцепт (альтернативные названия: APT070 и APT 070C; создатель: Adprotech; разработчик: Inflazyme Pharmaceuticals) состоит из первых трех коротких консенсусных доменов человеческого рецептора комплемента 1, изготовленного в рекомбинантных бактериях и модифицированного целевым мембранным амфифильным пептидом на основе встречающегося в природе мембранного связанного миристоил-электростатического переключающего пептида (Souza DG, Esser D, Bradford R, Vieira AT, and Teixeira MM. 2005. *APT070 (Mirococept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury.* Br J Pharmacol 145(8):1027-1034).

БикацioМаб (BikacioMab) (Novelmed) представляет собой $F(ab)_2$ фрагмент антитела против фактора Bb, называемый NM001. Антитело NM001 продуцируется гибридомной клеточной линией 1D3 расположенной под учетным номером ATCC PTA-8543.

Лампализумаб (Lampalizumab) (альтернативные названия: анти-фактор D Fab; FCFD4514S; RG7417; TNX-234; создатель: Tanox, разработчик: Genentech) представляет собой гуманизированный фрагмент Fab анти-фактора D, который ингибирует фактор D и альтернативный путь комплемента посредством связывания с экзозитом фактора D.

ALN-CC5 (Алнилам) (Alnylam) представляет собой RNAi-терапевтическое средство, нацеленное на C5 человека, приматов и грызунов. Типичные композиции iRNA, нацеленные на ген C5, описаны в WO 2016/044419.

Авакопан (Avacopan) (также известный под названием CCX168; Chemocentryx) представляет собой небольшую молекулу (MW = 581,66 г/моль), имеющую структуру согласно формуле I:



I

IUPAC/ Химическое название авакопана (2R,3S)-2-[4-(циклопентиламино)фенил]-1-(2-фтор-6-метилбензоил)-N-[4-метил-3-(трифторметил)фенил]пиперидин-3-карбоновая кислота. Авакопан является селективным ингибитором C5aR. В контексте настоящего изобретения термин «авакопан» относится к соединению согласно формуле I, а также к его физиологически переносимым солям.

Термин «пациент» в настоящем описании означает любое млекопитающее или птицу, на которых может оказать благоприятное действие лечение соединением, описанным в настоящем документе (т.е. ингибитором активности C5a, описанным в настоящем документе). Предпочтительно «пациент» выбран из группы, состоящей из лабораторных животных (например, мыши или крысы), домашних животных (включая, например, морскую свинку, кролика, курицу, индейку, свинью, овцу, козу, верблюда, корову, лошадь, осла, кошку или собаку), или приматов, включая шимпанзе и людей. Особенно предпочтительно «пациент» представляет собой человека.

Термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» заболевания или расстройства в настоящем описании означают выполнение одного или более из следующего: (a) снижение тяжести и/или продолжительности расстройства; (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характеризующих излечиваемое расстройство(а); (c) ингибирование ухудшения симптомов характеризующих излечиваемое расстройство(а); (d) ограничение или предотвращение рецидива расстройств(а) у пациентов, которые ранее имели расстройство(а); и (e) ограничение или предотвращение рецидива симптомов у пациентов, которые ранее были симптоматическими для расстройств(а).

Термины «предотвращать», «осуществление предотвращения», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или расстройства в настоящем описании означают предотвращение возникновения расстройства у субъекта.

«Эффективное количество» представляет собой количество терапевтического агента, достаточное для достижения намеченной цели. Эффективное количество данного терапевтического агента будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как природа агента, путь введения, размер и вид животного для получения терапевтического агента и цель введения. Эффективное количество в каждом отдельном случае может быть определено эмпирически опытным специалистом в соответствии с установленными в данной области способами.

«Фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или внесенный в список

Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на животных, и в частности на людях.

Варианты реализации изобретения

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано. В следующих утверждениях различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный ниже, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительный или выгодный.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к соединению для применения для лечения кожного нейтрофильного воспалительного заболевания у субъекта, где указанное соединение представляет собой ингибитор активности C5a, при этом кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения кожного нейтрофильного воспалительного заболевания у субъекта, включающему этап:

введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтического количества соединения, причем указанное соединение представляет собой ингибитор активности C5a, и при этом указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения для приготовления фармацевтической композиции для лечения кожного нейтрофильного воспалительного заболевания, причем соединение представляет собой ингибитор активности C5a, и при этом указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a:

- снижает концентрацию C5 (например, путем ингибирования образования и/или активности C3-конвертазы; путем ингибирования образования и/или активности C5-конвертазы; путем ингибирования транскрипции гена C5; путем блокирования трансляции мРНК C5; путем увеличения деградации мРНК C5, путем увеличения деградации белка C5 или путем предотвращения секреции C5 из печени);
- ингибирует расщепление C5 на C5a и C5b (например, путем ингибирования C5-конвертазы или связывания с сайтом расщепления на C5, тем самым блокируя расщепление);
- снижает концентрацию C5a (например, путем увеличения деградации белка C5a);
- ингибирует связывание между C5a и рецептором C5a (например, путем связывания с C5a или связывания с рецептором C5a);
- снижает концентрацию рецептора C5a (например, путем ингибирования транскрипции гена рецептора C5a; путем блокирования трансляции мРНК рецептора C5a; путем увеличения деградации мРНК рецептора C5a; путем увеличения деградации белка рецептора C5a); и/или
- снижает активность рецептора C5a.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из белкового лиганда (как определено выше); олигонуклеотида и небольшой молекулы (как определено выше). Олигонуклеотиды, действующие в качестве ингибиторов активности C5a, могут достигать своего ингибирующего эффекта, например, связываясь с молекулами

нуклеиновой кислоты (таким образом, ингибируя транскрипцию и/или трансляцию) или связываясь с белками (например, когда олигонуклеотиды являются аптамерами нуклеиновых кислот).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд, который специфически связывается с белком C5, или с белком C5a, или с белком рецептора C5a. В дополнительных вариантах реализации белковый лиганд выбран из группы, состоящей из

(i) антител (например, анти-C5-антител, анти-C5a-антител, анти-C5aR-антител или анти-C5L2-антител),

(ii) антигенсвязывающих фрагментов антител,

(iii) антителоподобных белков,

(iv) вариантов, ингибирующих C5a,

(v) вариантов, ингибирующих рецептор C5a (например, рецепторы-ловушки),

(vi) белков, действующих на путь комплемента (например, Коверсин); и

(vii) пептидов (например, RA101495 (Ra Pharma, Кембридж, MA)).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, который специфически связывается с конформационным эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) и SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) C5a человека. Связывание с конформацией, образованной аминокислотными последовательностями в соответствии с SEQ ID NOs: 2 и 3, означает, что белковый лиганд или олигонуклеотид связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 2 соответствует аминокислотам 30-38 C5a человека. SEQ ID NO: 3 соответствует аминокислотам 66-72 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно DETCEQR (SEQ ID NO: 4). SEQ ID NO: 4 соответствует аминокислотам 31-37 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается

по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности согласно HKDMQ (SEQ ID NO: 5), более предпочтительно по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности KDM. SEQ ID NO: 5 соответствует аминокислотам 67-71 C5a человека; последовательность KDM соответствует аминокислотам 68-70 C5a человека.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности HKDMQ (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, связывается по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и по меньшей мере с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности KDM.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения две последовательности образуют конформационный эпитоп C5a (например, пары последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 4 и 5; или SEQ ID NO: 4 и последовательность KDM), разделенный 1-50 смежными аминокислотами, которые не участвуют в связывании со связывающим фрагментом согласно настоящему изобретению. Далее такие аминокислоты, которые не участвуют в связывании со связывающим фрагментом согласно настоящему изобретению, будут называться «не связывающимися аминокислотами». Две последовательности, образующие конформационный эпитоп, предпочтительно разделены 6-45 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 12-40 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 18-35 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 24-30 смежными несвязывающими аминокислотами, более предпочтительно 25-29 смежными несвязывающими аминокислотами, еще более предпочтительно 26-28 смежными несвязывающими аминокислотами и наиболее предпочтительно 27 смежными несвязывающими аминокислотами.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, специфически связывающийся с конформационным эпитопом C5a, обладает константой

связывания (K_d) с C5a человека, значение которой составляет 10 нМ или менее, предпочтительно 9 нМ или меньше, более предпочтительно 8 нМ или менее, более предпочтительно 7 нМ или менее, более предпочтительно 6 нМ или менее, более предпочтительно 5 нМ или менее, более предпочтительно 4 нМ или менее, более предпочтительно 3 нМ или менее, более предпочтительно 2 нМ или менее и еще более предпочтительно 1 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения константа диссоциации K_d между связывающим фрагментом и C5a человека составляет от 1 пМ (пикомоль) до 5 нМ (наномоль), более предпочтительно, от 2 пМ до 4 нМ, более предпочтительно, от 5 пМ и 3 нМ, более предпочтительно от 10 пМ до 2 нМ, более предпочтительно от 50 пМ до 1 нМ, более предпочтительно от 100 пМ до 900 пМ, более предпочтительно от 200 пМ до 800 пМ, более предпочтительно от 300 пМ до 700 пМ, и еще более предпочтительно от 400 пМ до 600 пМ.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд или олигонуклеотид, предпочтительно белковый лиганд, специфически связывающийся с C5a, проявляет по меньшей мере блокирующую активность примерно 75%, предпочтительно по меньшей мере блокирующую активность примерно 80%, более предпочтительно по меньшей мере блокирующую активность примерно 85%, более предпочтительно по меньшей мере блокирующую активность примерно 90%, более предпочтительно по меньшей мере блокирующую активность примерно 95% для биологических эффектов, индуцируемых одной молекулой C5a, в частности C5a человека. Эти конкретные блокирующие активности относятся к тем вариантам реализации, в которых связывающий фрагмент содержит единственный паратоп, связывающийся с C5a, предпочтительно с C5a человека. В вариантах реализации, где связывающий фрагмент содержит два или более C5a-специфических паратопов, указанные блокирующие активности по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85% и т.д., достигаются, когда контактирует одна молекула связывающего фрагмента с числом молекул C5a, равным количеству C5a-специфических паратопов, присутствующих в связывающем фрагменте. Другими словами, когда паратопы связывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, и C5a присутствуют в эквимолярных концентрациях, связывающий фрагмент проявляет блокирующую активность по меньшей мере примерно 75%, предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере примерно 80%, более предпочтительно блокирующую

активность по меньшей мере примерно 85%, более предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере примерно 90% и более предпочтительно блокирующую активность по меньшей мере примерно 95% для биологических эффектов, индуцируемых C5a. Предпочтительным биологическим блокирующим эффектом является индуцированное C5a высвобождение лизоцима из клеток цельной крови человека. Анализы для определения этого C5a-индуцированного высвобождения лизоцима и его блокирования описаны, например, в WO 2011/063980 A1.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) последовательность CDR3 тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 6; или

(ii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7;

При этом последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(iii) последовательность CDR3 легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8; или

(iv) последовательность CDR3 легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 9;

При этом последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) последовательность CDR3 тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8; или

(ii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7 и последовательность CDR3 легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 9;

при этом последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

при этом последовательность CDR3 легкой цепи CDR3 необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну из следующих последовательностей:

(v) последовательность CDR2 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 10;

(vi) последовательность CDR2 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 11;

(vii) последовательность CDR2 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 12;

(viii) последовательность CDR2 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 13;

(ix) последовательность CDR1 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 14;

(x) последовательность CDR1 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 15;

(xi) последовательность CDR1 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 16; или

(xii) последовательность CDR1 легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 17;

при этом последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

при этом последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В конкретных вариантах реализации общее количество этих необязательных изменений указано выше в каждой из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, и SEQ ID NO: 17, т.е. общее количество замен, делеций и добавлений в каждой последовательности составляет 1 или 2.

