

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092651** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.04.08

(51) Int. Cl. *A61P 37/06* (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.03

(54) **СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ CD24 ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ
"ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА" И МУКОЗИТА**

(31) **62/680,218; 62/739,742; 62/739,719**

(32) **2018.06.04; 2018.10.01; 2018.10.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/035200**

(87) **WO 2019/236472 2019.12.12**

(71) Заявитель:
ОНКОИММЬОН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Лю Ян, Чжэн Пань, Девенпорт
Мартин (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)**

(57) Изобретение относится к применению белка CD24 для предупреждения или лечения реакции "трансплантат против хозяина" и мукозита.

A1

202092651

202092651

A1

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ CD24 ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» И МУКОЗИТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для предупреждения и лечения реакции «трансплантат против хозяина» и мукозита.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГК) является единственной признанной терапией для широкого спектра высокорисковых лейкозов и миелодисплазии у взрослых, которая может обеспечить полное выздоровление. Важной функцией аллогенной трансплантации является использование донорских Т-клеток для устранения аллогенных клеток лейкоза, этот эффект называется ТПЛ («трансплантат против лейкоза»). Однако реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – это опасное для жизни осложнение, которое возникает, когда иммунокомпетентные клетки из трансплантата донорских стволовых клеток начинают иммунную атаку против хозяина. Активированные донорские Т-клетки повреждают эпителиальные клетки хозяина после каскада воспалительных реакций, который начинается с режимом кондиционирования. Конкретная величина риска зависит от источника стволовых клеток, возраста пациента, кондиционирования и применяемой профилактики РТПХ. Частота развития напрямую связана со степенью несоответствия человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA). Медианное время начала острой РТПХ обычно составляет 21–25 дней после трансплантации. Частота развития колеблется от 30-65% у реципиентов трансплантатов от полностью гистосовместимых родственных доноров до 60-80% у реципиентов HLA-несовместимых гемопоэтических клеток или гемопоэтических клеток от неродственного донора. Трансплантация пуповинной крови сопровождается более медленным восстановлением нейтрофилов с более низкой частотой развития и более поздним началом острой РТПХ. Факторы, увеличивающие частоту развития, включают использование периферической крови, а не костного мозга в качестве источника гемопоэтических клеток, и пожилой возраст реципиентов. Медианное время диагностики хронической РТПХ составляет 4,5 месяца после трансплантации от HLA-идентичного родственника и 4 месяца после трансплантации от неродственного донора. Первичная хроническая РТПХ практически никогда не возникает по прошествии 2 лет после аллогенной ТГК.

[0003] На протяжении более 20 лет комбинация ингибитора кальциневрина (например, циклоспорина и такролимуса) с метотрексатом остается стандартом медицинской помощи

для предупреждения РТПХ. Несмотря на стандартное проведение иммунопрофилактики, клинически значимая РТПХ (II-IV степени) встречается примерно у 30–65% пациентов, проходящих ТКК от HLA-совместимого родственника, и у 60–80% пациентов, получающих ТКК от неродственного донора. Острая РТПХ наступает вскоре после ТКК, медианное время до начала развития составляет приблизительно от 25 до 30 дней. У пациентов с очень тяжелой РТПХ смертность превышает 90%. Одно из объяснений этого состоит в том, что после развития заболевания более чем 50% пациентов демонстрируют неэффективный ответ на терапию первой линии высокими дозами кортикостероидов. Выживаемость значительно снижается для пациентов, которые демонстрируют резистентность к стероидам или которым требуется длительное лечение. Даже в случае успеха высокие дозы кортикостероидов являются основным источником осложнений из-за учащения развития инфекций и дезадаптации сердечно-сосудистой системы, что подвергает пациентов значительному риску TRM (трансплантационной летальности).

[0004] Повреждения тканей хозяина, вызванные режимами кондиционирования перед ТКК, включая высокодозную химиотерапию и/или тотальное облучение тела (ТВИ), считаются первым шагом в развитии острой РТПХ. Повреждения тканей хозяина, вызванные режимом кондиционирования, приводят к высвобождению провоспалительных цитокинов (таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6), а также к высвобождению молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). И DAMP, и PAMP могут активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как дендритные клетки (ДК), путем связывания с паттерн-распознающими рецепторами (PRR). В дальнейшем АПК хозяина активируют донорские Т-клетки и иммунологический каскад, который приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов и экспансии антигенспецифических аллореактивных Т-клеток, нацеленных на ткани хозяина, что приводит к РТПХ. Поэтому представляет большой интерес изучение возможности ослабления РТПХ путем направления ответа хозяина на повреждения тканей и предупреждения активации АПК – ключевых процессов в инициации РТПХ.

[0005] На сегодняшний день лечение и предупреждение РТПХ в основном ориентировано либо на фармакологическое ингибирование, либо на деплецию Т-клеток с помощью подходов *in vivo* или *ex vivo* для ограничения экспансии аллореактивных Т-клеток, которые опосредуют повреждение тканей. Хотя неселективные стратегии деплеции Т-клеток (например, антитимоцитарный глобулин) эффективны для предупреждения РТПХ, они не улучшают выживаемость из-за сопутствующих рисков рецидива, инфекции и

отторжения трансплантата. В свою очередь, более селективное ингибирование путем нацеливания на отдельные провоспалительные цитокины не продемонстрировало клинической эффективности при лечении РТПХ. В результате помимо антител, деплетирующих Т-клетки, не было одобрено никаких биопрепаратов для лечения РТПХ, и комбинация такролимуса с метотрексатом остается стандартом медицинской помощи для предупреждения РТПХ. Значительные неудовлетворенные медицинские потребности требуют более селективных биологических препаратов как для профилактики, так и для лечения РТПХ.

[0006] Мукозит представляет собой распространенный и болезненный побочный эффект химиотерапии и лучевой терапии рака, который приводит к воспалению и изъязвлению слизистых оболочек, выстилающих пищеварительный тракт. Он является результатом повреждения тканей, вызванного радиационной/лучевой терапией (ЛТ) или химиотерапией. Мукозит может возникать в любом месте желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), но мукозит полости рта относится к определенному типу воспаления и изъязвления, возникающему в полости рта. Мукозит полости рта и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) поражает почти всех пациентов, проходящих высокодозную химиотерапию цитарабином и высокодозным 5-фторурацилом, алкилирующими агентами и соединениями на основе платины, а также большинство пациентов со злокачественными новообразованиями головы и шеи, получающих лучевую терапию. Лучевой мукозит полости рта (РИОМ) встречается у 100% пациентов с раком головы и шеи после лучевой терапии с нетрадиционным фракционированием дозы излучения. Пациенты, страдающие мукозитом полости рта, испытывают сильную боль, воспаление, изъязвление и кровотечение, которые могут значительно затруднить способность пациента глотать, что также может ограничивать контроль опухоли из-за прерывания лечения рака. Соответственно, мукозит полости рта является существенным побочным эффектом, наблюдаемым у онкологических больных при химиотерапии и/или лучевой терапии головы и шеи. Мукозит пищеварительного тракта увеличивает смертность и частоту осложнений и способствует увеличению затрат на здравоохранение. В Соединенных Штатах экономические затраты на РИОМ согласно оценкам достигают 17 000,00 долларов США на пациента с раковыми заболеваниями головы и шеи.

[0007] Наиболее выраженный мукозит возникает в результате режимов кондиционирования, используемых при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГК). Схема лечения при ТГК включает режим предварительного кондиционирования, который необходим для уничтожения раковых гемопоэтических

клеток реципиента перед трансплантацией, в том числе высокотоксичную для слизистых оболочек химиотерапию с тотальным облучением тела (ТВИ) или без него. Это предварительное кондиционирование приводит к серьезным повреждениям пищеварительного тракта. Мукозит низкой степени тяжести включает эритему слизистой оболочки и очаговые изъязвления или псевдомембраны. Тяжелый мукозит (3 или более высокой степени) связан со сливными изъязвлениями или псевдомембранами и кровоточивостью при минимальной травме, которая может прогрессировать до некроза тканей, значительного спонтанного кровотечения и опасных для жизни последствий. Еще одним родственным мукозиту патологическим состоянием у пациентов, у которых проводится ТКК, является реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) полости рта, которая является формой хронической РТПХ. Как и в случае с химиотерапией и лучевым мукозитом, РТПХ полости рта включает эритему слизистых оболочек, изъязвления и болезненные десквамативные поражения полости рта. Однако точное клиническое определение острой РТПХ полости рта отсутствует, поскольку несколько факторов, в частности, кондиционирующая химиотерапия с современным облучением или без него, способствуют развитию поражения полости рта в течение первых 28 дней после ТКК.

[0008] Как указано, РТПХ, мукозит и родственные патологические состояния включают элемент повреждения тканей. Для борьбы с этими проблемами в данной области техники необходимы способы эффективного лечения и предупреждения РТПХ и мукозита.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В настоящем документе предложен способ предупреждения или лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) или мукозита у нуждающегося в этом субъекта, который может включать введение указанному субъекту белка CD24. В настоящем документе также предложено применение белка CD24 для изготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения РТПХ или мукозита у субъекта. Способ или применение могут снижать риск развития у субъекта острой РТПХ III-IV степени. Субъект может представлять собой человека. Субъекту может проводиться или могла быть проведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГК). Субъект может иметь рак, который может представлять собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

[0010] Белок CD24 может быть введен в дозе 240 мг или 480 мг. Белок CD24 может быть введен до или после ТКК, и может быть введен за один день до ТКК. Белок CD24 может

быть введен более одного раза и может быть введен дозами раз в две недели. Дозы могут включать дозу за день до ТГК, дозу на 14 день после ТГК и дозу на 28 день после ТГК, и дозы могут составлять, соответственно, 480 мг, 240 мг и 240 мг.

[0011] Белок CD24 может содержать зрелый человеческий полипептид CD24, слитый на его N-конце или C-конце с Fc-областью белка иммуноглобулина (Ig) млекопитающего. Зрелый человеческий полипептид CD24 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 2. Белок Ig может быть человеческим. Fc-область может содержать шарнирную область и домены CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA. Fc-область может содержать шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM. Белок CD24 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11 или 12. Аминокислотная последовательность белка CD24 может состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, 11 или 12. Белок CD24 может быть растворимым и может быть гликозилирован. Белок CD24 может быть получен с использованием эукариотической системы экспрессии, которая может включать экспрессию из вектора в клетках млекопитающих. Клетки могут представлять собой клетки яичника китайского хомячка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] На ФИГ. 1A показан аминокислотный состав полноразмерного слитого белка CD24, CD24Fc (также называемого в настоящем документе CD24Ig) (SEQ ID NO: 5). Подчеркнутые 26 аминокислот представляют собой сигнальный пептид CD24 (SEQ ID NO: 4), который отщепляется во время секреции из клетки, экспрессирующей белок, и поэтому отсутствует в процессированной версии белка (SEQ ID NO: 6). Выделенная жирным шрифтом часть последовательности представляет собой внеклеточный домен зрелого белка CD24, используемый в слитом белке (SEQ ID NO: 2). Последняя аминокислота (A или V), которая обычно присутствует в зрелом белке CD24, была удалена из конструкции, чтобы избежать иммуногенности. Не подчеркнутые, не выделенные жирным шрифтом буквы обозначают последовательность Fc IgG1, включая шарнирную область и домены CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 7). На ФИГ. 1B показана последовательность CD24^VFc (SEQ ID NO: 8), в которой зрелый человеческий белок CD24 (жирный шрифт) представляет собой полиморфный вариант SEQ ID NO: 1 с валином. На ФИГ. 1C показана последовательность CD24^AFc (SEQ ID NO: 9), в которой зрелый человеческий белок CD24 (жирный шрифт) представляет собой полиморфный вариант SEQ ID NO: 1 с аланином. Различные части слитого белка на ФИГ. 1B и 1C обозначены, как на ФИГ. 1A, а вариантная аминокислота валин/аланин дважды подчеркнута.

[0013] На ФИГ. 2 показаны вариации аминокислотной последовательности между зрелыми белками CD24 мыши (SEQ ID NO: 3) и человека (SEQ ID NO: 2). Потенциальные сайты O-гликозилирования выделены жирным шрифтом, а сайты N-гликозилирования подчеркнуты.

[0014] ФИГ. 3А-С. Анализ фармакокинетики CD24IgG1 (CD24Fc) с помощью компартментного моделирования WinNonlin. Незакрашенные кружки представляют собой среднее значение для 3 мышей, а линия представляет собой прогнозируемую фармакокинетическую кривую. ФИГ. 3А. В/в инъекция 1 мг CD24IgG1. ФИГ. 3В. П/к инъекция 1 мг CD24IgG1 (CD24Fc). ФИГ. 3С. Сравнение общих количеств антител в крови, измеренных по площади под кривой (AUC), периоду полувыведения и максимальной концентрации в крови. Следует обратить внимание, что в целом AUC и C_{max} при п/к инъекции составляют около 80% от значений для в/в инъекции, хотя разница не является статистически значимой.

[0015] ФИГ. 4А-В. Взаимодействие CD24-Siglec G (10) различает PAMP и DAMP. ФИГ. 4А. Взаимодействие CD24-Siglec G(10) не оказывало влияния на ответ хозяина на PAMP. ФИГ. 4В. Взаимодействие CD24-Siglec G (10) подавляет ответ хозяина на DAMP, возможно, через Siglec G/10-ассоциированный SHP-1.

[0016] ФИГ. 5А-С. CD24 Fc связывается с Siglec 10 и HMGB1 и активирует Siglec G, мышинный гомолог человеческого Siglec 10. ФИГ. 5А. Измерение аффинности взаимодействия CD24Fc-Siglec 10. ФИГ. 5В. CD24Fc специфически взаимодействует с HMGB-1 катион-зависимым образом. CD24Fc инкубировали с HMGB1 в 0,1 mM CaCl₂ и MgCl₂ в присутствии или в отсутствие хелатора катионов EDTA. CD24Fc подвергают «pull down» с помощью микросфер с белком G, и количество HMGB1, CD24Fc или контрольного Fc определяют с помощью вестерн-блоттинга. ФИГ. 5С. CD24Fc активирует мышинный Siglec G путем индукции фосфорилирования тирозина (средняя секция) и ассоциации с SHP-1 (верхняя секция). Количества Siglec G показаны на нижней секции. CD24^{-/-} клетки селезенки стимулировали 1 мкг/мл CD24Fc, контрольного Fc или контроля носителем (PBS) в течение 30 минут. Затем Siglec G подвергали иммунопреципитации и зондировали антителом к фосфотирозину или анти-SHP-1.