В конкретных вариантах реализации общее количество замен, делеций и добавлений, добавленных для всех CDR, присутствующих в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, составляет от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий один из наборов последовательностей CDR3 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR1 тяжелой цепи, которые перечислены ниже в таблице 1,
причем каждая последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;
при этом каждая последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и
при этом каждая последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот:

Таблица 1: Наборы последовательностей CDR тяжелой цепи, подходящих для применения в антителах или их фрагментах в настоящем изобретении

Символ набора тяжелой цепи	Последовательность CDR3	Последовательность CDR2	Последовательность CDR1
A	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
B	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
C	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
D	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15
E	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
F	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
G	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
H	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

содержащий один из следующих наборов последовательностей CDR3 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и последовательностей CDR1 легкой цепи, которые перечислены в таблице 2,

причем каждая последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом каждая последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

при этом каждая последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот:

Таблица 2: Наборы последовательностей CDR легкой цепи, подходящие для применения в антителах или их фрагментах в настоящем изобретении

Поскольку последовательность легкой цепи CDR2 антитела IFX-1 (SEQ ID NO: 12) идентична последовательности легкой цепи CDR2 антитела INab708 (SEQ ID NO: 13), наборы, включающие SEQ ID NO: 13, будут избыточными для наборов, включающих SEQ ID NO: 12. Таким образом, в таблице только четыре набора последовательностей CDR легкой цепи.

Номер набора легкой цепи	Последовательность CDR3	Последовательность CDR2	Последовательность CDR1
I	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
II	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17
III	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
IV	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий один из наборов A-H тяжелой CDR, перечисленных выше в таблице 1, и один из наборов I-IV CDR легкой цепи, перечисленных выше в таблице 2, то есть в одной из следующих комбинаций наборов: A-I, A-II, A-III, A-IV, B-I, B-II, B-III, B-IV, C-I, C-II, C-III, C-IV, D-I, D-II, D-III, D-IV, E-I, E-II, E-III, E-IV, F-I, F-II, F-III, F-IV, G-I, G-II, G-III,

G-IV, H-I, H-II, H-III, или H-IV (причем комбинации AI и H-IV являются особенно предпочтительными),

причем каждая последовательность CDR3 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом каждая последовательность CDR2 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

при этом каждая последовательность CDR1 тяжелой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

причем каждая последовательность CDR3 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот;

причем каждая последовательность CDR2 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот; и

причем каждая последовательность CDR1 легкой цепи необязательно включает 1, 2 или 3 аминокислотных замены, предпочтительно консервативную аминокислотную замену, 1, 2 или 3 делеции аминокислот и/или 1, 2 или 3 добавления аминокислот.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VH, который существенно состоит или состоит из (i) домена VH IFX-1 или (ii) домена VH INab708.

Последовательности FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, определяющие домены VH IFX-1 и INab708, показаны ниже в таблице 3.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения белковый лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VL, который существенно состоит или состоит из (i) домена VL IFX-1 или (ii) домена VL INab708.

Последовательности FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, определяющие домены VL IFX-1 и INab708, показаны ниже в таблице 3.

Таблица 3: последовательности CDR и FR антител IFX-1 и INab708 (режим классификации Чотиа)

IFX-1:	**INab708:**
Тяжелая цепь:	Тяжелая цепь:
FR1: QVQLQQSGPQLVRГПTSVKIS (= SEQ ID NO: 18)	FR1: VQLLESGAELMKГПASVKIS (SEQ ID NO: 26)
CDR1: CKASGYSFTTFWMD (= SEQ ID NO: 14)	CDR1: CKATGNTFSGYWIE (= SEQ ID NO: 15)
FR2: WVKQRГПQGLEWIGR (SEQ ID NO: 19)	FR2: WVKQRГПHGLEWIGE (SEQ ID NO: 27)
CDR2: IDPSDSESRLDQ (= SEQ ID NO: 10)	CDR2: ILГПSGSTNYNE (= SEQ ID NO: 11)
FR3: RFKDRATLTVDKSSSTVYMQLSSPTSEDSAVYY (SEQ ID NO: 20)	FR3: KFKGKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYY (SEQ ID NO: 28)
CDR3: CARGNDGYYGFAY (= SEQ ID NO: 6)	CDR3: CTRRGLYDGSSYFAY (= SEQ ID NO: 7)
FR4: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)	FR4: WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 29)

Таблица 3 (продолжение)

Легкая цепь:	Легкая цепь:
FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 22)	FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 30)
CDR1: CKASQSVDYDGDSYMK (= SEQ ID NO: 16)	CDR1: CKASQSVDYDGDSYMN (= SEQ ID NO: 17)
FR2: WYQQKГПQPPKLL (SEQ ID NO: 23)	FR2: WYQQKГПQPPKLL (SEQ ID NO: 31)
CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 12)	CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 13)
FR3: QSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYY (SEQ ID NO: 24)	FR3: GSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEVAATYY (SEQ ID NO: 32)
CDR3: CQQSNEDPYT (= SEQ ID NO: 8)	CDR3: CQQNNEDPLT (= SEQ ID NO: 9)
FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25)	FR4: FGAGTLLELK (SEQ ID NO: 33)

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, который специфически связывается с C5, или с C5a, или с рецептором C5a. В других вариантах реализации олигонуклеотид представляет собой аптамер нуклеиновой кислоты. Аптамер нуклеиновой кислоты может быть выбран из группы, состоящей из ДНК-аптамеров, D-РНК-аптамеров и L-РНК-аптамеров (например, Spiegelmers™).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a. В других вариантах реализации указанный ингибитор активности C5a, который снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a, представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из антисмысловой ДНК, антисмысловой РНК, миРНК и микроРНК.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения рецептор C5a выбран из группы, состоящей из C5aR и C5L2. В предпочтительных вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения рецептором C5a является C5aR (также известнен как CD88 или C5aR1).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из:

(a) IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007, или NOX-D21, или их антигенсвязывающего фрагмента;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (a), за связывание с C5a;

(c) Экулизумаба, ALXN1210, ALXN5500, или LFG316, или их антигенсвязывающего фрагмента;

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (c), за связывание с C5;

(e) Коверсина или RA101495;

(f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка или макроциклического пептида, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или макроциклический пептид конкурирует с одним из белков или пептидов, указанными в пункте (e), за связывание с C5;

(g) Зимуры;

(h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или аптамера, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или аптамер конкурируют с зимурой за связывание с C5;

(i) AMY-201 или Мирокоцепта;

(j) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или белок конкурируют с одним из белков, указанных под (i), за связывание с C3b;

(k) Бикациомаба;

(l) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с бикациомабом за связывание с фактором B;

(m) Лампализумаба;

(n) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с лампализумабом за связывание с фактором D;

(o) ALN-CC5; и

(p) Авакопана.

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание представляет собой

- аутовоспалительное заболевание (точнее: кожное, нейтрофильное, аутовоспалительное заболевание); или
- аутоиммунное заболевание с кожным воспалением (точнее: аутоиммунное заболевание с кожным, нейтрофильным воспалением).

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание представляет собой аутовоспалительное заболевание, выбранное из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита;

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание представляет собой ГГ или связанное с ГГ заболевание, выбранное из группы, состоящей из гангренозной

пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); и субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД)

В некоторых вариантах реализации любого аспекта настоящего изобретения кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание с кожным воспалением, выбранным из группы, состоящей из семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

В некоторых вариантах реализации первого или третьего аспекта настоящего изобретения соединение следует вводить в дозе, составляющей 800 мг, один раз в неделю или в дозе, составляющей 800 мг, два раза в неделю. В дополнительных вариантах реализации первого или третьего аспекта,

- ингибитор активности C5a представляет собой соединение, специфически связывающееся с C5a (предпочтительно выбранное из группы, состоящей из IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007, NOX-D21, и их антигенсвязывающего фрагмента; более предпочтительно, ингибитор активности C5a, выбранный из группы, состоящей из IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007 и их антигенсвязывающего фрагмента, еще более предпочтительно, ингибитор активности C5a, выбранный из группы, состоящей из IFX- 1 и его антигенсвязывающего фрагмента, наиболее предпочтительно ингибитор активности C5a представляет собой IFX-1); и
- кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание, являющееся гнойным гидраденитом (ГГ); и
- соединение следует вводить в дозе, составляющей 800 мг, один раз в неделю или в дозе, составляющей 800 мг, два раза в неделю.

В других вариантах реализации первого или третьего аспекта настоящего изобретения ингибитор активности C5a следует вводить внутривенно. В других вариантах реализации первого или третьего аспекта ингибитор активности C5a следует вводить два раза в неделю в дозе, составляющей 800 мг, в первую неделю лечения и один раз в неделю в дозе, составляющей 800 мг, во вторую и последующие недели лечения. В других вариантах реализации первого или третьего аспекта общая продолжительность лечения составляет от 5 до 12 недель (например, 5 недель, 6, недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель).

В некоторых вариантах реализации второго аспекта настоящего изобретения соединение вводят в дозе, составляющей 800 мг, один раз в неделю или в дозе,

составляющей 800 мг, два раза в неделю. В дополнительных вариантах реализации второго аспекта,

- ингибитор активности C5a представляет собой соединение, специфически связывающееся с C5a (предпочтительно выбранное из группы, состоящей из IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007, NOX-D21 и их антигенсвязывающего фрагмента; более предпочтительно, ингибитор активности C5a, выбранный из группы, состоящей из IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007 и их антигенсвязывающего фрагмента, еще более предпочтительно, ингибитор активности C5a, выбранный из группы, состоящей из IFX- 1 и его антигенсвязывающего фрагмента, наиболее предпочтительно ингибитор активности C5a представляет собой IFX-1); и
- кожное, нейтрофильное, воспалительное заболевание представляет собой гнойный гидраденит (ГГ); и
- соединение вводят в дозе, составляющей 800 мг, один раз в неделю или в дозе, составляющей 800 мг, два раза в неделю.

В других вариантах реализации второго аспекта ингибитор активности C5a вводят внутривенно. В других вариантах реализации второго аспекта соединение вводят два раза в неделю в дозе, составляющей 800 мг, в первую неделю лечения и один раз в неделю в дозе, составляющей 800 мг, во вторую и последующие недели лечения. В других вариантах реализации второго аспекта общая продолжительность лечения составляет от 5 до 10 недель (например, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель).

Фармацевтические композиции и способы введения

В практике осуществления любого аспекта настоящего изобретения соединение (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящем документе) или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, можно вводить пациенту любым путем, установленным в данной области, который обеспечивает достаточный уровень соединения у больного. Его можно вводить системно или локально. Такое введение может быть парентеральным, трансмукозальным, например, пероральным, назальным, ректальным, интравагинальным, сублингвальным, подслизистым, трансдермальным или ингаляционным. Предпочтительно введение является парентеральным, например, посредством внутривенной или внутрибрюшинной инъекции, а также включает, но не ограничивается этим, внутриартериальное, внутримышечное, внутрикожное и подкожное введение. Если соединение, описанное в

настоящем документе (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящем документе), или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, вводят локально, его можно вводить непосредственно в орган или ткань, подлежащие лечению.

Фармацевтические композиции, адаптированные для перорального введения, могут быть представлены в виде капсул или таблеток; в виде порошков или гранул; в виде растворов, сиропов или суспензий (в водных или неводных жидкостях); в виде съедобных пен или взбитых смесей; или в виде эмульсий. Таблетки или твердые желатиновые капсулы могут содержать лактозу, крахмал или его производные, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния, стеариновую кислоту или их соли. Мягкие желатиновые капсулы могут содержать растительные масла, воски, жиры, полутвердые или жидкие полиолы и т.д. Растворы и сиропы могут содержать воду, полиолы и сахара.

Активный агент, предназначенный для перорального введения, может быть покрыт или смешан с материалом, который задерживает распад и/или абсорбцию активного агента в желудочно-кишечном тракте (например, может использоваться глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат). Таким образом, замедленное высвобождение активного агента может быть достигнуто в течение многих часов, и, если необходимо, активный агент может быть защищен от разложения в желудке. Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть составлены для облегчения высвобождения активного агента в особой части желудочно-кишечного тракта из-за специфического pH или ферментативных условий.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут быть предоставлены в виде отдельных пластырей, предназначенных для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения, могут быть представлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Для местного применения на кожу, рот, глаз или другие внешние ткани предпочтительно использовать мазь или крем. Если приготовление представлено в виде мази, активный ингредиент можно использовать с парафиновой или с водорастворимой основой. Альтернативно, активный ингредиент может быть приготовлен в виде крема на основе «масло-в-воде» или на основе «вода-в-масле». Фармацевтические композиции, адаптированные для местного введения в глаз, включают глазные капли. В этих композициях активный ингредиент может быть растворен или суспендирован в подходящем носителе, например

в водном растворителе. Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения во рту, включают таблетки, пастилки и жидкости для полоскания рта.

Фармацевтические композиции, адаптированные для назального введения, могут содержать твердые носители, такие как порошки (предпочтительно с размером частиц, составляющем диапазон от 20 до 500 микрон). Порошки могут быть введены способом, которым принимается нюхательный табак, то есть путем быстрого вдыхания через нос из контейнера с порошком, удерживаемого близко к носу. Альтернативно, композиции, принятые для назального введения, могут содержать жидкие носители, например, назальные спреи или назальные капли. Эти композиции могут содержать водные или масляные растворы активного ингредиента. Композиции для введения путем ингаляции могут поставляться в специально приспособленных устройствах, включая, но не ограничиваясь этим, аэрозоли под давлением, небулайзеры или инсуффляторы, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы обеспечить заданные дозы активного ингредиента. Фармацевтические композиции могут также вводиться через носовую полость в легкие.

Фармацевтические композиции, предназначенные для ректального введения, могут быть предоставлены в виде суппозиториев или клизм. Фармацевтические композиции, адаптированные для вагинального введения, могут быть представлены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев.

Фармацевтические композиции, адаптированные для парентерального введения, включают в себя водные и неводные стерильные инъекционные растворы или суспензии, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают композиции в значительной степени изотоническими с кровью предполагаемого реципиента. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких композициях, включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Композиции, адаптированные для парентерального введения, могут быть представлены в контейнерах с однократными или многократными дозами, например, в запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в условиях сухой заморозки (лиофилизированных условиях), требующих только добавления стерильного жидкого носителя, например, стерильного физиологического раствора для инъекций, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

В предпочтительном варианте реализации соединение, описанное в настоящем документе (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящем документе), готовят в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в смешанном виде в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда композицию следует вводить инфузией, можно использовать флакон для инфузии, содержащий стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Когда композицию вводят инъекцией, может быть предоставлена ампула стерильного физиологического раствора, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

В другом варианте реализации, например, соединение (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящем документе) или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Например, соединение может быть введено с использованием внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте реализации может использоваться насос (см. Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* **14**: 201; Buchwald et al. (1980) *Surgery* **88**:507; Saudek et al. (1989) *N. Eng. J. Med.* **321**: 574). В другом варианте реализации соединение может быть доставлено в везикуле, в частности в липосоме. (см. Langer (1990) *Science* **249**:1527-1533; Treat et al. (1989) in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., 353-365; WO 91/04014; U.S. 4,704,355). В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы (см. Medical Applications of Controlled Release (1974) Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Fla.; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, (1984) Smolen and Ball (eds.), Wiley: N.Y.; Ranger and Peppas (1953) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. **23**: 61; see also Levy et al. (1985) *Science* **228**:190; During et al. (1989) *Ann. Neurol.* **25**: 351; Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* **71**: 105).

В еще одном варианте реализации система контролируемого высвобождения может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, то есть клеток-мишеней, ткани или органа, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson (1984) 115-138 in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, *Science* **249**: 1527-1533).

В конкретном варианте реализации может быть желательным вводить соединение, описанное в настоящем документе (например, ингибитор активности C5a, описанный в настоящем документе), или фармацевтическую композицию, содержащую соединение, локально в область, нуждающуюся в лечении. Это может быть достигнуто, например, без ограничения, локальной инфузией во время операции, местным применением, например, в сочетании с повязкой на рану после операции, с помощью инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория, или с помощью имплантата, причем указанный имплантат выполнен из пористого, непористого или желатинового материала, включая мембраны, такие как эластичные мембраны или волокна.

Выбор предпочтительной эффективной дозы будет определяться специалистом в данной области на основе рассмотрения нескольких факторов, которые будут известны специалисту в данной области. Такие факторы включают конкретную форму фармацевтической композиции, например, полипептид или вектор и его фармакокинетические параметры, такие как биологическая доступность, метаболизм, период полураспада и т. д., которые будут установлены в ходе обычных процедур разработки, обычно используемых при получении одобрения контролирующих органов для фармацевтического соединения. Дополнительные факторы при рассмотрении дозы включают состояние или заболевание, которое необходимо предотвратить и/или лечить, или благоприятное действие, которое необходимо достичь у нормального человека, массу тела пациента, способ введения, является ли введение острым или хроническим, сопутствующие лекарственные средства, и другие хорошо известные факторы, влияющие на эффективность вводимых фармацевтических агентов. Таким образом, точная дозировка должна определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента, например, в зависимости от состояния и иммунного статуса отдельного пациента, в соответствии со стандартными клиническими методиками.

Примеры

Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения. Тем не менее, настоящее изобретение не ограничивается ими, и следующие примеры только демонстрируют осуществимость изобретения на основе приведенного выше описания.

1. СПОСОБЫ

1.1 Приготовление исходного раствора зимозана А и активированной плазмы

Зимозан А растворяли до 2 мг/мл в 50 мл стерильного физиологического раствора и кипятили в течение 1 ч при 100 ° С. После центрифугирования супернатант сливали и осадок ресуспендировали в 50 мл стерильного физиологического раствора. После второй стадии центрифугирования осадок ресуспендировали в 5 мл стерильного физиологического раствора с получением 20 мг/мл исходного раствора. Исходный раствор аликвотировали и хранили при -20 ° С до использования. Для активации плазмы исходный раствор зимозана А и 100 мкл плазмы смешивали и инкубировали при 37 ° С в течение 30 мин. После инкубации пробирки центрифугировали и супернатант аликвотировали и хранили при -20 ° С до использования.

1.2 Анализ CD11b с использованием rhC5a или ZAP в качестве стимуляторов

Цельную кровь человека стимулировали rhC5a или ZAP. Для тестирования блокирующей активности IFX-1 и контрольного IgG4 на rhC5a антитела разводили до конечных соотношений Ab/Ag 1:1 и 0,5:1. Чтобы протестировать блокирующую активность IFX-1 на eC5a, IFX-1 разводили до конечного молярного отношения Ab/Ag, составляющего приблизительно 4:1/3:1/2:1/1:1/0.5:1. Кровь только с буфером служила контролем нестимуляции для оценки базовой экспрессии CD11b. Одно антитело использовали для определения воздействия антитела на нестимулированную кровь человека. Полную смесь (Ab/Ag/кровь) инкубировали при 37 ° С в течение 20 минут для стимуляции C5a-индуцированной повышенной регуляции CD11b, и добавляли анти-мышиный CD11b:FITC и инкубировали образцы в течение 30 минут на льду для минимизации окрашивание фона. Гранулоциты подвергали распределению и отбирали клетки, дающие среднюю интенсивность флуоресценции (от англ. mean fluorescence intensity, MFI) меченных FITC (экспрессирующих CD11b) гранулоцитов и исследовали с помощью проточного цитометра.

1.3 Анализ CD11b с использованием rhC5a или зимозана А в цельной крови

Кровь человека стимулировали rhC5a или зимозаном A, и полную смесь (Ab/Ag/кровь) инкубировали при 37 ° C в течение 20 минут, чтобы стимулировать C5a-индуцированную повышающую регуляцию CD11b. После инкубации добавляли 2 мкл анти-мышиного CD11b:FITC или контроля изотипа и образцы инкубировали в течение 30 минут на льду, чтобы минимизировать фоновое окрашивание. После лизиса клетки анализировали с помощью проточного цитометра. На FSC/SSC гранулоциты подвергали распределению и определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) меченных FITC (экспрессирующих CD11b) гранулоцитов для всего набора образцов.

1.4 Анализ цитокина IL-8 с помощью метода ELISA

Анализ ELISA человеческого IL-8 проводили, как рекомендовано в руководстве по эксплуатации в разделе «Процедура анализа» (eBioscience Inc., Сан Диего, Калифорния). Кратко, нанесение покрытия проводили в течение ночи при 4 ° C с использованием 100 мкл 1x захватывающего антитела. Планшеты блокировали с использованием 200 мкл 1x аналитических разбавителей при комнатной температуре в течение 1 часа. Стандартные исходные растворы разбавляли 1-кратными разбавителями для анализа до желаемой концентрации, а затем 6 серийными разведениями 1:2. Образцы супернатантов разводили по мере необходимости в 1x аналитических разбавителях. В соответствии с «процедурой анализа», 100 мкл стандартных разведений и разведений образцов добавляли в планшет с покрытием и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с последующей инкубацией с 100 мкл 1x детектирующих антител (при комнатной температуре, 1 ч) и 100 мкл 1x авидина-HRP (при комнатной температуре, 30 мин). Развитие окраски проводили с помощью 100 мкл раствора субстрата TMB при комнатной температуре в течение 10 минут в темноте и останавливали с помощью 100 мкл стоп-раствора. Абсорбцию считывали в течение 30 минут с использованием планшетного ридера при 450 нм. Нулевое стандартное значение (пустое) было вычтено из всех стандартов и образцов. Концентрацию цитокинов в образцах рассчитывали, используя стандартную кривую log (x)/log (y) включенных стандартных образцов.