[0017] ФИГ. 6А-В. CD24Fc ингибирует продукцию TNF-α и IFN-γ активированными анти-CD3 человеческими Т-клетками. Человеческие PBML стимулировали анти-CD3 в течение 4 дней в присутствии или в отсутствие CD24Fc и измеряли количества IFN-γ и TNF-α, высвобождаемых в супернатант клеточной культуры, с помощью ELISA. Показанные данные являются средними для трех анализов. Планка погрешностей, SEM.

[0018] ФИГ. 7А-В. CD24 ингибирует продукцию воспалительных цитокинов человеческими макрофагами. ФИГ. 7А. Сайленсинг кшРНК CD24 приводит к спонтанной продукции TNF- α , IL-1 β и IL-6. Клетки THP1 трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими рандомизированную либо две независимые молекулы кшРНК CD24. Трансдуцированные клетки дифференцировали в макрофаги путем культивирования в течение 4 дней с РМА (15 нг/мл). После смывания РМА и неприлипших клеток клетки культивировали в течение еще 24 часов для измерения уровней воспалительных цитокинов с помощью набора микросфер к цитокинам. ФИГ. 7В. Аналогично ФИГ. 7А, за исключением того, что в течение последних 24 часов к макрофагам была добавлена указанная концентрация CD24Fc или контрольного Fc IgG. Данные, показанные на ФИГ. 4А, представляют собой средние значения и СКО для трех независимых экспериментов, а данные на ФИГ. 4В относятся по меньшей мере к 3 независимым экспериментам.

[0019] На ФИГ. 8 показан график средней концентрации CD24Fc в плазме (\pm СКО) в зависимости от лечения для популяции, пригодной для оценки ФК, у людей. ФК = фармакокинетический; СКО = среднее квадратическое отклонение.

[0020] На ФИГ. 9 показан график пропорциональности дозе для зависимости C_{\max} CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК.

[0021] На ФИГ. 10 показан график пропорциональности дозе для зависимости AUC_{0-42d} CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК.

[0022] На ФИГ. 11 показан график пропорциональности дозе для зависимости AUC_{0-inf} CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК.

[0023] На ФИГ. 12 показан дизайн исследования для рандомизированного, плацебо-контролируемого исследования с повышением дозы фазы IIa для оценки добавления CD24Fc к стандарту медицинской помощи для профилактики острой РТПХ у онкологических больных, проходящих аллогенную миелоаблативную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГК).

[0024] На ФИГ. 13 показана схема дозирования для когорт однократной и многократных доз в исследовании фазы IIa.

[0025] На ФИГ. 14 показано медианное время приживления трансплантата для пациентов, включенных в исследование.

[0026] На ФИГ. 15 показан донорский миелоидный химеризм для пациентов, включенных в исследование.

[0027] На ФИГ. 16 показана частота развития острой РТПХ II-IV степени и III-IV степени в когорте лечения (CD24Fc).

[0028] На ФИГ. 17 показана кумулятивная частота развития оРТПХ III-IV степени через 180 дней после ТКК у пациентов, получавших метотрексат/такролимус + CD24Fc, по сравнению с современными внешними контрольными пациентами, получавшими метотрексат/такролимус.

[0029] На ФИГ. 18 показан анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера, где сравнивается 180-дневная выживаемость без рецидива и оРТПХ III-IV степени у пациентов, получавших CD24Fc либо контроль плацебо.

[0030] На ФИГ. 19 показан анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера, где сравнивается 180-дневная выживаемость без рецидива и оРТПХ III-IV степени у пациентов, получавших CD24Fc, с современным внешним контролем.

[0031] На ФИГ. 20 показан анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера, где сравнивается общая выживаемость пациентов, получавших CD24Fc либо контроль плацебо, через 800 дней после трансплантации.

[0032] На ФИГ. 21 показан анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера, где сравнивается общая выживаемость пациентов, получавших CD24Fc, с современным внешним контролем через 800 дней после трансплантации.

[0033] На ФИГ. 22А-В показаны ФК данные для когорт однократных доз 240 и 480 мг. ФИГ. 22А. График зависимости средней (\pm среднеквадратическое отклонение) концентрации CD24Fc в плазме (нг/мл) от времени в линейных координатах. ФИГ. 22В. График зависимости средней (\pm среднеквадратическое отклонение) концентрации CD24Fc в плазме (нг/мл) от времени в полулогарифмических координатах.

[0034] На ФИГ. 23А-В показаны ФК данные для когорты многократных доз. ФИГ. 23А. График зависимости средней (\pm среднеквадратическое отклонение) концентрации CD24Fc в плазме (нг/мл) от времени в линейных координатах. ФИГ. 23В. График зависимости средней (\pm среднеквадратическое отклонение) концентрации CD24Fc в плазме (нг/мл) от времени в полулогарифмических координатах.

[0035] На ФИГ. 24А-В показано воздействие лечения CD24Fc на мукозит полости рта. ФИГ. 24А. Комбинированные оценки мукозита. В качестве меры воздействия на мукозит авторы использовали число дней с тяжелым мукозитом (3 или 4 степени) у пациентов, эта величина указана в столбцах вместе с количеством пациентов, имевших мукозит,

указанным в скобках. ФИГ. 24В. Дозозависимое снижение величины оценки мукозита под воздействием CD24Fc. Показаны средние значения и стандартные ошибки индивидуальных оценок мукозита. Коэффициент корреляции и *P*-значение для дозы лекарственного средства и величины оценки мукозита у пациентов определяли с использованием метода Пирсона. $R=-0,9983$, $P=0,0009$.

[0036] На ФИГ. 25А-В показана 180-дневная выживаемость без РТПХ III-IV степени в группе CD24Fc по сравнению с контрольной группой плацебо (ФИГ. 25А) и современной внешней контрольной группой (ФИГ. 25В).

[0037] На ФИГ. 26А-В показана безрецидивная выживаемость в группе CD24Fc по сравнению с контрольной группой плацебо (ФИГ. 26А) и современной внешней контрольной группой (ФИГ. 26В).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0038] Повреждение тканей может приводить к высвобождению провоспалительных цитокинов (таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6), а также к высвобождению молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). И DAMP, и PAMP могут активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как дендритные клетки (ДК), путем связывания с паттерн-распознающими рецепторами (PRR). В дальнейшем АПК хозяина активируют донорские Т-клетки и иммунологический каскад, который приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов и экспансии антигенспецифических аллореактивных Т-клеток, нацеленных на ткани хозяина. Именно эти события приводят к развитию РТПХ и усугубляют последствия мукозита. Например, RИОМ начинается с острого воспаления слизистой оболочки полости рта, языка и глотки после лучевой терапии, которое сопровождается привлечением различных воспалительных клеток и высвобождением воспалительных цитокинов, хемотаксических медиаторов и факторов роста.

[0039] Причастность повреждения ткани к мукозиту и РТПХ дала основания предположить, что негативная регуляция ответа хозяина на DAMP с помощью CD24Fc может быть исследована в качестве терапии РТПХ. Доклинические исследования, проведенные авторами изобретения, продемонстрировали, что CD24Fc специфически воздействует на DAMP-опосредованное воспаление и предупреждает РТПХ на мышинных моделях, включая модель на гуманизированных мышах. Важно отметить, что данное лекарственное средство имеет преимущества перед обычным иммунодепрессантом,

поскольку оно не вызывает общего подавления иммунитета, а использование высоких доз CD24Fc не блокирует гуморальный ответ у приматов, отличных от человека. Данные также демонстрируют, что CD24Fc предупреждает РТПХ, но сохраняет эффект «трансплантат против лейкоза» (ТПЛ), что делает его идеальным лекарственным средством для профилактики РТПХ у пациентов с лейкозом. Наконец, исследования авторов изобретения на приматах, отличных от человека, демонстрируют, что CD24Fc не подавляет антигенспецифические иммунные ответы, что позволяет предположить, что CD24Fc вряд ли повысит риск инфекции.

[0040] Авторы изобретения обнаружили, что растворимая форма CD24 в высокой степени эффективна для предупреждения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанных состояний, таких как мукозит, а также для предупреждения рецидива лейкоза после ТК. Авторы изобретения также обнаружили, что CD24Fc вызывал дозозависимое снижение тяжелого мукозита (степень 3 или выше) у пациентов, получавших терапию ТК. Эти эффекты могут быть опосредованы DAMP. Распознавание паттернов участвует в воспалительной реакции, запускаемой как PAMP, так и DAMP. Авторы изобретения осознали, что в недавних исследованиях продемонстрировано, что усиленный ответ хозяина на DAMP может играть роль в патогенезе воспалительного и аутоиммунного заболевания. Было обнаружено, что DAMP стимулируют продукцию воспалительных цитокинов и аутоиммунные заболевания и в моделях на животных, и, следовательно, было обнаружено, что ингибиторы DAMP, такие как HMGB1 и HSP90, облегчают ревматоидный артрит (РА). Было показано, что TLR, RAGE-R, DNGR (кодируемый Clec9A) и Mincle являются рецепторами, ответственными за опосредование воспаления, инициируемого различными DAMP.

[0041] В недавней работе авторов изобретения продемонстрировано, что взаимодействия CD24-Siglec G отличают врожденный иммунитет к DAMP от PAMP. Белки Siglec являются членами суперсемейства мембраноассоциированных иммуноглобулинов (Ig), которые распознают ряд структур, содержащих сиаловую кислоту. Большинство белков Siglec имеют внутриклеточный иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM), который ассоциирует с SHP-1, -2 и Cbl-b для управления ключевыми регуляторами воспалительных реакций. Авторы изобретения описали CD24 как первый природный лиганд для Siglec – Siglec G у мышей и Siglec 10 у человека. Siglec G взаимодействует с сиалированным CD24, подавляя TLR-опосредованный ответ хозяина на DAMP, такие как HMGB1, через сигнальный механизм SHP-1/2.

[0042] Человеческий CD24 представляет собой небольшую GPI-заякоренную молекулу, кодируемую открытой рамкой считывания из 240 пар оснований в гене CD24. Из 80 аминокислот первые 26 составляют сигнальный пептид, а последние 23 служат сигналом для расщепления, обеспечивающего присоединение GPI-хвоста. В результате в зрелой молекуле человеческого CD24 содержится всего 31 аминокислота. Одна из 31 аминокислоты является полиморфной в человеческой популяции. Переход С в Т при 170 нуклеотиде открытой рамки считывания приводит к замене аланина (А) на валин (V) при 31 остатке зрелого белка. Поскольку этот остаток находится непосредственно с N-конца от сайта расщепления и поскольку замена является неконсервативной, эти два аллеля могут экспрессироваться на клеточной поверхности с разной эффективностью.

Действительно, исследования трансфекции посредством кДНК продемонстрировали, что аллель CD24^v более эффективно экспрессируется на клеточной поверхности. Согласно с этим, CD24^{v/v} PBL (лимфоциты периферической крови) экспрессировали более высокие уровни CD24, особенно на Т-клетках.

[0043] Авторы изобретения продемонстрировали, что CD24 негативно регулирует ответ хозяина на клеточные DAMP, которые высвобождаются в результате повреждения ткани или органа, и эта активность может объясняться по меньшей мере двумя перекрывающимися механизмами. Во-первых, CD24 связывается с несколькими DAMP, включая HSP70, HSP90, HMGB1 и нуклеолин, и подавляет ответ хозяина на эти DAMP. Предположительно, для этого CD24 может захватывать воспалительные стимулы, чтобы предотвратить взаимодействие с их рецепторами, TLR или RAGE. Во-вторых, используя мышиную модель некроза печени, индуцированного ацетаминофеном, и обеспечивая воспаление, авторы изобретения продемонстрировали, что CD24 посредством взаимодействия с его рецептором Siglec G обеспечивает мощную негативную регуляцию ответа хозяина на повреждения тканей. Для достижения этой активности CD24 может связывать Siglec G и стимулировать передачу им сигналов, где Siglec G-ассоциированный SHP1 запускает негативную регуляцию. Оба механизма могут действовать согласованно, поскольку у мышей с направленной мутацией любого из этих генов развивалась гораздо более сильная воспалительная реакция. Действительно, ДК, выращенные из костного мозга мышей CD24^{-/-} или Siglec G^{-/-}, продуцировали более высокие уровни воспалительных цитокинов при стимуляции HMGB1, HSP70 или HSP90. Насколько известно авторам изобретения, CD24 является единственным ингибирующим рецептором DAMP, способным останавливать воспаление, запускаемое DAMP, и в настоящее время не существует лекарственного средства, специфически нацеленного на воспалительную реакцию хозяина на повреждения тканей. Кроме того, авторы изобретения

продемонстрировали способность экзогенного растворимого белка CD24 облегчить DAMP-опосредованное аутоиммунное заболевание с использованием мышинных моделей РА, РС (рассеянного склероза) и РТПХ.

1. Определения.

[0044] Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания частных вариантов осуществления и не должна интерпретироваться ограничительно. В контексте описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа также обозначают множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0045] При раскрытии числовых диапазонов, приведенных в настоящем документе, явным образом подразумевается каждое содержащееся в них промежуточное число с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона 6-9 помимо 6 и 9 также подразумеваются числа 7 и 8, а для диапазона 6,0-7,0 явным образом подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

[0046] «Пептид» или «полипептид» представляет собой связанную последовательность аминокислот и может быть природным, синтетическим или модификацией или комбинацией природного и синтетического.

[0047] «По существу идентичный» может означать, что первая и вторая аминокислотные последовательности являются по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в пределах области из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 аминокислот.

[0048] «Лечение» или «лечить» применительно к защите животного от заболевания означает предупреждение, подавление, сдерживание или полное устранение заболевания. Предупреждение заболевания включает введение животному композиции согласно настоящему изобретению до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение животному композиции согласно настоящему изобретению после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Сдерживание заболевания включает введение животному композиции согласно настоящему изобретению после клинического проявления заболевания.