1.5 Анализ C5a с помощью метода ELISA

Захваченное антитело, очищенное моноклональное антитело против C5a человека (InflaRx GmbH, Йена, Германия), покрывали в течение ночи с конечной концентрацией 0,5 мкг/мл на планшете для ELISA. После блокирования калибровочные образцы (рекомбинантный C5a человека, Sigma, Тауфкирхен, Германия) и образцы, разведенные

в аналитическом разбавителе (1x PBS, 0,05% Tween20, 2% инактивированной нагреванием FBS), инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре. Мышиный клон 561 антитела против человеческого C5/C5a (Hycult Biotech, Уден, Нидерланды), разведенный до 2 мкг/мл в разбавителе для анализа, применяли в качестве первичного детектирующего антитела для 60-минутного этапа инкубации при комнатной температуре, а затем проводили 30-минутную инкубацию с меченным вторичной антителом – пероксидазой хрена (поликлональное антитело козы против мышиных IgG2a, SouthernBiotech, Бирмингем, США), разбавленным до 0,05 мкг/мл в разбавителе для анализа. Развитие окраски проводили с использованием раствора субстрата тетраметилбензидина (TMB, Biozol, Эхинг, Германия) и останавливали с помощью 3,7 н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при поглощении 450 нм с помощью считывателя Tecan Infinite® 200 и Tecan Magellan™ (Tecan Group, Меннедорф, Швейцария). ELISA C5a, разработанный внутри компании, был утвержден в соответствии с рекомендациями EMA по проверке биоаналитического метода.

Точность параллельных определений внутри одного анализа и результатов разных анализов, протестированных с пятью различными концентрациями, показал коэффициент вариации (от англ. coefficient of variance, CV), составляющий от 0,65% до 4,96% и от 1,50% до 4,88% для шести и 18 повторений соответственно. Анализ восстановления добавленного рекомбинантного человеческого C5a в буфере привел к восстановлениям 86,98 ± 1,20% (среднее значение ± стандартное отклонение (CO)) при нижнем пределе количественного определения и 91,50 ± 3,29% при верхнем пределе количественного определения. Никакой перекрестной реактивности для C3, C3a и C4 и перекрестной реактивности <0,01% для C5b-6 не обнаружено. Антитела IgG4 человека не влияли на анализ. Уровень C5a у 20 добровольцев-людей в цитратной плазме составляет 17,08 нг/мл ± 6,96 нг/мл в диапазоне от 7,52 нг/мл до 30,17 нг/мл. Не было обнаружено различий для измерений C5a и C5a-desArg с использованием данного метода ELISA.

1.6 Измерения продуктов активации комплемента

Концентрации продуктов активации комплемента C3a, C5a и мембраноатакующего комплекса C5b-9 измеряли методом ELISA. ELISA C3a (набор BD OptEIA™ C3a человека для ELISA, BD Bioscience, Германия) проводили в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию C5b-9 определяли с помощью ELISA C5b-9, подтвержденного InflaRx, на основе набора BD OptEIA™ (BD Bioscience) C5b-9

человека для ELISA. Концентрация C5a измерялась с помощью одного ELISA C5a, установленного и подтвержденного InflaRx, описанным выше.

1.7 Статистический анализ

Все результаты были выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистические различия между группами после базовой коррекции были рассчитаны методом One-Way-ANOVA, включая критерий множественного сравнения Тьюки или t-критерий Стьюдента для двух групп. Уровень значимости p, составляющий 0,05 использовался в расчете, для определения, были ли какие-либо существенные различия между любыми двумя группами. Создание графиков и статистический анализ выполнялись с помощью GraphPad PRISM® V6.05 (CA, США).

2. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ РЕЛЕВАНТНЫЕ ДАННЫЕ

2.1 C5a активация нейтрофилов и блокирующий эффект IFX-1

Поскольку повышенная регуляция CD11b является отличительным признаком и чувствительным маркером активации нейтрофилов, уровни CD11b в нейтрофилах были использованы для оценки активации нейтрофилов. Модель цельной крови человека была использована для оценки блокирующей активности IFX-1 в отношении рекомбинантного человеческого C5a в настоящем исследовании. Цельную кровь человека инкубировали с буфером, одним антителом, одним rhC5a или комбинациями различных концентраций антител и rhC5a. После инкубации клетки окрашивали анти-мышиным CD11b:FITC и CD11b MFI анализировали с помощью проточной цитометрии на уровни активации нейтрофилов крови. Как показано на **фигуре 1**, рекомбинантный человеческий C5a сильно стимулирует повышенную регуляцию CD11b на человеческих нейтрофилах. Данный эффект может быть полностью блокирован в присутствии антитела IFX-1 против человеческого C5a. Данное ингибирование является высокоспецифичным, и неспецифическое человеческое антитело IgG4 не проявляло какой-либо блокирующей активности.

В качестве источника эндогенного C5a (eC5a) для стимуляции нейтрофилов крови использовали активированную зимозаном плазму (ZAP) от разных доноров. Количество выработки eC5a в крови после стимуляции ZAP измеряли с помощью коммерческого C5a-ELISA. Данные, представленные здесь (**фигура 2**), указывают на то, что стимуляция цельной крови eC5a при помощи ZAP повышенную регуляцию CD11b, сравнимую с индуцированной rhC5a повышенной регуляцией CD11b. Присутствие IFX-1 значительно

снижало экспрессию CD11b на нейтрофилах человека даже при молярном соотношении Ab:Ag 0,5:1. Общая блокирующая активность IFX-1 к ZAP-индуцированной повышающей регуляции CD11b составляла от 100% до 82% в зависимости от соотношения Ab:Ag. Несмотря на то, что высокий уровень eC3a и других продуктов активации комплемента ZAP присутствует в ZAP, IFX-1 может блокировать повышенную регуляцию CD11b до 100%. Следовательно, можно сделать вывод, что eC5a является единственным источником активации нейтрофилов при стимуляции ZAP, и IFX-1 может полностью блокировать его.

2.2 Блокировка C5a ослабляет вызванные зимозаном воспалительные реакции в цельной крови человека

Зимозан A, как активный компонент стенки гриба, может вызывать сильные воспалительные реакции в цельной крови, что характеризуется активацией нейтрофилов и повышенным уровнем цитокинов и хемокинов. В этом исследовании в цельную кровь человека добавляли зимозан A в присутствии или в отсутствие IFX-1, а CD11b в нейтрофилах крови измеряли методом проточной цитометрии. Как показано на **фигуре 3**, в нейтрофилах крови сильно повышается регуляция CD11b, когда зимозан добавлен в цельную кровь человека. Увеличение экспрессии CD11b при стимуляции зимозаном может быть подавлено на 79-93% в зависимости от концентрации добавленного IFX-1. В качестве положительного контроля повышенная регуляция CD11b, стимулированная rhC5a, была блокирована на 100% IFX-1. Таким образом, можно утверждать, что повышенная регуляция CD11b на нейтрофилах крови при стимуляции зимозаном A вызвана, главным образом, eC5a. Кроме того, можно сделать вывод, что eC5a, однажды созданный зимозаном A в цельной крови, сначала связывается с IFX-1, блокируя тем самым его доступ к природным рецепторам.

В той же экспериментальной установке уровни IL-8 были также измерены и использованы для оценки воспалительного ответа. Концентрации IL-8 после различных доз стимуляции зимозаном A варьировали в диапазоне от 458 пг/мл до 3218 пг/мл в отсутствие IFX-1. Как показано на **фигуре 4**, присутствие IFX-1 значительно снижало выработку IL-8 при стимуляции различными концентрациями зимозана A, и наблюдалась степень снижения до 54%. Таким образом, в цельной крови воспалительные реакции, вызванные зимозаном, в значительной степени зависят от присутствия C5a.

3. КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЛЕВАНТНЫЕ ДАННЫЕ

3.1 ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

3.1.1 Активация комплемента у пациентов, страдающих ГГ

В исследование были включены 54 пациента, страдающих ГГ, и 14 здоровых добровольцев. Пациенты находятся под наблюдением в амбулаторном отделении иммунологии инфекционных заболеваний больницы университета ATTIKON, Греция. Исследование было одобрено Комитетом по этике больницы. Письменное информированное согласие было предоставлено всеми пациентами. Диагноз ГГ основывался на следующих критериях: a) начало в раннем возрасте после полового созревания; b) наличие подкожных узелков в участках кожи, богатых апокринными железами; и c) совместимая история повторного дренирования гноя из пораженных участков.

Концентрации факторов комплемента C3a и C5a, а также мембраноатакующего комплекса sC5b-9 в кровотоке определяли в плазме 54 пациентов и 14 здоровых контрольных субъектов, а также в гное семи пациентов. Как показано на **фигуре 5**, циркулирующий C5a был значительно выше в плазме пациентов, чем в контрольной плазме ($P<0,01$), и различия в C3a и C5b-9 между пациентами и контрольной группой имели одинаковое значение. Поэтому можно сделать вывод, что системная активация комплемента происходит в ГГ. Учитывая важную роль активации комплемента во врожденном и адаптивном иммунитете, авторы изобретения предположили, что нацеливание активации комплемента может быть новой терапевтической стратегией для лечения ГГ.

Однако из приведенных выше результатов неясно, какой из C3a, C5a или C5-9b или других продуктов активации комплемента будет наиболее многообещающей мишенью для этой новой терапевтической стратегии, и будет ли этого достаточно для нацеливания только на один из этих факторов или должны ли быть направлены два или более факторов, участвующих в активации комплемента.

3.1.2 Блокирование повышающей регуляции CD11b на нейтрофилах крови, индуцированных плазмой с ГГ

Чтобы определить роль C5a в образце плазмы с ГГ в активации нейтрофилов, образцы плазмы с ГГ с высоким уровнем C5a были выбраны и оценены с использованием модели цельной крови человека. Как показано на **фигуре 6**, в отличие от контрольных образцов плазмы с низкими уровнями C5a (Ctrl008 и Ctrl012), образцы плазмы с ГГ

(pat088 и pat092) с высокими уровнями C5a сильно повышали экспрессию CD11b в нейтрофилах крови. Рекомбинантный C5a человека использовали в качестве положительного контроля, в то время как плазма от здоровых добровольцев была выбрана в качестве отрицательного контроля. Повышение регуляции CD11b, индуцированное плазмой с ГГ, может быть на 100% подавлено IFX-1, что указывает на то, что C5a является наиболее важным активатором в плазме с ГГ для инициации активации нейтрофилов. Из этих новых результатов авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что блокировка C5a у пациентов с ГГ достаточна для сильного подавления активации нейтрофилов.

3.2 ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.2.1 Схема клинического исследования

Открытое исследование II фазы у 11 пациентов с гнойным гидраденитом средней и тяжелой степени проводилось в отделение внутренней медицины клиники университета ATTIKON, Греция.

Основной целью исследования было изучение безопасности и переносимости IFX-1, вводимого в течение 8 недель. Вторичными целями исследования были оценка фармакокинетики и фармакодинамики IFX-1, а также получение предварительных данных об эффективности IFX-1 на клинических результатах (например, клинический ответ гнойного гидраденита (HiSCR), дерматологический индекс качества жизни (от англ. Dermatology Life Quality Index, DLQI), визуальная аналоговая шкала (от англ. Visual Analogue Scale, VAS) для статуса заболевания, визуальная аналоговая шкала для боли, общая врачебная оценка для гнойного гидраденита (от англ. physician global assessment for hidradenitis suppurativa, HS-PGA), модифицированная Сарториус оценка), чтобы составлять дальнейшие гипотезы. Зарегистрированные пациенты получали лечение, составляющее 800 мг IFX-1, дважды в течение первой недели и один раз в неделю в течение всего 8-недельного курса лечения; т.е. IFX-1 вводили в девяти дозах, составляющих по 800 мг IFX-1 внутривенно в дни 1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50. Все пациенты находились под наблюдением в течение 12 дополнительных недель.

Критерии включения при скрининге:

1. Пациенты мужского или женского пола ≥ 18 лет
2. Письменное информированное согласие
3. ГГ диагностирован не менее 1 года

4. Поражения ГГ по крайней мере в двух различных анатомических областях, одна из которых - II или III стадия Херли
5. Общее количество абсцессов и узелков (от англ. abscesses and nodules, AN) ≥ 3
6. Пациенты с первичным или вторичным неудачным лечением биологическими препаратами или не имеющие права на лечение другими биологическими препаратами

   ПРИМЕЧАНИЕ: первичный отказ определяется как минимум 12-недельное лечение биологическим соединением без эффекта, а вторичный отказ - как достижение первоначального ответа после как минимум 12-недельного лечения биологическим соединением с последующим рецидивом
7. Неудачные предыдущие антимикробные лечения.

Критерии исключения при скрининге:

1. Масса тела выше 150 кг или масса тела ниже 60 кг
2. Имеет количество дренирующих свищей более 30 на исходном уровне
3. Хирургическое лечение планируется в течение следующих 24 недель
4. Возникновение обострения ГГ, приводящее к внутривенному противомикробному лечению в течение последних 14 дней
5. Любое другое заболевание и состояние, которое может помешать оценке продукта исследования, оценке результатов или удовлетворительному проведению исследования
   a) Активная инфекция
   b) Тяжелая застойная сердечная недостаточность (т.е., класс NYHA (англ. New York Heart Association) IV)
   c) Депрессия
   d) Системная красная волчанка или ревматоидный артрит в анамнезе
   e) Любое иммунодефицитное заболевание
   f) Активная гематологическая или плотная злокачественная опухоль
   g) Пациенты не должны иметь каких-либо других активных кожных заболеваний или состояний (например, бактериальной, грибковой или вирусной инфекции), которые могли бы помешать оценке ГГ.
6. Один из следующих аномальных лабораторных результатов
   a) Количество белых клеток крови < 2500/мм^3

b) Количество нейтрофилов < 1000/мм^3

c) Креатинин сыворотки крови > 3 x верхнего нормального предела (от англ. Upper Normal Limit, UNL)

d) Билирубин общий > 2 x UNL

e) Аланинаминотрансфераза (АЛТ) > 2x UNL

f) положительный скрининг-тест на гепатит B, гепатит C или ВИЧ 1/2

7. Предварительное введение любого биологического соединения за последние 3 месяца
8. Потребление кортикостероидов, определяемое как потребляемая суточная доза преднизона или эквивалентная более 1 мг/кг за последние три недели;
9. Прием иммунодепрессантов в течение последних 30 дней (например, циклоспорин, такролимус)
10. Общие критерии исключения

a) Беременные (у женщин с детородным потенциалом должен проводиться тест мочи на беременность) или кормящие женщины

b) Женщины с детородным потенциалом (определяемые как в течение двух лет после последней менструации), не желающие применять соответствующие меры контрацепции (например, импланон, инъекции, оральные контрацептивы, внутриматочные устройства, вазэктомия партнера, воздержание) во время участия в исследовании

c) Участие в любых хирургических клинических испытаниях в течение последних трех месяцев

d) Известное внутривенное употребление наркотиков

e) Сотрудник на месте исследования, супруг/партнер или родственник любого участвующего в проведении исследования сотрудника (например, исследователь, младший исследователь или медицинская сестра-исследователь) или связанный с исследованием спонсор.

3.2.2 Результаты клинических испытаний

IFX-1 хорошо переносится пациентами с ГГ. За период лечения не было зарегистрировано серьезных побочных эффектов, связанных с приемом лекарственных стредств.

Обычно используется параметр эффективности в шкале клинического ответа гнойного гидраденита (HiSCR). HiSCR определяется состоянием трех типов поражений

(определяющих критериев): абсцессы (колеблющиеся, с дренажем или без него, болезненные или безболезненные), воспалительные узелки (болезненные, эритематозные, гнойные поражения гранулемы) и дренирующие свищи (свищевые ходы, с сообщениями на поверхность кожи, сливы гнойной жидкости). Предложенное определение реагирующих на лечение (достищения HiSCR): (i) по меньшей мере 50-процентное снижение AN, (ii) отсутствие увеличения числа абсцессов и (iii) отсутствие увеличения дренирующих свищей от исходного уровня. HiSCR недавно был подтвержден как чувствительный и клинически значимый ожидаемый результат воспалительного проявления ГГ (Kimball и др., 2014).

Ответ HiSCR в течение периода лечения, длившегося 8 недель, был изучен в настоящем исследовании, и у 8 из 11 пациентов, уже получивших лечение до 56-го дня, получен ответ, который представляет собой частоту ответа, составляющую 72,7% и 95% доверительный интервал которой составляет от 43% до 91%. Чтобы сравнить эти результаты с ретроспективными данными, был проведен литературный поиск для выявления плацебо-контролируемых клинических исследований, в которых HiSCR использовался в качестве параметра эффективности. В следующей таблице 4 приведены результаты пяти исследований, которые были завершены недавно.

Таблица 4

Соединение	**N**	**Плацебо-респондент n (%)**	**Комментарий**
Адалимумаб[1]	13	2 (15%)	Вторичный анализ фазы II исследования. Только подгруппа пациентов с Херли III
Адалимумаб [1]	70	15 (21%)	Исследование 313, подгруппа пациентов с Херли III
Адалимумаб [1]	76	13 (17%)	Исследование 810, подгруппа пациентов с Херли III
Анакинра [2]	10	3 (30%)	Все пациенты. 6 из 10 пациентов имели Херли III
MABp1[3]	10	1 (10%)	Неэффективность лечения анти-ФНОа

[1] Humira EMA assessment report http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000481/WC500195564.pdf

[2] Anakinra Study (Tzanetakou и др., 2016).

[3] Пресс-релиз от XBiotech:
(http://investors.xbiotech.com/phoenix.zhtml?c=253990&p=irol-newsArticle&ID=2246777)

В общей сложности 179 пациентов прошли лечение в группе плацебо в настоящем исследовании с частотой ответов, составляющей 19,0% с 95% доверительным интервалом от 14% до 25%. Поскольку оба доверительных интервала (например, пациенты из ретроспективной группы с плацебо и пациенты, получавшие IFX-1) не перекрываются, можно сделать вывод о значительном лечебном эффекте IFX-1.

Фотодокументация пораженных участков подтвердила данные результаты сильно уменьшенным воспалением на коже, о чем свидетельствует визуальное уменьшение воспалительного отека и покраснения после лечения.

Таким образом, анти-C5a представляет собой мощный противовоспалительный агент в условиях заболевания ГГ. Эти клинические данные показывают, что блокировка C5a очень эффективна для уменьшения активации нейтрофилов, и таким образом можно обеспечить эффективное облегчение кожных нейтрофильных воспалительных расстройств.

ИСТОЧНИКИ

Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. 2011. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. Int Immunol 23(5):317-326.

Braun-Falco M, Kovnerystyy O, Lohse P, Ruzicka T. 2012. Pyoderma gangrenosum, acne, and suppurative hidradenitis (PASH)--a new autoinflammatory syndrome distinct from PAPA syndrome. J Am Acad Dermatol 66(3):409-415.

Cugno M, Borghi A, Marzano AV. 2017. PAPA, PASH and PAPASH Syndromes: Pathophysiology, Presentation and Treatment. Am J Clin Dermatol.

Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. 1999. Protective effects of C5a blockade in sepsis. Nat Med 5(7):788-792.

Guo RF, Riedemann NC, Sun L, Gao H, Shi KX, Reuben JS, Sarma VJ, Zetoune FS, Ward PA. 2006. Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis. J Immunol 177(2):1306-1313.

Guo RF, Ward PA. 2005. Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol 23:821-852.

Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Younkin EM, Laudes IJ, Riedemann NC, Younger JG and others. 2001. Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. FASEB J 15(3):568-570.

Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA. 2002. Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. J Immunol 169(6):3223-3231.

Jemec GB. 2004. Medical treatment of hidradenitis suppurativa. Expert Opin Pharmacother 5(8):1767-1770.

Jemec GB, Heidenheim M, Nielsen NH. 1996. The prevalence of hidradenitis suppurativa and its potential precursor lesions. J Am Acad Dermatol 35(2 Pt 1):191-194.

Kaplan MJ. 2013. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. Arthritis Res Ther 15(5):219.

Kimball AB, Jemec GB, Yang M, Kageleiry A, Signorovitch JE, Okun MM, Gu Y, Wang K, Mulani P, Sundaram M. 2014. Assessing the validity, responsiveness and meaningfulness of the Hidradenitis Suppurativa Clinical Response (HiSCR) as the clinical endpoint for hidradenitis suppurativa treatment. Br J Dermatol 171(6):1434-1442.

Kurzen H, Kurokawa I, Jemec GB, Emtestam L, Sellheyer K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Nagy I, Bechara FG, Sartorius K, Lapins J and others. 2008. What causes hidradenitis suppurativa? Exp Dermatol 17(5):455-456; discussion 457-472.

Lima AL, Karl I, Giner T, Poppe H, Schmidt M, Presser D, Goebeler M, Bauer B. 2016. Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa. Br J Dermatol 174(3):514-521.

Marzano AV. 2016. Hidradenitis suppurativa, neutrophilic dermatoses and autoinflammation: what's the link? Br J Dermatol 174(3):482-483.

Marzano AV, Ceccherini I, Gattorno M, Fanoni D, Caroli F, Rusmini M, Grossi A, De Simone C, Borghi OM, Meroni PL and others. 2014. Association of pyoderma gangrenosum, acne, and suppurative hidradenitis (PASH) shares genetic and cytokine profiles with other autoinflammatory diseases. Medicine (Baltimore) 93(27):e187.

Nemeth T, Mocsai A. 2012. The role of neutrophils in autoimmune diseases. Immunol Lett 143(1):9-19.

Nemeth T, Mocsai A, Lowell CA. 2016. Neutrophils in animal models of autoimmune disease. Semin Immunol 28(2):174-186.

Pawaria S, Ramani K, Maers K, Liu Y, Kane LP, Levesque MC, Biswas PS. 2014. Complement component C5a permits the coexistence of pathogenic Th17 cells and type I IFN in lupus. J Immunol 193(7):3288-3295.

Prat L, Bouaziz JD, Wallach D, Vignon-Pennamen MD, Bagot M. 2014. Neutrophilic dermatoses as systemic diseases. Clin Dermatol 32(3):376-388.

Revuz J. 2009. Hidradenitis suppurativa. J Eur Acad Dermatol Venereol 23(9):985-998.

Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL and others. 2002. Increased C5a receptor expression in sepsis. J Clin Invest 110(1):101-108.

Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J and others. 2008. Functional roles for C5a receptors in sepsis. Nat Med 14(5):551-557.

Slade DE, Powell BW, Mortimer PS. 2003. Hidradenitis suppurativa: pathogenesis and management. Br J Plast Surg 56(5):451-461.

Strainic MG, Shevach EM, An F, Lin F, Medof ME. 2013. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. Nat Immunol 14(2):162-171.

Tzanetakou V, Kanni T, Giatrakou S, Katoulis A, Papadavid E, Netea MG, Dinarello CA, van der Meer JW, Rigopoulos D, Giamarellos-Bourboulis EJ. 2016. Safety and Efficacy of Anakinra in Severe Hidradenitis Suppurativa: A Randomized Clinical Trial. JAMA Dermatol 152(1):52-59.

Ward PA. 2009. Functions of C5a receptors. J Mol Med (Berl) 87(4):375-378.