[0049] «Вариант» может означать пептид или полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Типичные примеры «биологической активности» включают способность связываться с толл-подобным рецептором и быть связанным определенным антителом. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична референсному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, т. е. замена аминокислоты другой аминокислотой со схожими свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), признается в данной области техники заменой, обычно сопряженной с незначительными изменениями. Эти незначительные изменения можно идентифицировать в том числе с учетом индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на рассмотрении ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности могут быть подвергнуты замене с сохранением при этом функции белка. В одном из аспектов замененными являются аминокислоты с индексами гидропатичности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замен, которые могут обеспечить сохранение биологической функции белков. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать максимальную локальную среднюю гидрофильность этого пептида – полезный параметр, который по имеющимся сведениям хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. См. патент США № 4554101, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих схожие значения гидрофильности, может обеспечить сохранение биологической активности пептидов, например, иммуногенности, как это понимается в данной области техники. Замены могут осуществляться аминокислотами со значениями гидрофильности в пределах ± 2 относительно друг друга. И индекс гидрофобности, и значение гидрофильности аминокислот зависят от конкретной боковой цепи рассматриваемой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением считается, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, что определяется гидрофобностью, гидрофильностью, зарядом, размером и другими свойствами.

2. CD24

[0050] В настоящем документе предложен белок CD24, который может содержать зрелый CD24 или его вариант. Зрелый CD24 соответствует внеклеточному домену (ECD) CD24. Зрелый CD24 может происходить от человека или другого млекопитающего. Как описано выше, зрелый человеческий белок CD24 имеет длину в 31 аминокислоту и имеет переменный остаток аланина (A) или валина (V) на его С-конце. Зрелый белок CD24 может содержать следующую последовательность:

[0051] SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK(V/A) (SEQ ID NO: 1)

[0052] С-концевой валин или аланин могут быть иммуногенными и могут не быть включены в состав белка CD24, что может снизить его иммуногенность. Следовательно, белок CD24 может содержать аминокислотную последовательность зрелого человеческого CD24, лишённого С-концевой аминокислоты:

[0053] SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK (SEQ ID NO: 2)

[0054] Несмотря на значительные вариации аминокислотной последовательности зрелых белков CD24 мыши и человека, они функционально эквивалентны, поскольку было показано, что человеческий CD24Fc активен у мышей. Аминокислотная последовательность ECD человеческого CD24 демонстрирует некоторую консервативность последовательности с мышинным белком (39% идентичности; регистрационный номер в Genbank NP_033976). Однако неудивительно, что процент идентичности не превышает это значение, поскольку длина ECD CD24 составляет всего 27-31 аминокислоту, в зависимости от вида, и связывание с некоторым(и) из его рецепторов, например, Siglec 10/G, опосредуется его сиаловой кислотой и/или сахарами галактозы гликопротеина. Идентичность аминокислотной последовательности между внеклеточными доменами рецепторных белков Siglec-10 человека (регистрационный номер в GenBank AF310233) и его мышинового гомолога Siglec-G (регистрационный номер в GenBank NP_766488) составляет 63% (ФИГ. 2). Вследствие консервативности последовательности между мышинным и человеческим CD24, имеющей место главным образом на С-конце, и избытка сайтов гликозилирования при использовании белка CD24 могут допускаться значительные вариации зрелых белков CD24, особенно если эти вариации не влияют на консервативные остатки на С-конце или не влияют на сайты гликозилирования мышинового или человеческого CD24. Следовательно, белок CD24 может содержать аминокислотную последовательность зрелого мышинового CD24:

[0055] NQTSVAPFPGNQNISASPNPTNATTRG (SEQ ID NO: 3).

[0056] Аминокислотная последовательность ECD человеческого CD24 демонстрирует большую консервативность последовательности с белком яванского макака (52% идентичности; регистрационный номер в UniProt UniProtKB - I7GKK1), чем с мышиним белком. Опять же, неудивительно, что процент идентичности не превышает это значение, учитывая, что длина ECD у этих видов составляет всего 29-31 аминокислоту, и учитывая роль остатков сахаров в связывании с его рецептором(ами). Аминокислотная последовательность рецептора Siglec-10 яванского макака не установлена, но идентичность аминокислотной последовательности между белками Siglec-10 человека и макака-резуса (регистрационный номер в GenBank XP_001116352) составляет 89%. Следовательно, белок CD24 может также содержать аминокислотную последовательность зрелого CD24 яванского макака (или макака-резуса):

[0057] TVTTSAPLSSNSPQNTSTTPNPANTTTKA (SEQ ID NO: 10).

[0058] Белок CD24 может быть растворимым. Белок CD24 может дополнительно содержать N-концевой сигнальный пептид, который может обеспечивать секрецию белка из экспрессирующей его клетки. Последовательность сигнального пептида может содержать аминокислотную последовательность MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS (SEQ ID NO: 4). В качестве альтернативы, сигнальная последовательность может содержать любую из последовательностей, содержащихся на других трансмембранных или секретируемых белках, или последовательностей, полученных путем модификации существующих сигнальных пептидов, известных в данной области техники.

а. Слияние

[0059] Белок CD24 может быть слит на его N- или C-конце с белковой меткой, которая может содержать часть белка Ig млекопитающего, которое может представлять собой человека, мышь или другой вид. Указанная часть может содержать Fc-область белка Ig. Fc-область может содержать по меньшей мере одно из шарнирной области, доменов CH2, CH3 и CH4 белка Ig. Белок Ig может представлять собой человеческий IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA, а Fc-область может содержать шарнирную область и домены CH2 и CH3 Ig. Fc-область может содержать изотип человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1) с SEQ ID NO: 7. Белок Ig также может представлять собой IgM, а Fc-область может содержать шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM. Белковая метка может представлять собой аффинную метку, которая облегчает очистку белка, и/или метку, повышающую растворимость и выделение функциональных белков. Белковая метка может также увеличивать валентность белка CD24. Белковая метка может также включать GST, His, FLAG, Мус, MBP, NusA, тиоредоксин (TRX), малый убиквитин-подобный модификатор

(SUMO), убиквитин (Ub), альбумин или верблюжье Ig. Способы получения слитых белков и очистки слитых белков хорошо известны в данной области техники.

[0060] Основываясь на доклинических исследованиях, для конструирования слитого белка CD24Fc, идентифицированного в примерах, использовали усеченную форму нативной молекулы CD24 из 30 аминокислот, в которой отсутствует конечная полиморфная аминокислота перед сайтом отщепления GPI-сигнала (то есть, зрелый белок CD24, имеющий SEQ ID NO: 2). Последовательность зрелого человеческого CD24 слита с Fc-доменом человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 7). Последовательность полноразмерного слитого белка CD24Fc представлена в SEQ ID NO: 5 (ФИГ. 1A), а последовательность процессированной версии слитого белка CD24Fc, которая секретируется из клетки (т. е. с отсутствующей сигнальной последовательностью, которая отщепляется) представлена в SEQ ID NO: 6. Процессированные полиморфные варианты зрелого CD24 (то есть, зрелого белка CD24, имеющего SEQ ID NO: 1), слитого с Fc IgG1, могут содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или 12.

в. Получение

[0061] Белок CD24 может быть в высокой степени гликозилирован и может участвовать в функциях CD24, таких как костимуляция иммунных клеток и взаимодействие с молекулой молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением (DAMP). Белок CD24 может быть получен с использованием эукариотической системы экспрессии. Система экспрессии может предусматривать экспрессию из вектора в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO). Система также может представлять собой вирусный вектор, таким как дефектный по репликации ретровирусный вектор, который может быть использован для инфицирования эукариотических клеток. Белок CD24 также может быть получен из стабильной линии клеток, экспрессирующей белок CD24 из вектора или части вектора, встроенной в клеточный геном. Стабильная линия клеток может экспрессировать белок CD24 из встроенного ретровирусного вектора, дефектного по репликации. Система экспрессии может представлять собой GPEX™.

с. Фармацевтическая композиция

[0062] Белок CD24 может содержаться в фармацевтической композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемое количество белка CD24. Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может содержать растворитель, который может поддерживать стабильность белка CD24 в течение длительного периода времени. Растворитель может представлять собой PBS, который может поддерживать стабильность белка CD24 в течение по меньшей

мере 66 месяцев при -20 °C (от -15 до -25°C). Растворитель может быть способен содержать белок CD24 в сочетании с другим лекарственным средством.

[0063] Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в форме для парентерального введения, включая, не ограничиваясь перечисленным, введение путем инъекции или непрерывной инфузии. Препараты для инъекций могут быть в форме суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях и могут содержать вспомогательные агенты, включая, не ограничиваясь перечисленным, суспендирующие, стабилизирующие и диспергирующие агенты. Композиция также может быть представлена в форме порошка для восстановления подходящим носителем, включая, не ограничиваясь перечисленным, стерильную апиrogenную воду.

[0064] Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена в форме препарата депо, который может быть введен путем имплантации или внутримышечной инъекции. Композиция может быть приготовлена с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле), ионообменных смол или в виде умеренно растворимых производных (например, в виде умеренно растворимой соли). Препарат для подкожной инъекции может быть особенно актуален при таких показаниях, как волчанка и связанные с ней проявления и осложнения.

3. Способы лечения

а. РТПХ

[0065] В настоящем документе предложен способ предупреждения, ослабления или лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у нуждающегося в этом субъекта путем введения указанному субъекту белка CD24. Субъект может иметь РТПХ или быть подвержен риску ее развития. Субъекту может быть проведена или ему может проводиться трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГК). Белок CD24 может применяться профилактически для предупреждения РТПХ у субъекта, проходящего ТГК. РТПХ может представлять собой острую РТПХ. Белок CD24 может снижать риск развития у субъекта острой РТПХ III-IV степени. РТПХ может представлять собой хроническую РТПХ, включая РТПХ полости рта.

[0066] Субъект может иметь рак. Рак может представлять собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

b. Мукозит

[0067] В настоящем документе предложен способ предупреждения, ослабления или лечения мукозита у нуждающегося в этом субъекта путем введения указанному субъекту белка CD24. В настоящем документе также описан способ предупреждения, ослабления или лечения других состояний, связанных с РТПХ или ТКК, у нуждающегося в этом субъекта путем введения указанному субъекту белка CD24. Связанное состояние может представлять собой мукозит, который может представлять собой мукозит полости рта. Мукозит представляет собой болезненное воспаление и изъязвление слизистых оболочек, выстилающих пищеварительный тракт, обычно развивающееся как побочный эффект режима прекондиционирующей химиотерапии и/или лучевой терапии для ТКК. Мукозит может возникать в любом месте желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Мукозит полости рта относится к определенному типу воспаления и изъязвления, возникающему в полости рта. Мукозит полости рта – это распространенное и часто изнурительное осложнение при лечении рака. Мукозит развивается у многих реципиентов трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, причем мукозит полости рта является наиболее распространенной и наиболее изнурительной формой.

[0068] Субъект может иметь мукозит или быть подвержен риску его развития, при этом мукозит может представлять собой мукозит полости рта. У субъекта может быть проведена или может проводиться по меньшей мере одна из химиотерапии и лучевой терапии. Белок CD24 может применяться профилактически для предупреждения мукозита у субъекта. Белок CD24 может снижать риск развития у субъекта тяжелого мукозита.

c. Лекарственные средства

[0069] Также предложены применения белка CD24 для изготовления лекарственного средства для описанных в настоящем документе применений.

d. Режим дозирования

[0070] Вводимая доза белка CD24 может составлять от 0,01 мг/кг до 1000 мг/кг и может составлять от 1 до 500 мг/кг, в зависимости от желаемого действия на РТПХ или мукозит и способа введения. Белок CD24 может быть введен путем внутривенной (в/в) инфузии или подкожной, интрамуральной (то есть, внутрь стенки полости или органа) или внутрибрюшинной инъекции. Доза может составлять 10-1000 мг, 10-500 мг, 240 мг или 480 мг, что, в частности, может быть подходящей дозой, когда субъект представляет собой человека.

[0071] Белок CD24 может быть введен до или после трансплантации стволовых клеток. Белок CD24 может быть введен за 1-4 дня, в частности, за 1 день до трансплантации

стволовых клеток. Белок CD24 также может быть введен в нескольких дозах до или после трансплантации стволовых клеток. Белок CD24 может быть введен 2, 3, 4, 5 или 6 дозами, по дозе раз в две недели. Каждая доза белка CD24 может составлять 240 мг или 480 мг. Первая доза может быть введена в период с -4 дня по 0 день относительно дня трансплантации стволовых клеток (0 день), и, в частности, может быть введена в -1 день. Каждая последующая доза может быть введена каждые 9-19 или 11-17 дней после этого. Вторая доза может быть введена в период с +9 по +19 день или с +11 по +17 день, в частности, в +14 день, относительно дня трансплантации стволовых клеток. Третья доза может быть введена в период с +18 по +38 день, с +23 по +33 день или с +22 по +34 день, в частности, в +28 день, относительно дня трансплантации стволовых клеток. В частности, белок CD24 может быть введен путем трех введений раз в две недели по 480 мг, 240 мг и 240 мг, соответственно, в -1 день, +14 день и +28 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Белок CD24 может, в частности, представлять собой CD24Fc.

[0072] Белок CD24 может быть введен до или во время проведения по меньшей мере одной из химиотерапии и лучевой терапии. Белок CD24 может быть введен таким образом, чтобы он присутствовал при высвобождении DAMP.

е. Комбинированное лечение

[0073] Белок CD24 может быть введен субъекту в сочетании со стандартом медицинской помощи для профилактики РТПХ. Стандарт медицинской помощи для профилактики РТПХ может включать введение комбинации метотрексата и ингибитора кальциневрина, такого как такролимус (Prograf, FK506) или циклоспорин (Sandimmune, Neoral).

Такролимус может быть введен на -3 день относительно дня трансплантации стволовых клеток, и может быть введен в/в или п/о (перорально). Для в/в введения в виде непрерывной инфузии начальная доза может составлять 0,03 мг/кг/сут на основании скорректированной массы тела. Для перорального введения начальная доза может составлять 0,045 мг/кг/сут два раза в день. Если субъект не переносит такролимус, то субъекту может быть введен циклоспорин в/в в дозе, в 100 раз превышающей в/в дозу такролимуса (например, в начальной дозе 3 мг/кг/сут). Циклоспорин также может быть введен перорально в дозе, в 3 раза превышающей в/в дозу. При использовании препарата под торговым наименованием Neoral из-за большей биодоступности циклоспорин может быть введен перорально в дозе, в 2 раза превышающей в/в дозу.

[0074] При отсутствии РТПХ уровни такролимуса можно контролировать в отношении терапевтического уровня дозы только в течение первых 100 дней после трансплантации. Терапевтический целевой остаточный уровень такролимуса может составлять 5-15 нг/мл.

Уровни такролимуса можно контролировать как минимум три раза (например, каждые 48-72 часа) в течение первой недели после инфузии белка CD24 (с 0 по 7 день). При отсутствии РТПХ или рецидива снижение дозы такролимуса может быть начато на +100 день после трансплантации. При наличии РТПХ прием такролимуса может быть продолжен в терапевтических дозах.