Wollina U, Koch A, Heinig B, Kittner T, Nowak A. 2013. Acne inversa (Hidradenitis suppurativa): A review with a focus on pathogenesis and treatment. Indian Dermatol Online J 4(1):2-11.

Xu R, Wang R, Han G, Wang J, Chen G, Wang L, Li X, Guo R, Shen B, Li Y. 2010. Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and gammadelta T cells in CLP-induced sepsis. Eur J Immunol 40(4):1079-1088.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение для применения при лечении кожного нейтрофильного воспалительного заболевания у субъекта, где указанное соединение представляет собой ингибитор активности C5a, и
при этом указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ); нейтрофильного панникулита; семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

2. Соединение для применения по п. 1, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a:
- снижает концентрацию C5;
- ингибирует расщепление C5 на C5a и C5b;
- снижает концентрацию C5a;
- ингибирует связывание C5a с рецептором C5a;
- снижает концентрацию рецептора C5a; и/или
- ингибирует активность рецептора C5a.

3. Соединение для применения по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой белковый лиганд, который специфически связывается с C5, или с C5a, или с рецептором C5a.

4. Соединение для применения по п. 3, отличающееся тем, что указанный белковый лиганд выбран из группы, состоящей из
(i) антител,
(ii) антигенсвязывающих фрагментов антител,
(iii) антителоподобных белков,
(iv) вариантов, ингибирующих C5a,
(v) вариантов, ингибирующих рецептор C5a,

(vi) белков, действующих на путь комплемента; и

(vii) пептидов.

5. Соединение для применения по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, который специфически связывается с C5 или с C5a, или с рецептором C5a.

6. Соединение для применения по п. 5, отличающееся тем, что указанный олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из ДНК-аптамеров, D-РНК-аптамеров и L-РНК-аптамеров.

7. Соединение для применения по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a снижает экспрессию белка C5 или белка рецептора C5a.

8. Соединение для применения по п. 7, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из антисмысловой ДНК, антисмысловой РНК, миРНК и микроРНК.

9. Соединение для применения по любому из пп. 2-8, отличающееся тем, что указанный рецептор C5a выбран из группы, состоящей из C5aR и C5L2.

10. Соединение для применения по любому из пп. 1-9, отличающееся тем, что указанный ингибитор активности C5a выбран из группы, состоящей из:

(a) IFX-1, INab708, MEDI-7814, ALXN-1007, или NOX-D21, или их антигенсвязывающего фрагмента;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (a), за связывание с C5a;

(c) Экулизумаба, ALXN1210, ALXN5500, или LFG316, или их антигенсвязывающего фрагмента;

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с одним из антител, указанных в (c), за связывание с C5;

(e) Коверсина (Coversin) или RA101495;

(f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или белка или макроциклического пептида, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или белок, или макроциклический пептид конкурируют с одним из белков или пептидов, указанных в (e), за связывание с C5;

(g) Зимуры (Zimura);

(h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или аптамера, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или аптамер конкурируют с Зимурой за связывание с C5;

(i) AMY-201 или Мирокоцепта;

(j) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или белок конкурируют с одним из белков, указанных в (i), за связывание с C3b;

(k) Бикациомаба (Bikaciomab);

(l) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с Bikaciomab за связывание с фактором B;

(m)Лампализумаба;

(n) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с Лампализумабом за связывание с фактором D;

(o) ALN-CC5; и

(p) Авакопана.

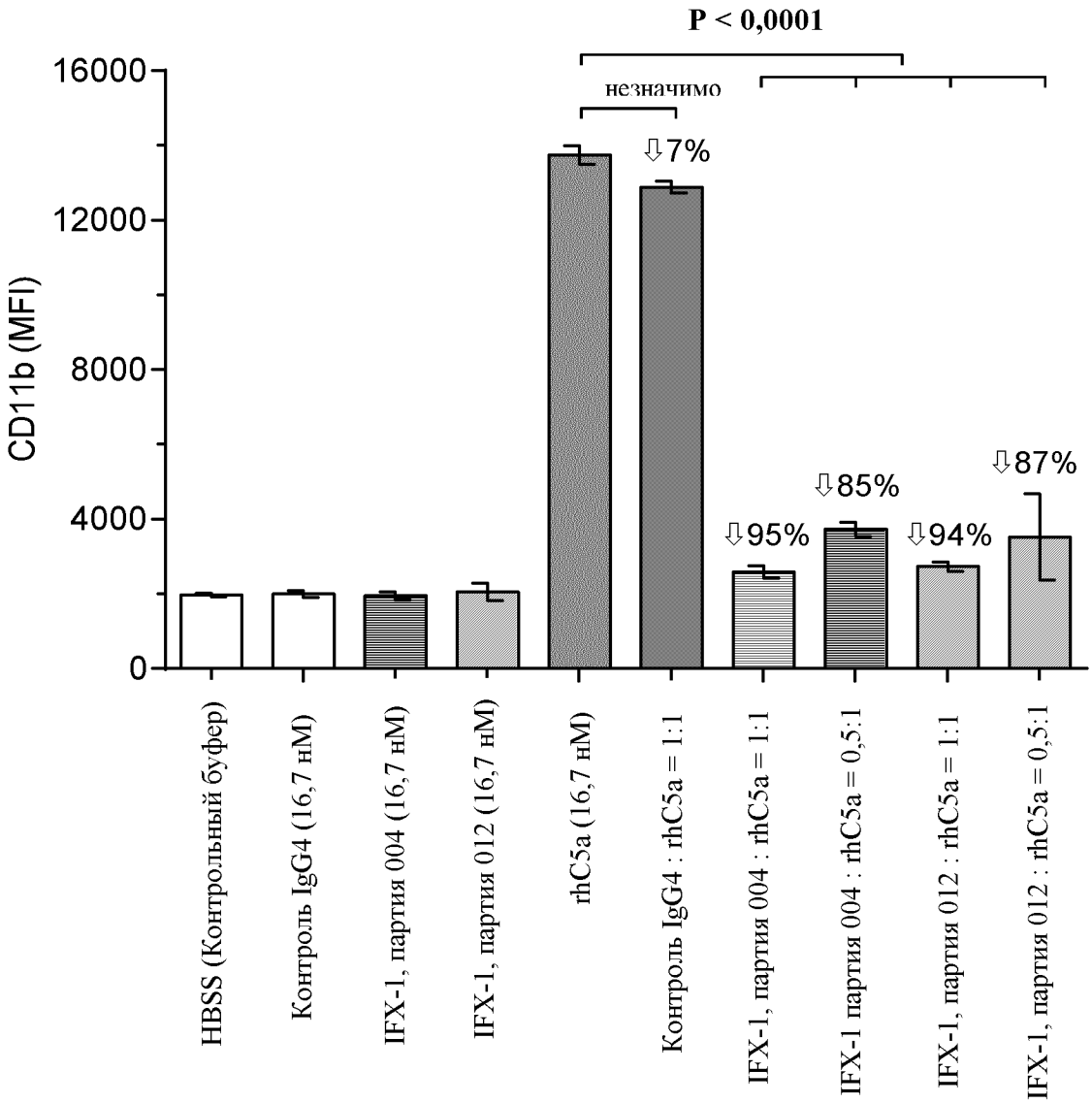
11. Соединение для применения по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание представляет собой аутовоспалительное заболевание, выбранное из группы, состоящей из гнойного гидраденита (ГГ); гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС); субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД); приобретенного буллезного эпидермолиза, стойкой возвышающейся эритемы (СВЭ) и нейтрофильного панникулита.

12. Соединение для применения по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание представляет собой ГГ или связанное с ГГ заболевание, выбранное из группы, состоящей из гангренозной пиодермии (ГП); ПАГА (пиогенного артрита, ГП и акне); ГАГГ (ГП, акне и гнойного гидраденита); ПААГГГ (пиогенного артрита, акне, ГП и гнойного гидраденита); синдрома Свита (СС) и субкорнеального пустулезного дерматоза (СПД).

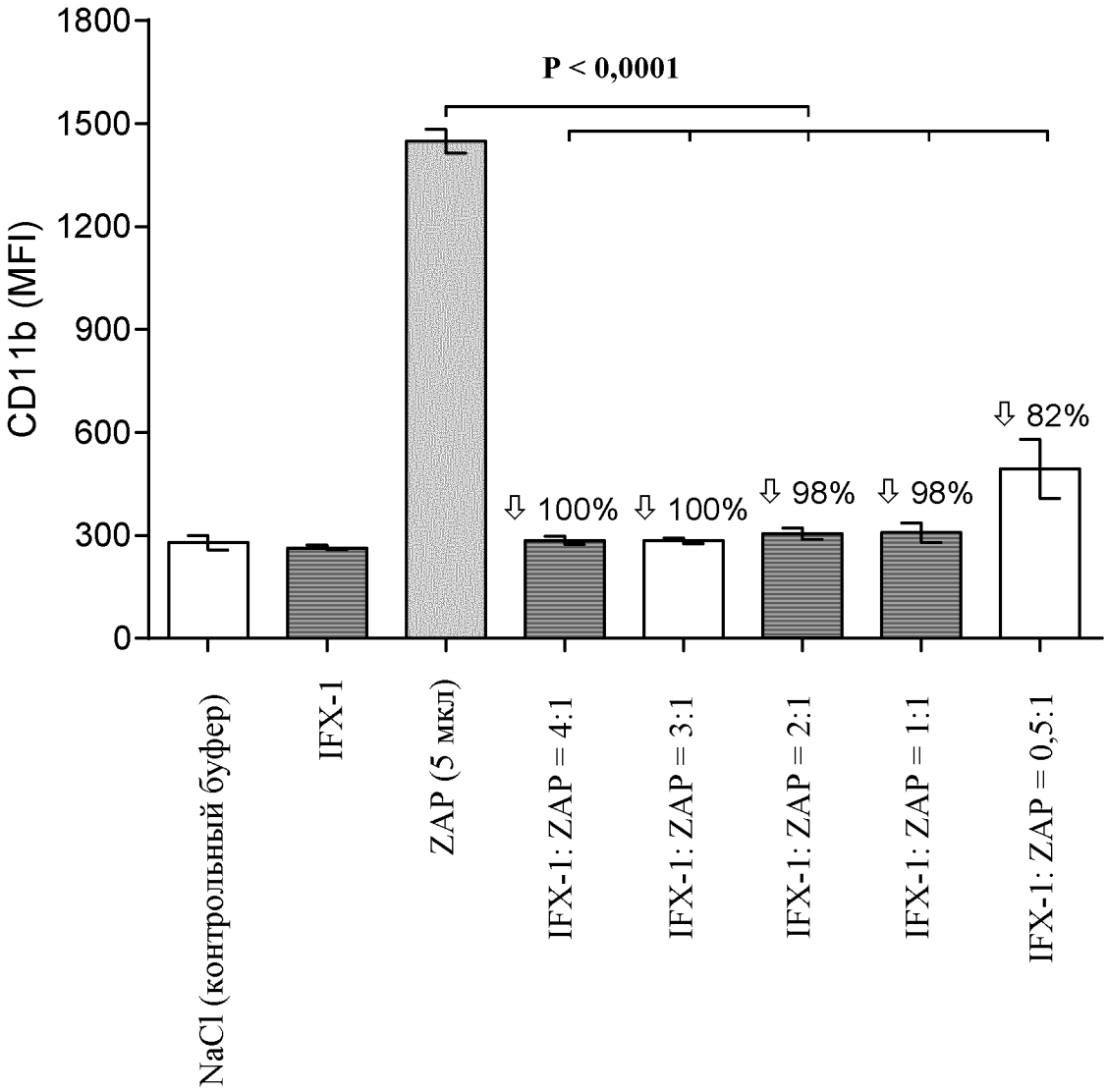
13. Соединение для применения по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что указанное кожное нейтрофильное воспалительное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание с кожным воспалением, выбранное из группы, состоящей из семейной средиземноморской лихорадки, криопирин-ассоциированных расстройств, подагры и синдрома Шницлера.