[0075] Для стандартной профилактики РТПХ в комбинации с такролимусом может быть использован метотрексат. Метотрексат может быть введен внутривенно в дозе 15 мг/м²/доза раз в сутки в 1 день после ТГК и в дозе 10 мг/м²/доза на 3, 6 и 11 дни после ТГК.

[0076] При мукозите белок CD24 может быть введен по меньшей мере с одним иммуномодулирующим агентом (то есть отличным от белка CD24), чтобы минимизировать обострение воспалительного компонента. Белок CD24 может быть введен в комбинации с аллопуринолом субъектам, получающим 5-фторурацил.

[0077] Белок CD24 может быть введен в комбинации с одним или более из следующих миелоаблативных режимов кондиционирования и может быть введен до или во время проведения режимов кондиционирования. Белок CD24 может быть введен таким образом, чтобы он присутствовал при высвобождении DAMP в ответ на по меньшей мере одно из миелоаблативного режима кондиционирования и ТГК.

[0078] *Бусульфан и флударабин*

[0079] Бусульфан может быть введен в период с -5 по -2 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Доза может составлять 3,2 мг/кг/сут или 130 мг/м²/сут и может вводиться внутривенно. Суммарная доза может составлять 12,8 мг/кг или 520 мг/м². Флударабин может быть введен в период с -5 по -2 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Доза может составлять 30-45 мг/м²/сут, а суммарная доза может составлять 120-180 мг/м². Последовательность и время введения бусульфана и флударабина могут быть выбраны в соответствии с установленными в медицинском учреждении стандартами миелоаблативного кондиционирования, известными в данной области техники.

[0080] *Бусульфан и циклофосфамид*

[0081] Бусульфан может быть введен в период с -7 по -4 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Доза может составлять 3,2 мг/кг/сут или 130 мг/м²/сут и может вводиться внутривенно. Суммарная доза может составлять 12,8 мг/кг или 520 мг/м². Циклофосфамид может быть введен в период с -3 по -2 день относительно дня

трансплантации стволовых клеток. Доза может составлять 60 мг/кг/сут, а суммарная доза может составлять 120 мг/кг.

[0082] *Циклофосфамид и тотальное облучение тела*

[0083] Тотальное облучение тела (ТВИ) может проводиться в период с -7 по -4 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Циклофосфамид может быть введен в период с -3 по -2 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. Доза может составлять 60 мг/кг/сут, а суммарная доза может составлять 120 мг/кг.

Последовательность циклофосфамида, ТВИ и протоколы проведения ТВИ для миелоаблативных режимов могут быть выбраны в соответствии с установленными в медицинском учреждении стандартами миелоаблативного кондиционирования, известными в данной области техники.

[0084] Белок CD24 также может быть введен с вариантом индивидуального миелоаблативного лечения, описанным выше, или их комбинаций.

Пример 1

Фармакокинетика CD24 у мышей

[0085] 1 мг CD24Fc (CD24Fc) инъецировали наивным мышам C57BL/6 и собирали образцы крови в разные моменты времени (5 мин, 1 ч, 4 ч, 24 ч, 48 ч, 7 дней, 14 дней и 21 день), в каждый момент времени у 3 мышей. Сыворотки разводили 1:100 и определяли уровни CD24Fc с помощью сэндвич-ELISA с использованием очищенного антитела к человеческому CD24 (3,3 мкг/мл) в качестве антитела захвата и конъюгированных с пероксидазой козых антител к Fc человеческого IgG (5 мкг/мл) в качестве антител детекции. Как показано на ФИГ. 3а, кривая распада CD24Fc продемонстрировала типичный двухфазный распад белка. Период полувыведения первой фазы биораспределения составил 12,4 часа. Вторая фаза следует модели элиминации первого порядка из центрального компартмента. Период полувыведения для второй фазы составил 9,54 дня, что аналогично периоду полувыведения антител *in vivo*. Эти данные дают основания полагать, что слитый белок очень стабилен в кровотоке. В другом исследовании, в котором слитый белок вводили подкожно, наблюдался почти идентичный период полувыведения, равный 9,52 дня (ФИГ. 3б). Что еще более важно, хотя для достижения пикового уровня CD24Fc в крови потребовалось приблизительно 48 часов, общее количество слитого белка в крови, измеренное с помощью AUC, было практически одинаковым для обоих видов инъекции. Таким образом, с терапевтической точки зрения использование другого вида инъекции не должно влиять на терапевтический эффект

лекарственного средства. Это наблюдение значительно упростило дизайн эксперимента по изучению токсичности у приматов и клинических исследований.

Пример 2

Взаимодействие CD24-Siglec 10 в ответе хозяина на повреждение тканей

[0086] Почти два десятилетия назад Matzinger предложила концепцию, широко известную как теория опасности. В сущности, она утверждала, что иммунная система включается, когда она чувствует опасности в хозяине. Хотя в то время природа опасности не была четко определена, было установлено, что некроз связан с высвобождением внутриклеточных компонентов, таких как HMGB1 и белки теплового шока, которые были названы DAMP, что расшифровывается как молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью. Было обнаружено, что DAMP стимулируют продукцию воспалительных цитокинов и аутоиммунные заболевания. В моделях на животных было обнаружено, что ингибиторы HMGB1 и HSP90 облегчают РА. Причастность DAMP дала основания предположить, что негативная регуляция ответа хозяина на DAMP может быть исследована в качестве терапии РА.

[0087] При использовании некроза печени, индуцированного ацетаминофеном, и обеспечении воспаления, наблюдали, что CD24 посредством взаимодействия с Siglec G обеспечивает мощную негативную регуляцию ответа хозяина на повреждения тканей. CD24 представляет собой GPI-заякоренные молекулы, которые широко экспрессируются в гемопоэтических клетках и стволовых клетках других тканей. Генетический анализ различных аутоиммунных заболеваний человека, включая рассеянный склероз, системную красную волчанку, РА и гигантоклеточный артрит, выявил значительную взаимосвязь между полиморфизмом CD24 и риском аутоиммунных заболеваний. Siglec G является членом семейства лектинов I-типа, которые характеризуются их способностью распознавать структуру, содержащую сиаловую кислоту. Siglec G распознал структуру, содержащую сиаловую кислоту, на CD24 и негативно регулирует продукцию воспалительных цитокинов дендритными клетками. С точки зрения способности взаимодействовать с CD24 человеческий Siglec 10 и мышинный Siglec G функционально эквивалентны. Однако неясно, существует ли однозначная корреляция между мышинным и человеческим гомологами. Хотя механизм еще предстоит полностью выяснить, вполне вероятно, что SiglecG-ассоциированный SHP1 может участвовать в негативной регуляции. Эти данные привели к новой модели, в которой взаимодействие CD24-Siglec G/10 может играть ключевую роль в различении патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и DAMP (ФИГ. 4).

[0088] Функцию CD24 могут объяснять по меньшей мере два перекрывающихся механизма. Во-первых, путем связывания с различными DAMP CD24 может захватывать воспалительные стимулы, чтобы предотвратить их взаимодействие с TLR или RAGE. Эту концепцию подтверждают наблюдения, что CD24 ассоциирует с несколькими молекулами DAMP, включая HSP70, 90, HMGB1 и нуклеолин. Затем, вероятно, после ассоциации с DAMP, CD24 может стимулировать передачу сигналов посредством Siglec G. Оба механизма могут действовать согласованно, поскольку у мышей с направленной мутацией любого из этих генов развивалась гораздо более сильная воспалительная реакция. Действительно, ДК, выращенные из костного мозга мышей CD24^{-/-} или Siglec G^{-/-}, продуцировали значительно более высокие уровни воспалительных цитокинов при стимуляции посредством HMGB1, HSP70 или HSP90. Напротив, не наблюдалось никакого эффекта при их ответе на PAMP, такой как LPS и PolyI:C. Эти данные не только позволили установить механизм, позволяющий врожденной иммунной системе отличать патоген от повреждения ткани, но также дают основания полагать, что CD24 и Siglec G являются потенциальными терапевтическими мишенями для заболеваний, связанных с повреждениями тканей.

Пример 3

CD24Fc взаимодействует с HMGB1, Siglec 10 и индуцирует ассоциацию между Siglec G и SHP-1

[0089] Чтобы измерить взаимодействие между CD24Fc и Siglec 10, авторы иммобилизовали CD24Fc на CHIP и использовали Biacore для измерения связывания различных концентраций Siglec-10Fc. Как показано на ФИГ. 5а, CD24Fc связывается с Siglec 10 с Kd, равной $1,6 \times 10^{-7}$ М. Эта аффинность в 100 раз превышает контрольный Fc. Взаимодействие между CD24Fc и HMGB1 было подтверждено экспериментами «pull down» с использованием микросфер с CD24Fc-связанным белком G с последующим вестерн-блоттингом с анти-IgG или анти-HMGB1. Эти данные демонстрируют, что CD24Fc, но не Fc, связывается с HMGB1, и что это связывание является катион-зависимым (ФИГ. 5b). Чтобы определить, является ли CD24Fc агонистом Siglec G – мышинового аналога человеческого Siglec 10 – авторы стимулировали CD24^{-/-} клетки селезенки с помощью CD24Fc, контрольного Fc или контроля носителем (PBS) в течение 30 минут. Затем Siglec G подвергали иммунопреципитации и зондировали антителом к фосфотирозину или анти-SHP-1. Как показано на ФИГ. 5с, CD24Fc индуцировал значительное фосфорилирование Siglec G и ассоциацию SHP-1 – хорошо известного ингибитора как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

[0090] Исследования эффективности CD24Fc *in vitro*.

[0091] Чтобы изучить влияние CD24Fc на продукцию воспалительных цитокинов человеческими Т-клетками, зрелые Т-клетки в человеческих PBML (мононуклеарные лейкоциты периферической крови) были активированы анти-CD3 антителом (ОКТ3) – широко используемым агонистом Т-клеточного рецептора – в присутствии различных концентраций CD24Fc или Fc человеческого IgG1. Через четыре дня супернатанты собирали и измеряли продукцию IFN- γ и TNF- α с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) для подтверждения активации. Результаты на ФИГ. 6 продемонстрировали, что CD24Fc из двух различных производственных партий значительно снижал продукцию IFN- γ и TNF- α из активированных человеческих PBML по сравнению с контролем контрольным Fc IgG. Кроме того, при добавлении CD24Fc продукция цитокинов была ингибирована дозозависимым образом. Следовательно, CD24Fc способен ингибировать индуцированную анти-CD3 активацию человеческих PBML *in vitro*. Это исследование не только показало, что механизм действия CD24Fc может заключаться в ингибировании активации Т-клеток, но также позволило установить надежный биоанализ для тестирования активности и стабильности лекарственного средства.

[0092] Чтобы определить, регулирует ли CD24Fc продукцию воспалительных цитокинов в линии человеческих клеток, авторы сначала вызвали сайленсинг CD24 в линии клеток острого моноцитарного лейкоза человека THP1 с помощью РНКи, а затем индуцировали дифференцировку в макрофаги путем обработки их РМА. Как показано на ФИГ. 7а, сайленсинг CD24 существенно увеличивал продукцию TNF α , IL-1 β и IL-6. Эти данные демонстрируют ключевую роль эндогенного человеческого CD24 в ограничении продукции воспалительных цитокинов. Важно отметить, что CD24Fc восстанавливал ингибирование TNF α в линии клеток с подвергнутым сайленсингу CD24 (ФИГ. 7b), а также IL-1 β и IL-6. Эти данные не только демонстрируют роль CD24 в воспалительной реакции человеческих клеток, но также обеспечивают простой анализ для оценки биологической активности CD24Fc.

[0093] В совокупности эти данные демонстрируют, что CD24Fc способен ингибировать продукцию цитокинов, запускаемую адаптивными и врожденными стимулами. Однако, поскольку лекарственное средство гораздо более эффективно в снижении продукции цитокинов врожденными эффекторами, авторы полагают, что основным механизмом, лежащим в основе его профилактической функции, является предупреждение воспаления, вызываемого повреждениями тканей на ранней стадии трансплантации.

Пример 4

Фармакокинетика CD24 у людей

[0094] В этом примере показан анализ фармакокинетики белка CD24 у людей. Данные были получены в рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании однократных нарастающих доз фазы I для оценки безопасности, переносимости и ФК (фармакокинетики) CD24Fc у здоровых взрослых мужчин и женщин. Всего в этом исследовании приняли участие 40 субъектов в 5 когортах по 8 человек в каждой. Шесть из 8 субъектов в каждой когорте получали исследуемое лекарственное средство, а 2 субъекта получали плацебо (0,9% хлорид натрия, физиологический раствор). Первая когорта получала дозу 10 мг. Последующие когорты получали 30 мг, 60 мг, 120 мг и 240 мг CD24Fc или соответствующего плацебо с интервалом не менее 3 недель между ними, чтобы можно было проанализировать данные о безопасности и переносимости для каждой предыдущей когорты. Введение следующей более высокой дозы новой когорте субъектов разрешалось только в том случае, если была продемонстрирована адекватная безопасность и переносимость.

[0095] В каждой когорте первыми 2 субъектами были 1 реципиент исследуемого лекарственного средства и 1 реципиент плацебо в 1 день. Субъекты с 3-го по 5-й и с 6-го по 8-й получали дозу после 7 дня (между подгруппами выдерживали интервал минимум 24 часа). Каждому субъекту в той же подгруппе вводили дозу с интервалом не менее 1 часа. При необходимости введение доз остальным субъектам откладывалось до рассмотрения любых значимых проблем безопасности, которые могли возникнуть в период после введения дозы с участием первой или второй подгрупп в этой когорте. Последующая когорта получала дозу по меньшей мере через 3 недели после предыдущей когорты.

[0096] Период скрининга:

[0097] Скрининговое посещение (посещение 1) проводилось за 21 день до начала активного периода лечения. После предоставления информированного согласия субъекты проходили процедуры скрининга на соответствие критериям.

[0098] Период лечения:

[0099] Субъекты были госпитализированы в отделение клинической фармакологии (CPU) в -1 день (посещение 2), и период рандомизированного лечения начинали на 1 день после минимум 10-часового ночного голодания. Субъектам было случайным образом назначено

лечение CD24Fc или плацебо в виде однократной дозы. Субъекты оставались в больнице до утра 4 дня.

[0100] Последующее наблюдение:

[0101] Все субъекты вернулись в CPU на 7 день, 14 день, 21 день, 28 день и 42 день (± 1 день) для контрольных посещений (посещение 3, посещение 4, посещение 5, посещение 6 и посещение 7). Посещение 7 было последним посещением для всех субъектов.

[0102] Продолжительность лечения: Общая продолжительность исследования для каждого субъекта составила до 63 дней. Введение однократной дозы осуществляли в 1 день.

[0103] Количество субъектов:

[0104] Запланированное: 40 субъектов

[0105] Прошло скрининг: 224 субъекта

[0106] Прошло рандомизацию: 40 субъектов

[0107] Завершило исследование: 39 субъектов

[0108] Досрочно завершило исследование: 1 субъект

[0109] Диагноз и основные критерии включения: В данном исследовании участвовали здоровые мужчины и женщины в возрасте от 18 до 55 лет включительно с индексом массы тела от 18 кг/м² до 30 кг/м² включительно.

[0110] Информация об исследуемом препарате и препарате сравнения:

[0111] CD24Fc: однократная доза 10 мг, 30 мг, 60 мг, 120 мг или 240 мг, вводимая посредством в/в инфузии; номер партии: 09MM-036. CD24Fc представлял собой полностью гуманизированный слитый белок, состоящий из зрелой последовательности человеческого CD24 и области кристаллизующегося фрагмента человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1Fc). CD24Fc поставлялся в виде стерильного, прозрачного, бесцветного, не содержащего консервантов водного раствора для в/в введения. CD24Fc был приготовлен в виде раствора для инъекций с однократной дозой при концентрации 10 мг/мл и pH 7,2. Каждый флакон с CD24Fc содержал 160 мг CD24Fc, 5,3 мг хлорида натрия, 32,6 мг гептагидрата гидрофосфата натрия и 140 мг моногидрата дигидрофосфата натрия в 16 мл \pm 0,2 мл CD24Fc. CD24Fc поставлялся во флаконах из прозрачного боросиликатного стекла с хлорбутилкаучуковыми пробками и алюминиевыми предохранительными колпачками.

[0112] Соответствующее плацебо (0,9% хлорид натрия, физиологический раствор) вводили в/в; номера партий: P296855, P311852, P300715, P315952.

[0113] Популяция пациентов с назначенным исследуемым лечением («intent-to-treat», ИТТ) состояла из всех субъектов, получивших по меньшей мере 1 дозу исследуемого лекарственного средства. Популяция ИТТ была первичной анализируемой популяцией для получения информации о субъектах и оценки безопасности.

[0114] Клинические лабораторные исследования (биохимический анализ, общий анализ и анализ мочи) обобщали в зависимости от лечения и посещения. Также были обобщены изменения по сравнению с исходным уровнем. Показатели жизненно важных функций (артериальное давление, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания и температуру) обобщали в зависимости от лечения и момента времени. Также были обобщены изменения по сравнению с исходным уровнем. Были перечислены все данные физикального обследования. Были обобщены параметры электрокардиограммы и изменения по сравнению с исходным уровнем. Были перечислены общие интерпретации.

[0115] Концентрация CD24Fc в плазме

[0116] Как показано на ФИГ. 8, средняя концентрация CD24Fc в плазме увеличивалась пропорционально введенной дозе CD24Fc. Для всех дозовых групп, кроме 120 мг, максимальная средняя концентрация CD24Fc в плазме была достигнута через 1 час после введения дозы. Максимальная средняя концентрация CD24Fc в плазме для группы 120 мг была достигнута через 2 часа после введения дозы. К 42 дню (984 часа) средняя концентрация CD24Fc в плазме для всех групп снизилась до 2–4% от максимальной средней концентрации в плазме.

[0117] В таблице 1 приведены сводные ФК параметры CD24Fc в плазме в зависимости от лечения для популяции, пригодной для оценки ФК.

Таблица 1. Сводные фармакокинетические параметры CD24Fc в плазме в зависимости от лечения – популяция, пригодная для оценки ФК

Параметр статистика	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
C _{max} (нг/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	2495 (576)	9735 (1715)	30 083 (7179)	52 435 (9910)	95 865 (10 734)

Параметр статистика	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
CV%	23,1	17,6	23,9	18,9	11,2
Медиана	2371	9218	29 026	50 401	93 206
Мин, макс	1 967, 3 390	8 583, 13 086	22 557, 42 628	40 434, 65 704	81 296, 110 110
Геометрическое среднее	2 442	9 625	29 424	51 666	95 365
Геометрический CV%	22,8	16,1	23,0	19,0	11,2
AUC _{0-42д} (нг*ч/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	423 061 (99 615)	1 282 430 (88 798)	3 226 255 (702 862)	6 541 501 (2 190 944)	12 704 705 (1 918 596)
CV%	23,5	6,9	21,8	33,5	15,1
Медиана	434 043	1 302 719	3 124 933	5 785 142	12 563 426
Мин, макс	291 020, 528 079	1 175 733, 1 403 024	2 487 550, 4 139 748	4 485 193, 9 415 266	10 466 635, 15 693 606
Геометрическое среднее	412 795	1 279 851	3 163 252	6 249 552	12 586 731
Геометрический CV%	25,0	7,0	22,0	33,8	15,0
AUC _{0-inf} (нг*ч/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	462 260 (116 040)	1 434 464 (131 316)	3 497 196 (705 653)	7 198 196 (2 458 320)	13 861 796 (1 962 780)
CV%	25,1	9,2	20,2	34,2	14,2
Медиана	470 426	1 422 205	3 519 732	6 463 665	13 713 034
Мин, макс	310 956, 596 599	1 281 715, 1 650 503	2 703 655, 4 309 023	4 910 640, 10 479 940	11 822 988, 17 175 236
Геометрическое среднее	449 583	1 429 578	3 437 036	6 862 129	13 750 972
Геометрический CV%	26,7	9,0	20,7	34,6	13,8
T _{max} (ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	1,15 (0,42)	1,17 (0,41)	1,01 (0,01)	1,34 (0,51)	1,33 (0,52)

Параметр статистика	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
CV%	36,1	35,0	1,2	38,0	38,7
Медиана	1,00	1,00	1,00	1,03	1,00
Мин, макс	0,92, 2,00	1,00, 2,00	1,00, 1,03	1,00, 2,00	1,00, 2,00
t _{1/2} (ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	280,83 (22,37)	327,10 (41,32)	279,82 (65,59)	286,45 (23,38)	285,33 (24,33)
CV%	8,0	12,6	23,4	8,2	8,5
Медиана	279,61	317,23	264,69	290,76	287,74
Мин, макс	258,87, 321,26	289,82, 394,24	210,18, 362,46	243,89, 309,26	249,24, 322,26
AUC _{extr} (%)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	7,61 (2,14)	10,44 (2,94)	7,88 (4,26)	8,92 (1,94)	8,46 (1,99)
CV%	28,1	28,2	54,0	21,8	23,5
Медиана	7,16	10,01	6,35	9,27	8,45
Мин, макс	5,46, 11,47	7,10, 15,05	3,92, 14,48	5,49, 10,99	5,56, 11,50
CL (л/ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	0,0229 (0,0061)	0,0211 (0,0019)	0,0178 (0,0036)	0,0183 (0,0058)	0,0176 (0,0023)
CV%	26,7	8,8	20,5	31,7	13,3
Медиана	0,0216	0,0211	0,0173	0,0191	0,0175
Мин, макс	0,0168, 0,0322	0,0182, 0,0234	0,0139, 0,0222	0,0115, 0,0244	0,0140, 0,0203
Vd (л)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (СКО)	9,153 (1,943)	9,867 (0,804)	7,289 (2,592)	7,491 (2,202)	7,276 (1,426)
CV%	21,2	8,1	35,6	29,4	19,6
Медиана	8,507	10,007	7,486	7,691	7,151

Параметр статистика	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
Мин, макс	7,326, 12,010	8,771, 10,958	4,222, 11,139	4,933, 9,974	5,814, 9,438
<p>$AUC_{0-42д}$ = площадь под кривой зависимости концентрации от времени с 0 момента времени до 42 дня; AUC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированной от времени 0 до бесконечности; AUC_{extr} = процент от AUC_{0-inf} для экстраполяции от момента последней измеримой концентрации для каждого субъекта до бесконечности; CL = общий клиренс; C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства в плазме; $CV\%$ = коэффициент вариации; Мин = минимум; макс = максимум; SKO = среднеквадратическое отклонение; $t_{1/2}$ = конечный период полувыведения; T_{max} = время достижения максимальной наблюдаемой концентрации лекарственного средства в плазме; V_d = объем распределения.</p>					

[0118] Анализ пропорциональности дозе CD24Fc в плазме

[0119] На ФИГ. 9 показан график пропорциональности дозе для зависимости C_{max} CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК. На ФИГ. 10 показан график пропорциональности дозе для зависимости $AUC_{0-42д}$ CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК. На ФИГ. 11 показан график пропорциональности дозе для зависимости AUC_{0-inf} CD24Fc от дозы для популяции, пригодной для оценки ФК. В таблице 2 представлен анализ статистической мощности пропорциональности дозе.

Таблица 2. Анализ статистической мощности пропорциональности дозе: фармакокинетические параметры CD24Fc в плазме - популяция, пригодная для оценки ФК

Параметр статистика	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)	Пропорциональность дозе		
						Оценка углового коэффициента	Стандартная ошибка	90% ДИ
C_{max} (нг/мл)						1,172	0,040	(1,105, 1,240)
Геометрическое среднее	2 441,8	9 624,9	29 424,4	51 666,4	95 364,9			
Геометрический CV%	22,8	16,1	23,0	19,0	11,2			
AUC_{0-42d} (нг*ч/мл)						1,088	0,036	(1,027, 1,148)
Геометрическое среднее	412 794,8	1 279 850,8	3 163 251,7	6 249 551,9	12 586 731,3			
Геометрический CV%	25,0	7,0	22,0	33,8	15,0			
AUC_{0-inf} (нг*ч/мл)						1,087	0,036	(1,026, 1,148)
Геометрическое среднее	449 583,5	1 429 577,5	3 437 035,6	6 862 128,7	13 750 972,4			
Геометрический CV%	26,7	9,0	20,7	34,6	13,8			

Геометрический CV% = $100 * \sqrt{\exp(\text{CKO}^2) - 1}$, где CKO – среднее квадратическое отклонение логарифмически преобразованных данных. Степенная модель была адаптирована с помощью ограниченного максимального правдоподобия, путем регрессии логарифмически преобразованного ФК параметра по логарифмически преобразованной дозе. И точка пересечения, и угловой коэффициент были аппроксимированы как фиксированные эффекты.

Пропорциональность дозе не отбрасывалась, если 90% ДИ находится в пределах (0,8, 1,25).
 $AUC_{0-42д}$ = площадь под кривой зависимости концентрации от времени с 0 момента времени до 42 дня; AUC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированной от времени 0 до бесконечности; ДИ = доверительный интервал; C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства в плазме; CV% = коэффициент вариации; ФК = фармакокинетический; СКО = среднее квадратическое отклонение.

[0120] Оценка углового коэффициента C_{\max} составила 1,172 с 90% ДИ от 1,105 до 1,240.

Оценка углового коэффициента AUC_{0-42d} составила 1,088 с 90% ДИ от 1,027 до 1,148.

Оценка углового коэффициента AUC_{0-inf} составила 1,087 с 90% ДИ от 1,026 до 1,1.

[0121] Выводы в отношении фармакокинетики

[0122] C_{\max} и AUC CD24Fc в плазме возрастали пропорционально дозам, вводимым мышам, обезьянам и человеку. CD24Fc в плазме достигал T_{\max} между 1,01 и 1,34 часа. $T_{1/2}$ CD24Fc в плазме находился в диапазоне от 280,83 до 327,10 часов.

Пример 5

CD24 может быть использован для лечения реакции «трансплантат против хозяина» у людей

[0123] Было проведено многоцентровое, проспективное, двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование с повышением дозы фазы IIa для оценки добавления белка CD24, CD24Fc, к стандарту медицинской помощи для профилактики острой РТПХ у онкологических больных, проходящих аллогенную миелоаблативную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГК). Дизайн исследования показан на ФИГ. 12.

[0124] Основные цели исследования фазы IIa включают оценку безопасности и переносимости CD24Fc в сочетании с профилактикой метотрексатом и такролимусом у пациентов, проходящих ТГК от HLA-совместимого неродственного донора после миелоаблативного кондиционирования, а также определение рекомендуемой дозы фазы 2 (RP2D) или максимальной переносимой дозы (МПД). Кроме того, дополнительные цели по оценке эффективности в исследовании фазы IIa включают:

[0125] - определение того, снижает ли добавление CD24Fc к стандартным препаратам для профилактики РТПХ, метотрексату и такролимусу, кумулятивную частоту развития оРТПХ (острой РТПХ) II-IV степени на 100 день после ТГК

[0126] - оценку выживаемости без оРТПХ II – IV степени (GFS) на 180 день после ТГК,

[0127] - описание частоты развития хРТПХ (хронической РТПХ, хРТПХ) через 1 год

[0128] - описание частоты рецидива через год после ТГК

[0129] - описание частоты трансплантационной летальности (TRM) через год после ТГК

[0130] - описание частоты инфекций на 100 день после ТГК

[0131] - оценку общей выживаемости (ОВ), отсутствия РТПХ III-IV степени и безрецидивной выживаемости через год после ТКГ

[0132] - оценку токсичности режимов кондиционирования, включая мукозит полости рта и органную недостаточность

[0133] Другие цели включают оценку фармакокинетического (ФК) профиля CD24Fc, изучение профиля иммунных клеток и функциональных ответов АПК и Т-клеток после ТКГ в группах CD24Fc и плацебо, а также оценку фармакодинамических (ФД) биомаркеров, таких как плазменные концентрации провоспалительных цитокинов, DAMP, липидов и биомаркеров РТПХ в группах CD24Fc и плацебо.

[0134] В исследование были включены пациенты, получающие трансплантаты от HLA-совместимых неродственных доноров, проходящие аллогенную ТКГ в соответствии с практикой лечебного учреждения. Критериям включения в исследование удовлетворяли пациенты в возрасте от 18 до 70 лет, проходящие аллогенную ТКГ от HLA-совместимого неродственного донора для лечения злокачественного гематологического заболевания, с индексом общего состояния по шкале Карновского 70 % или более. Требовалось совместимость по 8/8 HLA-аллелям между неродственным донором и реципиентом по HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1. Ожидается, что ограничение исследования пациентами, проходящими ТКГ от неродственных доноров, ограничит неоднородность и упростит статистические оценки частоты развития оРТПХ для последующих оценок эффективности, учитывая более высокую частоту развития оРТПХ II-IV степени (60-80%) и оРТПХ III-IV степени (20 - 35%) в этой популяции.