14. Соединение для применения по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в дозе 800 мг один раз в неделю или в дозе 800 мг два раза в неделю.

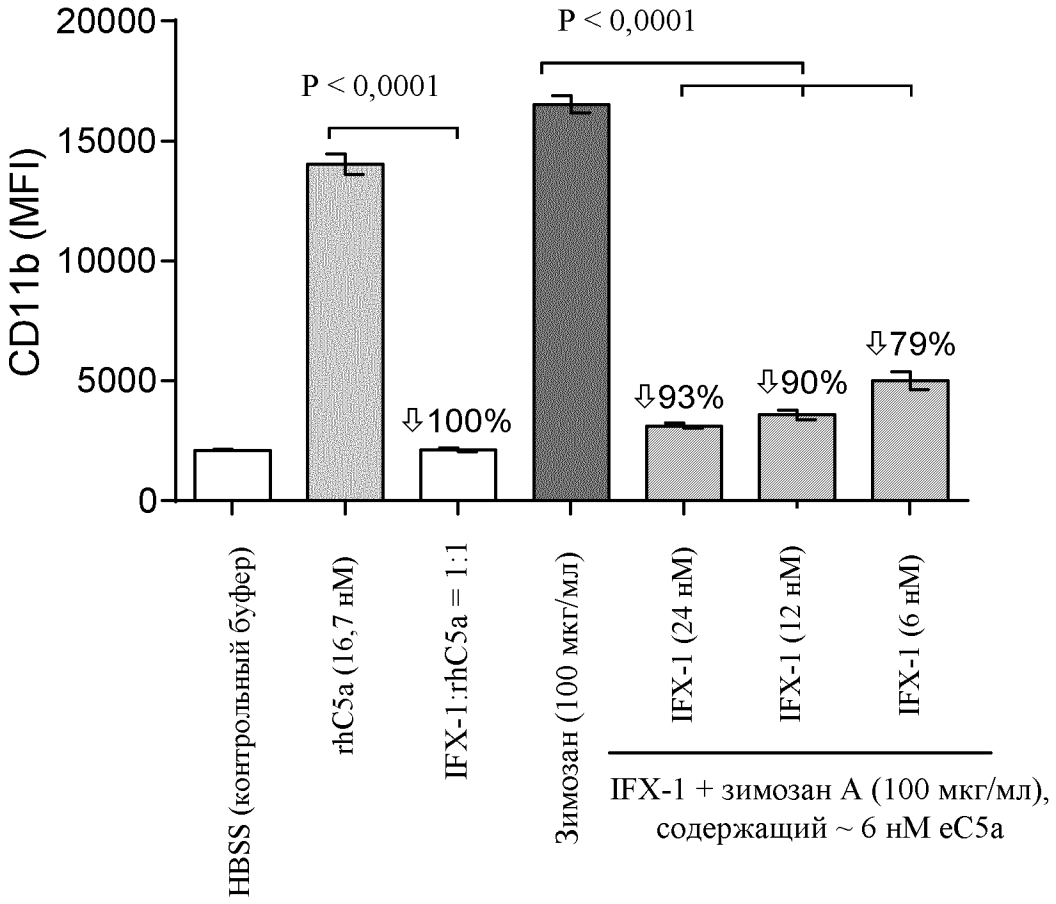
Фиг. 1


P < 0,0001
незначимо
⇩7%
⇩95%
⇩85%
⇩94%
⇩87%
CD11b (MFI)
16000
12000
8000
4000
0
HBSS (Контрольный буфер)
Контроль IgG4 (16,7 нМ)
IFX-1, партия 004 (16,7 нМ)
IFX-1, партия 012 (16,7 нМ)
rhC5a (16,7 нМ)
Контроль IgG4 : rhC5a = 1:1
IFX-1, партия 004 : rhC5a = 1:1
IFX-1 партия 004 : rhC5a = 0,5:1
IFX-1, партия 012 : rhC5a = 1:1
IFX-1, партия 012 : rhC5a = 0,5:1

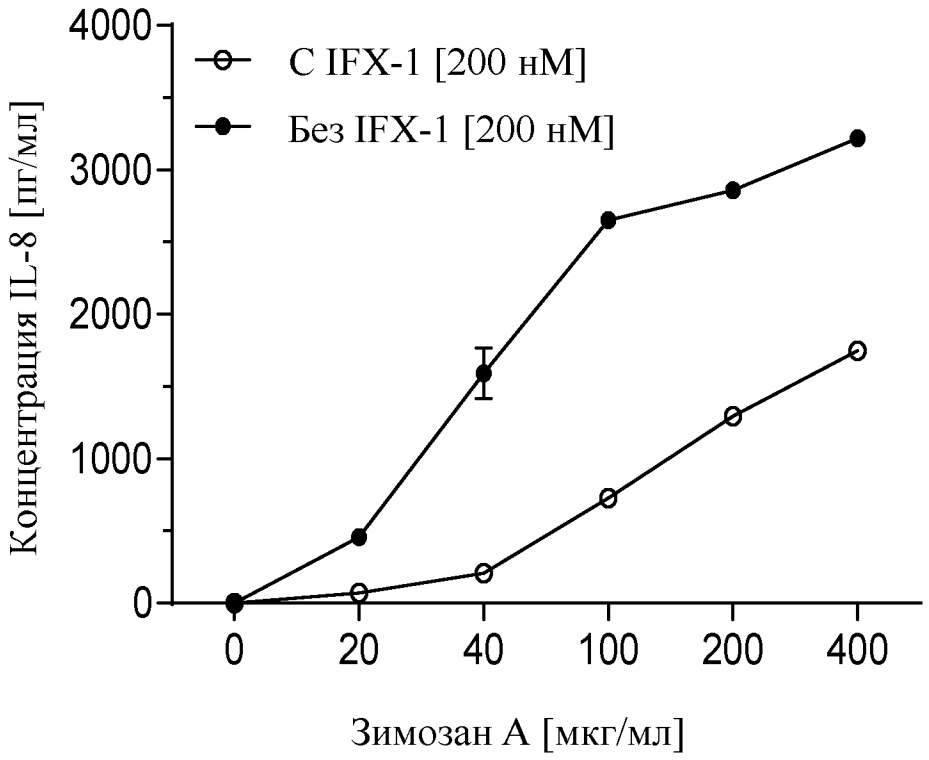
Фиг. 2


1800
1500
1200
900
600
300
0
CD11b (MFI)
P < 0,0001
⇩ 100%
⇩ 100%
⇩ 98%
⇩ 98%
⇩ 82%
NaCl (контрольный буфер)
IFX-1
ZAP (5 мкл)
IFX-1: ZAP = 4:1
IFX-1: ZAP = 3:1
IFX-1: ZAP = 2:1
IFX-1: ZAP = 1:1
IFX-1: ZAP = 0,5:1

Фиг. 3

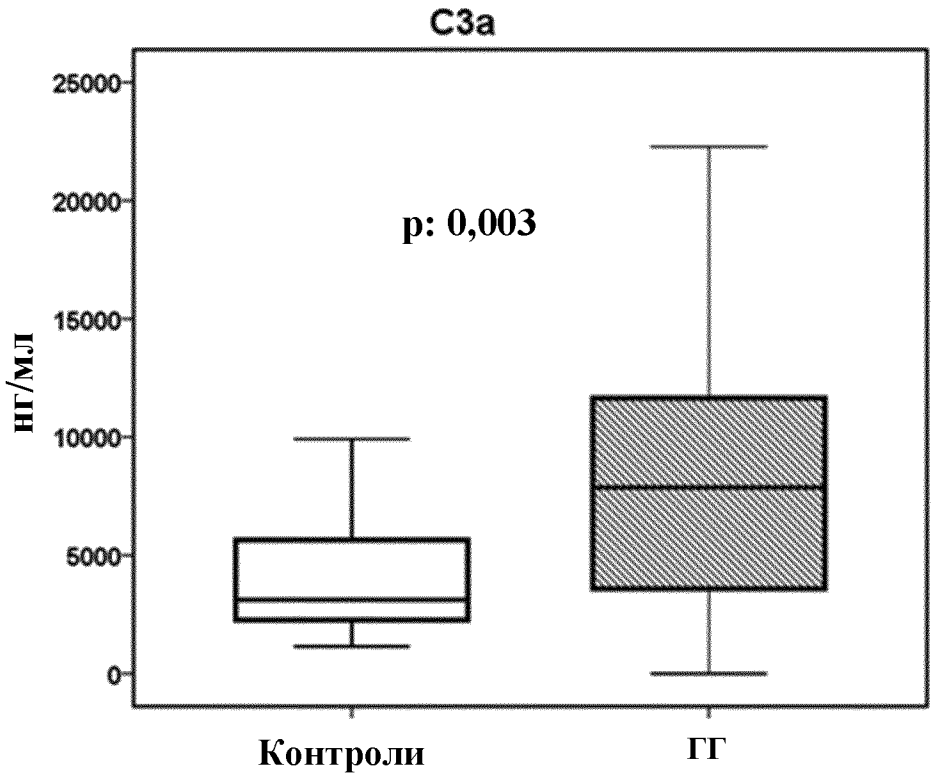

20000
15000
10000
5000
0
CD11b (MFI)
P < 0,0001
P < 0,0001
⇩100%
⇩93%
⇩90%
⇩79%
HBSS (контрольный буфер)
rhC5a (16,7 нМ)
IFX-1:rhC5a = 1:1
Зимозан (100 мкг/мл)
IFX-1 (24 нМ)
IFX-1 (12 нМ)
IFX-1 (6 нМ)
IFX-1 + зимозан А (100 мкг/мл),
содержащий ~ 6 нМ eC5a

Фиг. 4

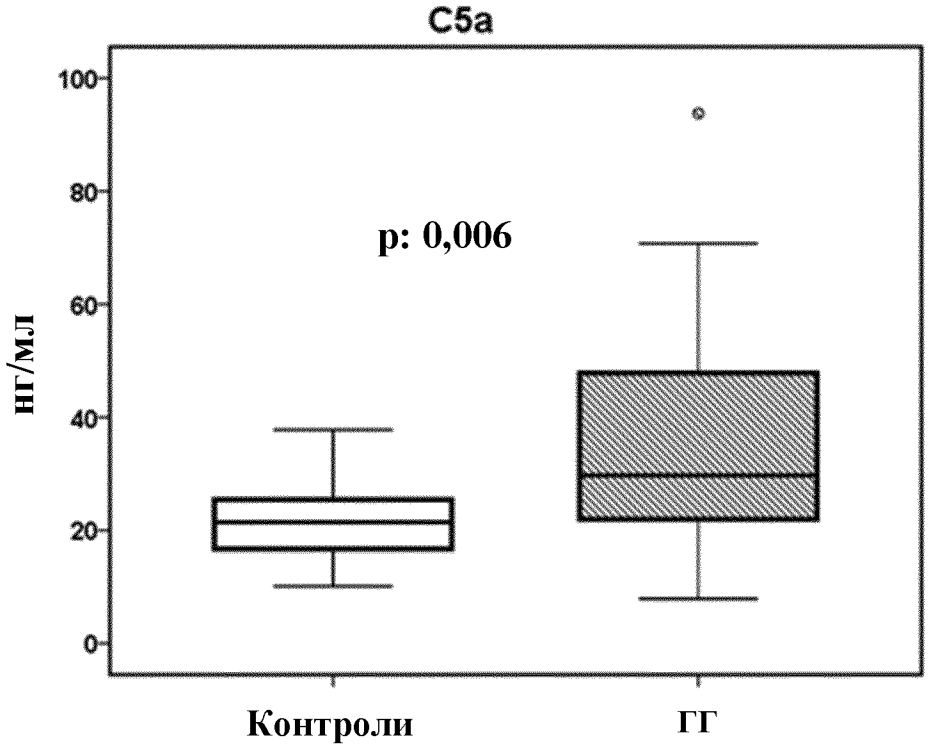

4000
3000
2000
1000
0
С IFX-1 [200 нМ]
Без IFX-1 [200 нМ]
Концентрация IL-8 [пг/мл]
0
20
40
100
200
400
Зимозан А [мкг/мл]