[0135] В этом исследовании использовались исключительно миелоаблативные режимы кондиционирования и стандарт медицинской помощи (SOC) для профилактики, включающий такролимус и метотрексат, поскольку у этих пациентов наблюдается наиболее серьезное повреждение тканей, и лекарственное средство, вероятно, будет оказывать самое сильное биологическое действие в этих условиях. Все пациенты получали миелоаблативное кондиционирование и стандарт медицинской помощи для профилактики РТПХ с метотрексатом и такролимусом в соответствии с протоколом фазы Па. Пациенты получали миелоаблативный режим кондиционирования, состоящий либо из флударабина и бусульфана (Flu/Bu 4), либо из циклофосфида и тотального облучения тела (Су/ТВИ), по решению лечащего врача, с последующей инфузией стволовых клеток в 0 день. Профилактику РТПХ проводили всем пациентам, и она состояла из такролимуса (начинали в -3 день до трансплантации) и метотрексата (начинали на +1 день после трансплантации) в сочетании с CD24Fc в группе лечения или физиологическим раствором

в группе плацебо. При отсутствии РТПХ снижение дозы такролимуса начинали на +100 день. Источником донорских стволовых клеток были стволовые клетки периферической крови (PBSC) или костный мозг (BM).

[0136] Исследование фазы IIa включало две когорты однократных нарастающих доз (240 мг и 480 мг) и одну когорту многократных доз CD24Fc в дополнение к SOC профилактике РТПХ, как показано в таблице 3 ниже. Как показано на ФИГ. 13, в когорте однократной дозы исследуемый препарат, CD24Fc, вводили внутривенно в -1 день относительно дня трансплантации стволовых клеток. В когорте многократных доз пациенты получали 3 введения CD24Fc раз в две недели в дозе 480 мг (-1 день), 240 мг (+14 день) и 240 мг (+28 день). Основываясь на ФК данных для CD24Fc, этот период дозирования раз в две недели обеспечивает прохождение более двух периодов полувыведения. Дозировка основана на фиксированном количестве, а не на весе или ППТ (площадь поверхности тела). В каждую когорту дозирования включали 8 субъектов с использованием схемы рандомизации в соотношении 3:1 (6 субъектов CD24Fc и 2 плацебо) для включения в общей сложности 24 пациентов.

Таблица 3. План повышения дозы фазы 2a

Уровень	Доза	Режим дозирования	CD24Fc (кол-во)	Плацебо (кол-во)
-1	120 мг	-1 день	6	2
0	240 мг	-1 день	6	2
1	480 мг	-1 день	6	2
2	960 мг (многократные дозы)	480 мг (-1 день)*	6	2
		240 мг (14 день)		
		240 мг (28 день)		

[0137] В таблице 4 представлены демографические данные и клинические характеристики пациентов из когорт CD24Fc и плацебо, которые были относительно сбалансированы по таким факторам риска, как возраст, злокачественные заболевания и сопутствующие заболевания. Наиболее частым злокачественным заболеванием как в когорте CD24Fc, так и в когорте плацебо был ОМЛ/МДС (66,7% и 83,3%). 72% пациентов в когорте CD24Fc и 50% в группе плацебо имели средний или высокий индекс коморбидности. PBSC чаще использовали в качестве источника трансплантата по сравнению с костным мозгом в обеих когортах, и Flu/Bu 4 был наиболее часто использованным режимом кондиционирования в обеих когортах. У четырех пациентов, все из когорт CD24Fc, было проведено кондиционирование Су/ТБИ.

Таблица 4. Характеристики пациентов фазы 2а

		CD24Fc + TAC/MTX (N = 18)	Плацебо TAC/MTX (N = 6)
Возраст (лет)	Медиана (диапазон)	62 (23-68)	57 (36-66)
Пол (N, %)	Женский	7 (38,8)	2 (33,3)
	Мужской	11 (61,1)	4 (66,7)
Источник трансплантата (N, %)	PBSC	15 (83,3)	4 (66,7)
	BM	3 (16,7)	2 (33,3)
Злокачественное заболевание (N, %)	ОМЛ/МДС	12 (66,7)	5 (83,3)
	ХМЛ	2 (11,1)	0 (0)
	ХММЛ	1 (5,6)	1 (16,7)
	ОЛЛ	3 (16,7)	0 (0)
Индекс коморбидности (оценка по шкале)	Низкий (0)	5	3
	Средний (1-2)	9	2
	Высокий (3-4)	4	1
Цитомегаловирус- ный статус	D+, R+	5	1
	D+, R-	1	0
	D-, R+	3	1
	D-, R-	8	4
Режим кондиционирования (N)	Flu/Bu 4	14 (77,8)	6 (100)
	Sy/TBI	4 (22,2)	0 (0)
День приживления (день)	Нейтрофилы (мин, макс)	13,0 (12, 23)	15,5 (12, 18)
	Тромбоциты (мин, макс)	13,0 (9, 23)	15,0 (11, > 48)

BM = костный мозг; Sy/TBI = циклофосфамид/тотальное облучение тела; D = донор; Flu/Bu 4 = флударабин/бусульфид; R = реципиент

[0138] Основными целями исследования являются: оценка безопасности и переносимости CD24Fc у субъектов, проходящих миелоаблативную аллогенную трансплантацию гемопоэтических клеток (ТГК); и определение рекомендованной дозы фазы II (RP2D) или максимальной переносимой дозы (МПД) CD24Fc у пациентов, проходящих ТГК.

[0139] Все пациенты, включенные в исследование, завершили период лечения, который является периодом с первого дня лечения CD24Fc вплоть до 30 дней после ТГК для когорт однократной дозы или 60 дней после ТГК для когорты многократных доз (точные дни могут варьироваться в зависимости от последнего дня введения исследуемого лекарственного средства, не будучи при этом отклонением) и представляет собой период оценки и составления отчетности в отношении нежелательных явлений (НЯ), включая дозопонижающие токсичности, потенциально связанные с исследуемым лекарственным средством. В таблице 5 представлена сводная информация о токсичностях, наблюдаемых

в клиническом исследовании фазы 2a. В целом это исследование продемонстрировало, что в/в введение CD24Fc в дозе до 480 мг в целом хорошо переносится пациентами в популяции с назначенным исследуемым лечением (ИТТ). Не наблюдалось инфузионных токсичностей, дозолимитирующих токсичностей (ДЛТ) или СНЯ (серьезных нежелательных явлений), связанных или вероятных связанных с исследуемым лекарственным средством, и ни один пациент не был исключен из исследования.

[0140] Все 24 субъекта, включенные в исследование, продемонстрировали приживание после трансплантации, как показано на фиг. 14. Нейтрофилы прижились через медианный период 13,0 и 15,5 дней после ТКГ у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, и пациентов, получавших плацебо, соответственно. Тромбоциты прижились через медианный период 13,0 и 15,0 дней после ТКГ у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, и пациентов, получавших плацебо, соответственно, за исключением одного пациента в группе плацебо, у которого тромбоциты не прижились и который умер на 49 день. Случаев недостаточности трансплантата отмечено не было. Медиана химеризма CD3 на +30 день составила 82,5% (диапазон 38-100%) у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, и 82,0% (диапазон 62%-91%) в группе плацебо (фиг. 15). Медиана донорского химеризма CD3 увеличилась до 86% (диапазон, 42%-100%) на 100 день у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, и до 84% (диапазон, 17%-100%) в группе плацебо. Донорский химеризм CD33 на 30 и 100 день составлял 100% как в группе CD24Fc, так и в группе плацебо.

Таблица 5. Сводные данные по токсичности

Когорта	Лечение	Кол-во пациентов	Инфузионная реакция	СНЯ	ДЛТ
Однократная доза 240 мг	CD24Fc	6	0	1	0
	Плацебо	2	0	2	0
Однократная доза 480 мг	CD24Fc	6	0	0	0
	Плацебо	2	0	1	0
Множественные дозы	CD24Fc	6	0	4	0
	Плацебо	2	0	2	1

[0141] Анализы эффективности для исследования фазы 2a считаются вторичными и включают следующее: описание выживаемости без острой РТПХ (GFS) III-IV степени на

180 день после ТГК; описание кумулятивной частоты развития острой РТПХ II-IV степени на 100 день после ТГК; описание выживаемости без рецидива и РТПХ III-IV степени на 180 день после ТГК; описание выживаемости без острой РТПХ II-IV степени на 180 день после ТГК; описание частоты развития хронической РТПХ через год после ТГК; описание частоты рецидива через год после ТГК; описание частоты трансплантационной летальности (TRM) через год после ТГК; описание частоты инфекции на 100 день после ТГК; оценку общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без признаков заболевания (DFS) через год после ТГК.

[0142] В дополнение к включению группы плацебо в исследование фазы IIa, были собраны данные о современных внешних контролях (N = 92) из тех же учреждений, проходящих ТГК от HLA-совместимого неродственного донора после тех же миелоаблативных режимов кондиционирования и режимов профилактики РТПХ (за вычетом экспериментальной терапии CD24Fc), за период с января 2012 г. по ноябрь 2017 г. Современная внешняя контрольная когорта была включена ввиду небольшого количества пациентов в контрольной группе плацебо. Сводные демографические данные 92 взрослых пациентов из современной внешней контрольной когорты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Характеристики пациентов, включенных в современную внешнюю контрольную когорту

		ТАС/MTX (N = 92)
Возраст (лет)	Медиана (диапазон)	49 (21-69)
Пол (N, %)	Женский	41 (44,5)
	Мужской	51 (55,5)
Злокачественное заболевание (N, %)	ОМЛ/МДС	63 (68,5)
	ХМЛ	3 (3)
	ХММЛ	2 (2)
	ОЛЛ	24 (26,5)

[0143] В таблицах 7 и 8 представлен обзор клинических исходов исследования фазы 2a. Классификация острой РТПХ проводилась в соответствии с согласованными рекомендациями, используемыми в международном реестре Центра международных исследований трансплантации крови и костного мозга (CIBMTR) и Сетью по клиническим исследованиям при трансплантации крови и костного мозга (Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network), и регистрировалась еженедельно. Пациентов оценивали на наличие оРТПХ после получения ТГК, начиная с 0 дня до 100 дня после ТГК.

Таблица 7. Обзор клинических исходов, включая кумулятивную частоту развития оРТПХ II-IV и III-IV степеней.

Когорта	оРТПХ (180 день)	Рецидив (180 день)	Смерть (180 день)
1) Однократная доза: 240 мг (N=6)	Ст. II: 2 (кожа) Ст. III: 0 Ст. IV: 0 Ст. II-IV: 33,3% (95% ДИ, 3,2, 70,4) Ст. III-IV: 0%	0	0
2) Однократная доза: 480 мг (N=6)	Ст. II: 2 (кожа и верхний отдел ЖКТ) Ст. III: 1 (нижний отдел ЖКТ) Ст. IV: 0 Ст. II-IV: 50,0% (95% ДИ, 7,7, 82,9) Ст. III-IV: 16,7%	1 ХММЛ (161 д)	0
3) Многократные дозы: (N=6)	Ст. II: 2 (кожа и верхний отдел ЖКТ) Ст. III: 0 Ст. IV: 0 Ст. II-IV: 33,3% (95% ДИ, 3,2, 70,4) Ст. III-IV: 0%	1 ОЛЛ (103 д)	0
Всего CD24Fc:	Ст. II: 6 Ст. III: 1 Ст. IV: 0 Ст. II-IV: 38,9% (95% ДИ, 16,8, 60,7) Ст. III-IV: 5,6%	2/18 (11,1%)	0/18*
Плацебо (N=6)	Ст. II: 0 Ст. III: 1 (нижний отдел ЖКТ) Ст. IV: 0 Ст. II – IV: 16,7% (95% ДИ, 0,5, 54,9) Ст. III – IV: 16,7%	2/6 (33,3%)	1/6 (16,7%)
Современный внешний контроль (N=92)	Ст. II: 22 Ст. III: 16 Ст. IV: 3 Ст. II-IV: 50% (смерть как конкурирующий фактор) (95% ДИ, 39,8, 60,2) Ст. III-IV: 24% (смерть как конкурирующий фактор) (95% ДИ, 17, 31)	19/92 (23,1%) (Смерть как конкурирующий фактор)	22/92 (23,9%)

* Смерти (n=2) после 180 дня: Когорта 1, пневмония 2/2 инфекций (210 д) и когорта 2, рецидив ХММЛ (196 д)

Таблица 8. Сводные данные по клиническим исходам

	CD24Fc	Плацебо	Статистическая значимость
Количество	18	6	
oРТПХ III-IV			
100 день	6%	17%	
180 день	6%	17%	
Рецидив через 1 год	11%	33%	
NRM через 1 год	6%	17%	
RFS через 1,5 года	83%	50%	
ОВ через 1,5 года	89%	50%	P=0,046
180-дневная выживаемость без рецидива и ст. III-IV	83%	33%	P=0,01

[0144] Частота развития острой реакции «трансплантат против хозяина» II-IV степени к 100 дню

[0145] В таблице 9 приведены сводные данные по кумулятивной частоте развития острой РТПХ II-IV степени к 100 дню для популяции mITT (модифицированной популяции ITT). В общей сложности 7 (38,9%) пациентов, получавших CD24Fc (2 [33,3%] пациента в когорте однократной дозы 240 мг CD24Fc, 3 [50,0%] пациента в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc и 2 [33,3%] пациента в когорте многократных доз 960 мг CD24Fc), и 1 (16,7%) пациент, получавший плацебо, к 100 дню имели острую РТПХ II-IV степени. Кроме того, 1 (16,7%) пациент, получавший плацебо, умер к 100 дню без острой РТПХ II-IV степени. Оставшиеся в живых пациенты, у которых не развилась острая РТПХ II-IV степени до 100 дня, были цензурированы при их последней оценке на острую РТПХ на 100 день или ранее. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы.