Фиг. 5

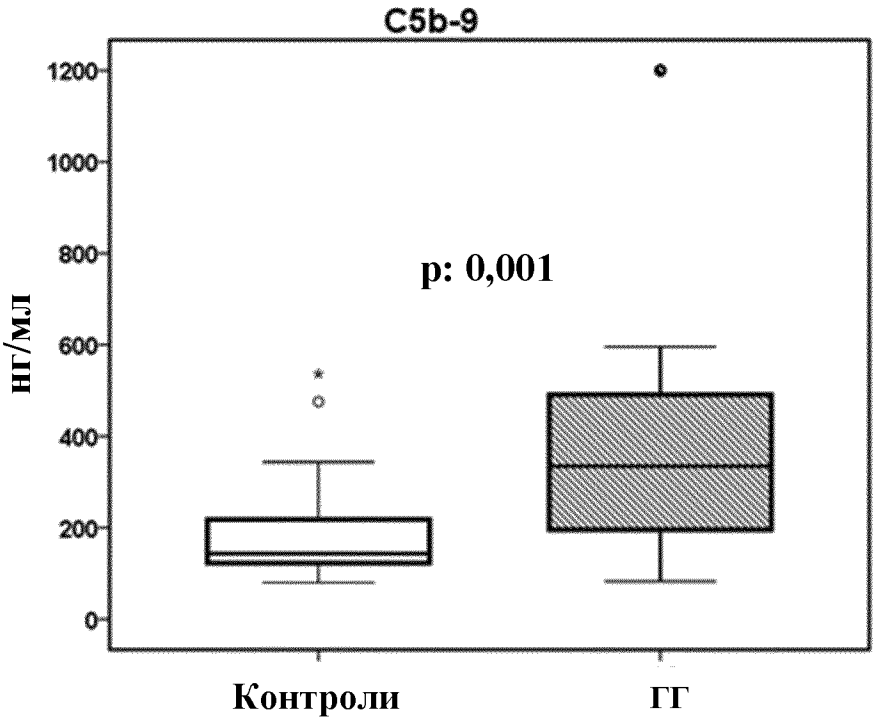
Фиг. 5A



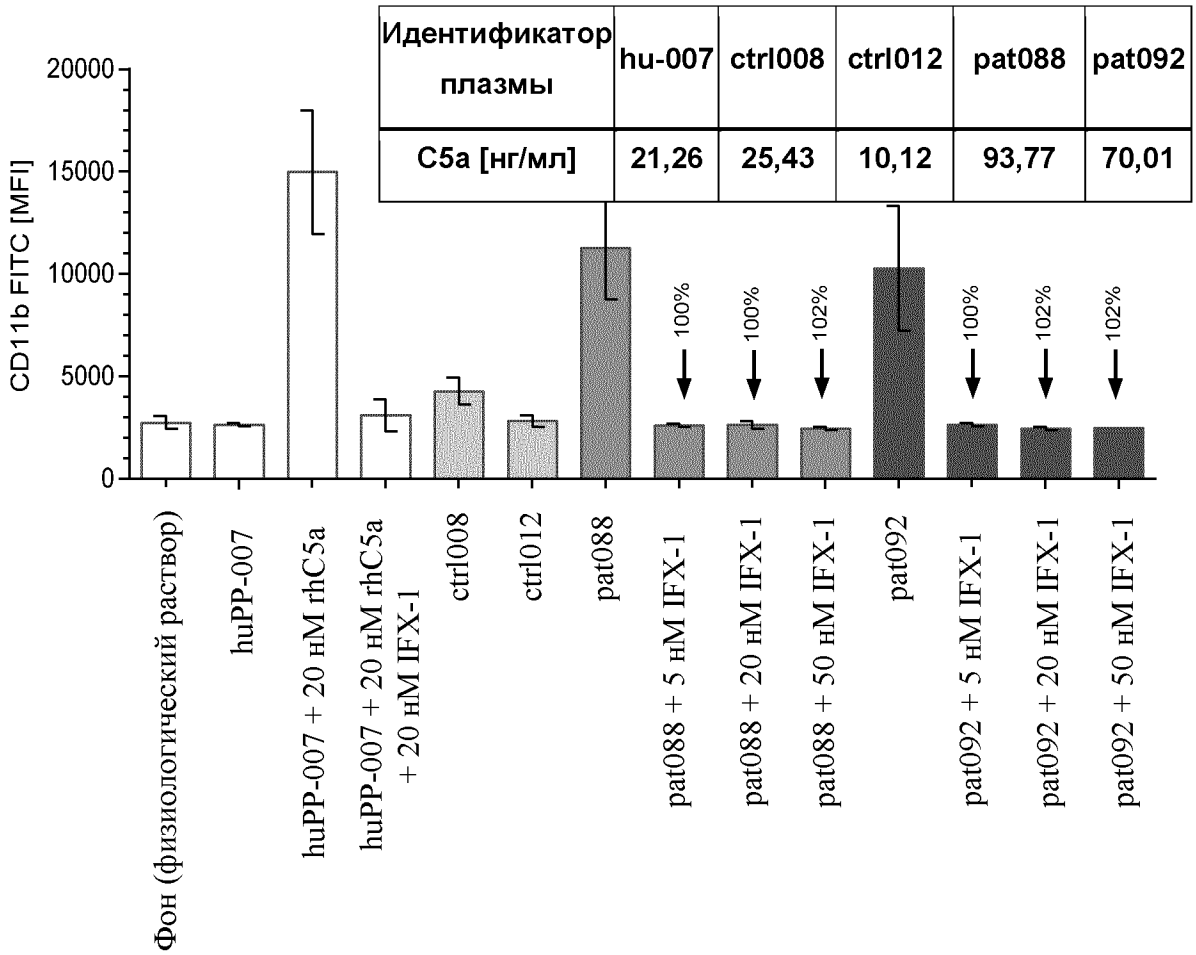
Фиг. 5B



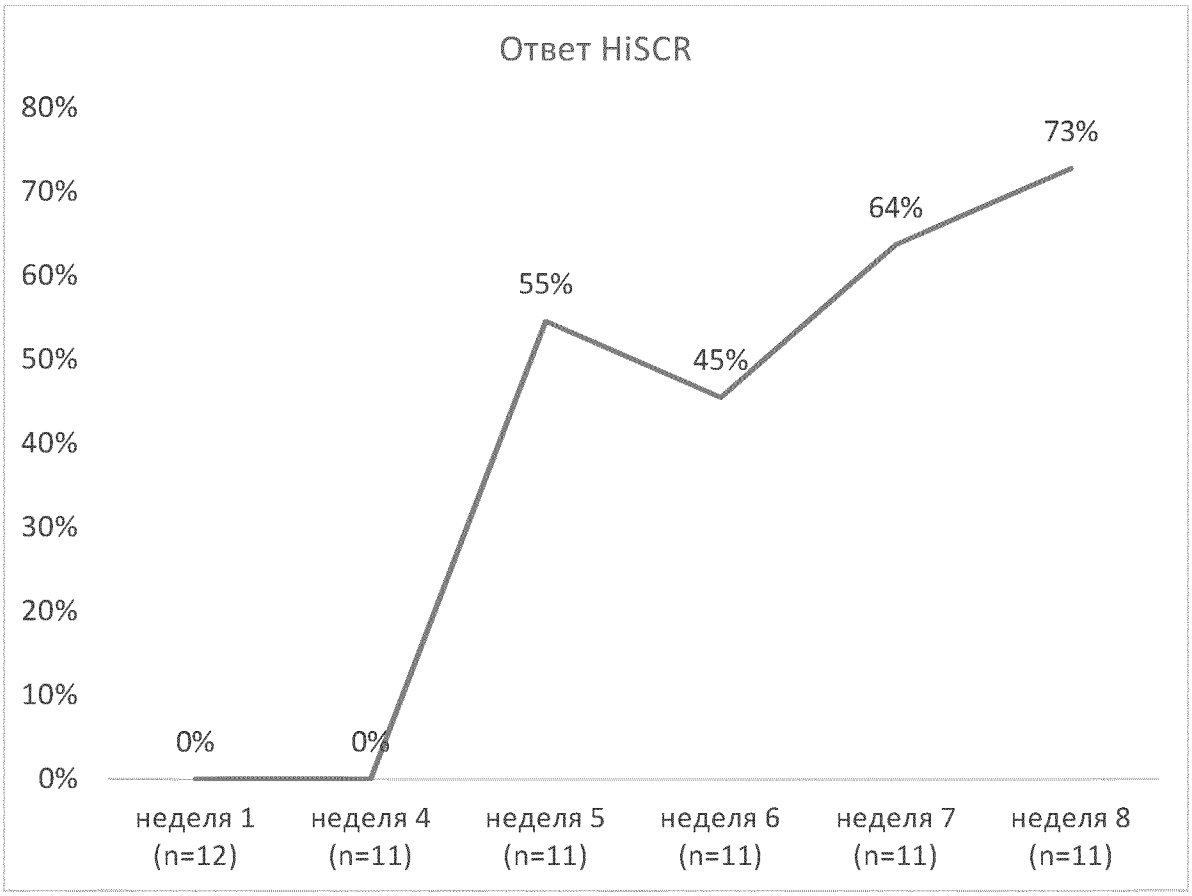
Фиг. 5C



Фиг. 6


Идентификатор плазмы
hu-007
ctrl008
ctrl012
pat088
pat092
C5a [нг/мл]
21,26
25,43
10,12
93,77
70,01
CD11b FITC [MFI]
20000
15000
10000
5000
0
100%
100%
102%
100%
102%
102%
Фон (физиологический раствор)
huPP-007
huPP-007 + 20 нМ rhC5a
huPP-007 + 20 нМ rhC5a + 20 нМ IFX-1
ctrl008
ctrl012
pat088
pat088 + 5 нМ IFX-1
pat088 + 20 нМ IFX-1
pat088 + 50 нМ IFX-1
pat092
pat092 + 5 нМ IFX-1
pat092 + 20 нМ IFX-1
pat092 + 50 нМ IFX-1

Фиг. 7


Ответ HiSCR
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0%
0%
55%
45%
64%
73%
неделя 1 (n=12)
неделя 4 (n=11)
неделя 5 (n=11)
неделя 6 (n=11)
неделя 7 (n=11)
неделя 8 (n=11)