Таблица 9. Кумулятивная частота развития острой реакции «трансплантат против хозяина» II-IV степени к 100 дню – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Многократ- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с острой РТПХ II-IV степени к 100 дню (n, %)	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (50,0)	2 (33,3)	7 (38,9)
Кол-во пациентов,	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

умерших без острой РТПХ II-IV степени к 100 дню (n, %)					
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	4 (66,7)	4 (66,7)	3 (50,0)	4 (66,7)	11 (61,1)
Кумулятивная частота развития (%) острой РТПХ II-IV степени к 100 дню [1]	16,7	33,3	50,0	33,3	38,9
95% ДИ	(0,5, 54,9)	(3,2, 70,4)	(7,7, 82,9)	(3,2, 70,4)	(16,8, 60,7)
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [2]					
Отношение рисков (90% ДИ)					2,6 (0,5, 14,7)
Примечание: 100 день = 100 день (+7 дней) после трансплантации (т. е. 108 день исследования). Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя. 1. Оценки были основаны на шкале оценки CIBMTR. Кумулятивная частота развития (%) острой РТПХ к 100 дню и 95% ДИ были оценены с использованием функции кумулятивной частоты со смертью без острой РТПХ II-IV степени в качестве конкурирующего риска. 2. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели Fine-Gray с лечением в качестве ковариаты и смертью без острой РТПХ II-IV степени в качестве конкурирующего риска. ДИ = доверительный интервал; CIBMTR = Центр международных исследований трансплантации крови и костного мозга; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; Кол-во = количество.					

[0146] В целом кумулятивная частота развития острой РТПХ II-IV степени к 100 дню (с 95% ДИ) составила 38,9% (16,8%, 60,7%) для группы лечения CD24Fc и 16,7% (0,5%, 54,9%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 2,6 (0,5, 14,7). Кумулятивная частота развития оРТПХ II-IV степени составила 50% в современной внешней контрольной группе. В группе лечения CD24Fc четыре случая оРТПХ II степени затрагивали только кожу, а два случая – кожу и верхний отдел желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Случаев оРТПХ II степени в группе плацебо отмечено не было.

[0147] Выживаемость без острой реакции «трансплантат против хозяина» II-IV степени до 180 дня

[0148] В таблице 10 приведены сводные данные по выживаемости без острой РТПХ II-IV степени до 180 дня для популяции mITT. Медиана для выживаемости без острой РТПХ II-IV степени, оцененная по методу Каплана-Мейера, не была достигнута ни в одной группе лечения. В целом частота выживаемости без острой РТПХ II-IV степени на 180 день (с

95% ДИ) составила 61,1% (35,3%, 79,2%) для группы лечения CD24Fc и 50,0% (11,1%, 80,4%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,8 (0,3, 2,5). Пациенты, оставшихся в живых и не имевшие документально подтвержденных случаев острой РТПХ II-IV степени на дату прекращения сбора данных, были цензурированы на дату последней оценки острой РТПХ на 180 день или ранее. В дополнение к небольшому размеру выборки, по меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы.

Таблица 10. Выживаемость без острой реакции «трансплантат против хозяина» II-IV степени до 180 дня – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с событиями (n, %)	3 (50,0)	2 (33,3)	3 (50,0)	2 (33,3)	7 (38,9)
Первое наступившее событие					
Острая РТПХ (II-IV степени)	2 (33,3)	2 (33,3)	3 (50,0)	2 (33,3)	7 (38,9)
Смерть	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	4 (66,7)	3 (50,0)	4 (66,7)	11 (61,1)
Выживаемость без острой РТПХ (II-IV степени) (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [1]					
Медиана (95% ДИ)	NE	NE	NE	NE	NE
Среднее (СКО) [2]	144,2 (74,98)	145,7 (77,01)	116,2 (86,69)	150,5 (68,96)	137,4 (74,81)
Медиана [2]	190,0	195,0	121,0	195,0	195,0
Мин, макс [2]	46, 195+	32, 195+	24, 195+	59, 195+	24, 195+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [3]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,8 (0,3, 2,5)
Доля (%) оставшихся в живых без острой РТПХ (II-IV степени) на 180 день (95% ДИ) [4]	50,0 (11,1, 80,4)	66,7 (19,5, 90,4)	50,0 (11,1, 80,4)	66,7 (19,5, 90,4)	61,1 (35,3, 79,2)
Примечание: 180 день = 180 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 195 день исследования).					
Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.					
3. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием.					
4. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение.					
5. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков					

Кокса с лечением в качестве ковариаты.

6. Оценка по методу Каплана-Мейера.

ДИ = доверительный интервал; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднеквадратическое отклонение.

[0149] Выживаемость без острой РТПХ III-IV степени до 180 дня для популяции mITT

[0150] Как показано в таблице 11, в общей сложности 1 (5,6%) пациент, получавший CD24Fc (1 [16,7%] пациент в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc), и 2 (33,3%) пациента, получавших плацебо, имели острую РТПХ III-IV степени к 180 дню. В целом частота выживаемости без острой РТПХ III-IV степени на 180 день (с 95% ДИ) составила 94,4% (66,6%, 99,2%) для группы лечения CD24Fc и 50,0% (11,1%, 80,4%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,1 (0,0, 0,7). Пациенты, оставшихся в живых и не имевшие документально подтвержденных случаев острой РТПХ III-IV степени на дату прекращения сбора данных, были цензурированы на дату последней оценки острой РТПХ на 180 день или ранее. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы. Частота выживаемости без острой РТПХ III-IV степени на 180 день составила 24% в современной внешней контрольной когорте. На ФИГ. 25 показана 180-дневная выживаемость без РТПХ III-IV степени в группе CD24Fc по сравнению с контрольной группой плацебо (ФИГ. 25A) и современной внешней контрольной группой (ФИГ. 25B).

Таблица 11. Выживаемость без острой реакции «трансплантат против хозяина» III-IV степени до 180 дня – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с событиями (n, %)	3 (50,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)
Первое наступившее событие					
Острая РТПХ (III-IV степени)	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)
Смерть	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	6 (100,0)	5 (83,3)	6 (100,0)	17 (94,4)
Выживаемость без острой РТПХ (III-IV степени) (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [7]					
Медиана (95% ДИ)	NE	NE	NE	NE	NE
Среднее (СКО) [8]	144,2	195,0	166,5	195,0	185,5

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
	(74,98)	(0,00)	(69,81)	(0,00)	(40,31)
Медиана [8]	190,0	195,0	195,0	195,0	195,0
Мин, макс [8]	46, 195+	195+, 195+	24, 195+	195+, 195+	24, 195+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [9]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,1 (0,0, 0,7)
Доля (%) оставшихся в живых без острой РТПХ (III-IV степени) на 180 день (95% ДИ) [10]	50,0 (11,1, 80,4)	100,0 (NE)	83,3 (27,3, 97,5)	100,0 (NE)	94,4 (66,6, 99,2)
Примечание: 180 день = 180 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 195 день исследования). Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя. 7. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием. 8. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение. 9. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков Кокса с лечением в качестве ковариаты. 10. Оценка по методу Каплана-Мейера. ДИ = доверительный интервал; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднее квадратическое отклонение.					

[0151] Все пациенты, у которых развилась оРТПХ в исследовании на момент прекращения сбора данных, ответили на лечение стероидами, по сравнению с 50%-ной частотой ответа, наблюдаемой в современной внешней контрольной когорте. По истечении первых ста дней после ТГК пациентов ежеквартально оценивали на предмет позднего начала оРТПХ (определяемого как начало острой РТПХ после 100 дня) или хРТПХ до одного года после ТГК. Никаких дополнительных событий оРТПХ в когортах CD24Fc после 100 дня после трансплантации не наблюдалось.

[0152] На ФИГ. 16 показана кумулятивная частота развития острой РТПХ II-IV степени и III-IV степени в когорте лечения (CD24Fc). В частности, только у одного пациента развилась РТПХ III степени с вовлечением нижних отделов ЖКТ, а РТПХ печени не наблюдалась. Кумулятивная частота развития оРТПХ III-IV степени на 180 день после ТГК в когортах CD24Fc имела тенденцию к более низким значениям, чем оРТПХ III-IV степени на 180 день в современной внешней контрольной группе (P = 0,097). Имел место

еще один случай оРТПХ III степени на 182 день, который привел к смерти на 184 день, у пациента в группе плацебо. У этого пациента произошел рецидив лейкоза на 145 день. Эти результаты дают основания полагать, что CD24Fc в дополнение к профилактике метотрексатом и такролимусом снижает риск развития более серьезной оРТПХ III и IV степени у пациентов, проходящих ТКК после получения миелоаблативного кондиционирования.

[0153] Выживаемость без признаков заболевания через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

[0154] В таблице 12 приведены сводные данные по выживаемости без признаков заболевания (DFS) через 1 год после ТКК для популяции mITT. Медиана DFS, оцененная по методу Каплана-Мейера, не была достигнута ни в одной группе лечения. В целом, частота DFS через 1 год после ТКК (с 95% ДИ) составила 83,3% (56,8%, 94,3%) для группы лечения CD24Fc и 50,0% (11,1%, 80,4%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,2 (0,1, 0,9). Пациенты, оставшихся в живых и не имевшие рецидива заболевания на конец периода последующего наблюдения, были цензурированы на последнюю дату оценки. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы. На ФИГ. 26 показана безрецидивная выживаемость в группе CD24Fc по сравнению с контрольной группой плацебо (ФИГ. 26А) и современной внешней контрольной группой (ФИГ. 26В).

Таблица 12. Выживаемость без признаков заболевания через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множественные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с событиями (n, %)	3 (50,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (16,7)
Первое наступившее событие					
Рецидив	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Смерть	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	5 (83,3)	5 (83,3)	5 (83,3)	15 (83,3)
Выживаемость без признаков заболевания (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [1]					
Медиана (95% ДИ)	NE	NE	NE	NE	NE
Среднее (СКО) [2]	232,7 (152,48)	342,5 (64,11)	335,2 (92,82)	324,2 (109,89)	333,9 (85,76)
Медиана [2]	256,0	366,0	370,5	366,0	366,0

Мин, макс [2]	49, 371+	212, 378+	146, 380+	100, 376+	100, 380+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [3]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,2 (0,1, 0,9)
Доля (%) оставшихся в живых без рецидива через 1 год после ТКК (95% ДИ) [4]	50,0 (11,1, 80,4)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (56,8, 94,3)
Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования). Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя. 11. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием. 12. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение. 13. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков Кокса с лечением в качестве ковариаты. 14. Оценка по методу Каплана-Мейера. Для 365 дня, если максимальное наблюдаемое время составило <380 дня исследования, для группы лечения представлена оценка по методу Каплана-Мейера на максимальный наблюдаемый момент времени. ДИ = доверительный интервал; ТКК = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднее квадратическое отклонение.					

[0155] Общая выживаемость через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

[0156] В таблице 13 приведены сводные данные по общей выживаемости (ОВ) через 1 год после ТКК для популяции mITТ. Медиана продолжительности ОВ, оцененная по методу Каплана-Мейера, не была достигнута ни в одной группе лечения. В целом, частота ОВ через 1 год (с 95% ДИ) составила 83,3% (56,8%, 94,3%) для группы лечения CD24Fc и 50,0% (11,1%, 80,4%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,2 (0,1, 1,0). Пациенты, которые были живы на конец периода последующего наблюдения, были цензурированы на последнюю дату, на которую было известно о том, что они живы. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы.

Таблица 13. Выживаемость без признаков заболевания через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITТ

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множественные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
------------	------------------	---	---	---	---------------------------

Кол-во умерших пациентов (n, %)	3 (50,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (16,7)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	5 (83,3)	5 (83,3)	5 (83,3)	15 (83,3)
Общая выживаемость (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [1]					
Медиана (95% ДИ)	NE	NE	NE	NE	NE
Среднее (СКО) [2]	276,3 (132,25)	343,0 (64,34)	343,5 (72,45)	367,2 (6,01)	351,2 (53,91)
Медиана [2]	341,5	366,5	370,5	366,0	366,5
Мин, макс [2]	49, 371+	212, 378+	196, 380+	358+, 376+	196, 380+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [3]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,2 (0,1, 1,0)
Доля (%) оставшихся в живых через 1 год после ТГК (95% ДИ) [4]	50,0 (11,1, 80,4)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (56,8, 94,3)
Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования).					
Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.					
15. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием.					
16. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение.					
17. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков Кокса с лечением в качестве ковариаты.					
18. Оценка по методу Каплана-Мейера. Для 365 дня, если максимальное наблюдаемое время составило <380 дня исследования, для группы лечения представлена оценка по методу Каплана-Мейера на максимальный наблюдаемый момент времени.					
ДИ = доверительный интервал; ТГК = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднеквадратическое отклонение.					

[0157] Также обнадеживают оценки общей выживаемости (ОВ) примерно через 800 дней после ТГК для пациентов в исследовании фазы IIa. Общая выживаемость (ОВ) составила около 80% для пациентов в когортах CD24Fc, 50% для пациентов в когорте плацебо (p=0,06) (ФИГ. 20) и 50% для пациентов в современной внешней контрольной группе (p=0,05) (ФИГ. 21). Улучшенная ОВ у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, по сравнению с плацебо и современными внешними контрольными пациентами подтверждает другие результаты, описанные выше, которые демонстрируют, что введение CD24Fc в сочетании с метотрексатом и такролимусом может привести к существенному улучшению исходов у пациентов, проходящих ТГК после миелоаблативного кондиционирования.

[0158] Выживаемость без реакции «трансплантат против хозяина» и безрецидивная выживаемость (aGRFS) до 180 дня

[0159] Терапевтические стратегии, разработанные для предупреждения РТПХ, могут привести к увеличению рецидивов лейкоза из-за снижения эффекта «трансплантат против лейкоза» (ТПЛ). Как показано в таблице 7, частота рецидивов лейкоза у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, на 180 день после ТКК (11%) является более низкой по сравнению с пациентами в группе плацебо (33%) и в современной внешней контрольной группе (23%). У одного субъекта в когорте 480 мг CD24Fc произошел рецидив ХММЛ на 146 день, а у одного субъекта в когорте многократных доз 960 мг CD24Fc произошел рецидив ОЛЛ на 100 день после ТКК. Пациент с ХММЛ скончался на 196 день из-за лейкоза. Пациент с рецидивом ОЛЛ получал лечение блинатумомабом, достиг полной ремиссии и был жив на момент прекращения сбора данных 8 августа 2018 г. В когорте плацебо у одного пациента произошел рецидив ХММЛ на 94 день, а у одного пациента с МДС произошел рецидив на 146 день (пациент с ХММЛ скончался на 316 день, а пациент с МДС скончался на 184 день). Эти результаты дают основания полагать, что CD24Fc не препятствует полезному процессу «трансплантат против опухоли» (ТПО) и может даже снижать риск рецидива лейкоза.

[0160] Число смертей в когортах CD24Fc на 180 день после трансплантации ниже, чем в когорте плацебо и современных внешних контрольных когортах (таблица 7). На 180 день после ТКК не было отмечено смертей ни в одной из когорт CD24Fc, одна смерть от пневмонии произошла в когорте плацебо (16,7%) и 22 смерти в современной внешней контрольной группе (23,9%). Статистически значимые улучшения комбинированной конечной точки выживаемости без рецидива (RFS) и оРТПХ III-IV степени наблюдаются в когортах CD24Fc (83%) по сравнению с группой плацебо (33%) на 180 день после ТКК ($P = 0,011$, см. ФИГ. 18) и современной внешней контрольной группой (53%) на 180 день после ТКК ($P = 0,017$, см. ФИГ. 19). Этот вид конечной точки становится все более популярным, потому что теоретически отражает эффект вмешательства не только на подавление РТПХ, но и на потенциальную токсичность воздействия, инфекцию и рецидив. В подтверждение вышеприведенных наблюдений улучшения в отношении RFS без оРТПХ III-IV степени демонстрируют, что введение CD24Fc в сочетании со стандартом медицинской помощи метотрексатом и такролимусом после миелоаблативного режима кондиционирования благоприятно для пациентов, так как позволяет предупреждать развитие оРТПХ, не влияя при этом на эффекты ТПЛ трансплантата.

[0161] aGRFS до 180 дня после ТКК представляет собой апостериорную комбинированную конечную точку, события в которой включали острую РТПХ III-IV степени, рецидив или смерть по любой причине. В таблице 14 приведены сводные данные по выживаемости без рецидива и острой РТПХ III-IV степени до 180 дня для популяции mITT.

[0162] Медиана выживаемости без рецидива и острой РТПХ III-IV степени, оцененная по методу Каплана-Мейера, не была достигнута для групп лечения CD24Fc. Для группы плацебо медиана выживаемости без рецидива и острой РТПХ III-IV степени, оцененная по методу Каплана-Мейера (с 95% ДИ), составила 120,0 (46,0, не подлежит оценке). В целом частота выживаемости без рецидива и острой РТПХ III-IV степени на 180 день (с 95% ДИ) составила 83,3% (56,8%, 94,3%) для группы лечения CD24Fc и 33,3% (4,6%, 67,6%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,2 (0,0, 0,6). Пациенты, оставшиеся в живых и не имевшие документально подтвержденных случаев острой РТПХ III-IV степени, хронической РТПХ, требующей системной иммуносупрессивной терапии, или рецидива на дату прекращения сбора данных, были цензурированы на дату последней оценки.

Таблица 14. Выживаемость без острой реакции «трансплантат против хозяина» III-IV степени и безрецидивная выживаемость до 180 дня – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с событиями (n, %)	4 (66,7)	0 (0,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	3 (16,7)
Первое наступившее событие					
Острая РТПХ (III-IV степени)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)
Рецидив	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Смерть	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	2 (33,3)	6 (100,0)	4 (66,7)	5 (83,3)	15 (83,3)
Выживаемость без острой РТПХ III-IV степени и безрецидивная выживаемость (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [1]					
Медиана (95% ДИ)	120,0 (46,0, NE)	NE	NE	NE	NE
Среднее (СКО) [2]	120,8 (67,99)	195,0 (0,00)	158,3 (68,67)	179,2 (38,78)	177,5 (45,47)
Медиана [2]	120,0	195,0	195,0	195,0	195,0
Мин, макс [2]	46, 195+	195+, 195+	24, 195+	100, 195+	24,

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
					195+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [3]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,2 (0,0, 0,6)
Доля (%) оставшихся в живых без острой РТПХ III-IV степени или рецидива на 180 день (95% ДИ) [4]	33,3 (4,6, 67,6)	100,0 (NE)	66,7 (19,5, 90,4)	83,3 (27,3, 97,5)	83,3 (56,8, 94,3)
<p>Примечание: 180 день = 180 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 195 день исследования).</p> <p>Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.</p> <p>19. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием.</p> <p>20. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение.</p> <p>21. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков Кокса с лечением в качестве ковариаты.</p> <p>22. Оценка по методу Каплана-Мейера.</p> <p>ДИ = доверительный интервал; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднеквадратическое отклонение.</p>					

[0163] Частота рецидива через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

[0164] В таблице 15 приведены сводные данные по кумулятивной частоте рецидива через 1 год после ТКГ для популяции mITТ. В целом, кумулятивная частота рецидива через 1 год после ТКГ (с 95% ДИ) составила 11,1% (1,7%, 30,4%) для группы лечения CD24Fc и 33,3% (2,9%, 71,1%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,3 (0,1, 1,4). Пациенты, оставшихся в живых и не имевшие рецидива на конец периода последующего наблюдения (365 день [1 год]), были цензурированы на последнюю дату оценки. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы.

Таблица 15. Кумулятивная частота рецидива через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITТ

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг	CD24Fc 480 мг	CD24Fc 960 мг	CD24Fc Всего
------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-----------------

		Однократная доза (N=6)	Однократная доза (N=6)	Множественные дозы (N=6)	(N=18)
Кол-во пациентов с рецидивом к 1 году после ТКГ (n, %)	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Кол-во пациентов, умерших без рецидива к 1 году после ТКГ (n, %)	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	5 (83,3)	5 (83,3)	5 (83,3)	15 (83,3)
Кумулятивная частота (%) рецидива через 1 год после ТКГ (95% ДИ) [1]	33,3 (2,9, 71,1)	0,0 (NE)	16,7 (0,5, 54,9)	16,7 (0,5, 54,9)	11,1 (1,7, 30,4)
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [2]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,3 (0,1, 1,4)
<p>Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования).</p> <p>Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.</p> <p>23. Кумулятивная частота (%) рецидива через 1 год после ТКГ и 95% ДИ были оценены с использованием функции кумулятивной частоты со смертью без рецидива в качестве конкурирующего риска. Для 365 дня, если максимальное наблюдаемое время составило <380 дня исследования, для группы лечения представлена кумулятивная частота на максимальный наблюдаемый момент времени.</p> <p>24. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели Fine-Gray с лечением в качестве ковариаты и смертью без рецидива в качестве конкурирующего риска. ДИ = доверительный интервал; ТКГ = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество.</p>					

[0165] Выживаемость без реакции «трансплантат против хозяина» и безрецидивная выживаемость (GRFS) через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

[0166] Эта GRFS в течение 1 года после ТКГ представляет собой комбинированную конечную точку, события в которой включали острую РТПХ III-IV степени, хроническую РТПХ, требующую системной иммуносупрессивной терапии, рецидив или смерть по любой причине. В таблице 16 приведены сводные данные по выживаемости без рецидива и острой РТПХ III-IV степени через 1 год после ТКГ для популяции mITT.

[0167] Оценка по методу Каплана-Мейера медианы GRFS (с 95% ДИ) составила 229,0 дней (141,0, не подлежит оценке) для всей группы лечения CD24Fc: 247,0 дней (129,0, не подлежит оценке) для когорты однократной дозы 240 мг CD24Fc, 287,0 (24,0, не подлежит оценке) для когорты однократной дозы 480 мг CD24Fc и 193,5 (100,0, не подлежит

оценке) для когорты многократных доз 960 мг CD24Fc. Оценка по методу Каплана-Мейера медианы GRFS (с 95% ДИ) составила 120,0 дней (46,0, не подлежит оценке) для группы плацебо. В целом, частота GRFS через 1 год после ТК (с 95% ДИ) составила 32,4% (12,7%, 54,0%) для группы лечения CD24Fc и 33,3% (4,6%, 67,6%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,7 (0,3, 1,7). Пациенты, оставшиеся в живых и не имевшие документально подтвержденных случаев острой РТПХ III-IV степени, хронической РТПХ, требующей системной иммуносупрессивной терапии, или рецидива на дату прекращения сбора данных, были цензурированы на дату последней оценки.

Таблица 16. Выживаемость без реакции «трансплантат против хозяина» и безрецидивная выживаемость через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Многократные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с событиями (n, %)	4 (66,7)	4 (66,7)	4 (66,7)	4 (66,7)	12 (66,7)
Первое наступившее событие					
Острая РТПХ (III-IV степени)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)
Хроническая РТПХ, требующая системной иммуносупрессивной терапии	0 (0,0)	3 (50,0)	2 (33,3)	3 (50,0)	8 (44,4)
Рецидив	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Смерть	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	6 (33,3)
Выживаемость без РТПХ и безрецидивная выживаемость (дней)					
Оценка по методу Каплана-Мейера [1]					
Медиана (95% ДИ)	120,0 (46,0, NE)	247,0 (129,0, NE)	287,0 (24,0, NE)	193,5 (100,0, NE)	229,0 (141,0, NE)
Среднее (СКО) [2]	178,7 (151,48)	260,5 (99,54)	250,3 (149,68)	227,2 (123,63)	246,0 (119,19)
Медиана [2]	120,0	247,0	287,0	193,5	229,0
Мин, макс [2]	46, 371+	129, 378+	24, 380+	100, 376+	24, 380+
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [3]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,7 (0,3, 1,7)
Доля (%) оставшихся в живых без РТПХ или	33,3 (4,6,	33,3 (4,6, 67,6)	33,3 (4,6, 67,6)	33,3 (4,6, 67,6)	32,4 (12,7,

		CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Статистика	Плаце- бо (N=6)				
рецидива через 1 год после ТГК (95% ДИ) [4]	67,6)				54,0)
<p>Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования).</p> <p>Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.</p> <p>25. 95% ДИ для медианы был вычислен с использованием метода Брукмейера и Кроули с двойным логарифмическим преобразованием.</p> <p>26. Цензурирование игнорировали при вычислении среднего (СКО) и медианы. Знак «+» после минимума или максимума указывает на цензурированное наблюдение.</p> <p>27. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели пропорциональных рисков Кокса с лечением в качестве ковариаты.</p> <p>28. Оценка по методу Каплана-Мейера.</p> <p>ДИ = доверительный интервал; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; ТГК = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; log = логарифм; макс = максимум; мин = минимум; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; СКО = среднее квадратическое отклонение.</p>					

[0168] Частота безрецидивной смертности через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

[0169] В таблице 17 приведены сводные данные по кумулятивной частоте NRM через 1 год после ТГК для популяции mITT. В целом, кумулятивная частота NRM через 1 год после ТГК (с 95% ДИ) составила 5,6% (0,3%, 23,1%) для группы лечения CD24Fc и 16,7% (0,5%, 54,9%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 0,3 (0,0, 2,8). Пациенты, которые были живы на конец периода последующего наблюдения (365 день [1 год]) без рецидива, были цензурированы на последнюю дату, на которую было известно о том, что они живы. По меньшей мере 50,0% пациентов в каждой группе лечения были цензурированы. Кумулятивная частота NRM на 180 день (с 95% ДИ) составила 0,0% для группы лечения CD24Fc и 16,7% (0,5%, 54,9%) для группы плацебо.

Таблица 17. Кумулятивная частота безрецидивной смертности через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITT

		CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Статистика	Плацебо (N=6)				

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов, умерших без рецидива к 1 году после ТКК (n, %)	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)
Кол-во пациентов с рецидивом к 1 году после ТКК (n, %)	2 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	3 (50,0)	5 (83,3)	5 (83,3)	5 (83,3)	15 (83,3)
Кумулятивная частота (%) NRM через 1 год после ТКК (95% ДИ) [1]	16,7 (0,5, 54,9)	16,7 (0,5, 54,9)	0,0 (NE)	0,0 (NE)	5,6 (0,3, 23,1)
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [2]					
Отношение рисков (90% ДИ)					0,3 (0,0, 2,8)
Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования). Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя. 29. Кумулятивная частота (%) NRM через 1 год после ТКК и 95% ДИ были оценены с использованием функции кумулятивной частоты с рецидивом в качестве конкурирующего риска. Для 365 дня, если максимальное наблюдаемое время составило <380 дня исследования, для группы лечения представлена кумулятивная частота на максимальный наблюдаемый момент времени. 30. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели Fine-Gray с лечением в качестве ковариаты и рецидивом в качестве конкурирующего риска. ДИ = доверительный интервал; ТКК = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; NE = не подлежит оценке; кол-во = количество; NRM = безрецидивная смертность.					

[0170] Частота хронической реакции «трансплантат против хозяина» через 1 год после гемопоэтических стволовых клеток

В таблице 18 приведены сводные данные по кумулятивной частоте развития хронической РТПХ через 1 год после ТКК для популяции mITT. В целом, кумулятивная частота развития хронической РТПХ через 1 год после ТКК (с 95% ДИ) составила 63,3% (34,1%, 82,4%) для группы лечения CD24Fc и 33,3% (2,5%, 72,0%) для группы плацебо. Отношение рисков (с 90% ДИ) для CD24Fc по сравнению с плацебо составило 2,1 (0,6, 7,4). Было отмечено 3 случая умеренной хронической РТПХ в когорте однократной дозы 240 мг CD24Fc, 3 случая легкой и 1 случай умеренной хронической РТПХ в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc и 2 случая легкой и 3 случая умеренной хронической РТПХ в когорте многократных доз 960 мг CD24Fc. У двух пациентов в группе плацебо

была легкая хроническая РТПХ. В целом случаев тяжелой хронической РТПХ отмечено не было. Пациенты, оставшихся в живых и не имевшие хронической РТПХ на конец периода последующего наблюдения (365 день [1 год]), были цензурированы на последнюю дату оценки.

Таблица 18. Кумулятивная частота развития хронической реакции «трансплантат против хозяина» через 1 год после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6)	CD24Fc 240 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 480 мг Однократ- ная доза (N=6)	CD24Fc 960 мг Множествен- ные дозы (N=6)	CD24Fc Всего (N=18)
Кол-во пациентов с хронической РТПХ к 1 году после ТКГ (n, %)	2 (33,3)	3 (50,0)	3 (50,0)	5 (83,3)	11 (61,1)
Кол-во пациентов, умерших без хронической РТПХ к 1 году после ТКГ (n, %)	3 (50,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (16,7)
Кол-во цензурированных пациентов (n, %)	1 (16,7)	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	4 (22,2)
Кумулятивная частота (%) развития хронической РТПХ через 1 год после ТКГ [1]	33,3	50,0	50,0	83,3	63,3
95% ДИ	(2,5, 72,0)	(7,0, 83,5)	(6,9, 83,6)	(0,5, 99,4)	(34,1, 82,4)
Сравнение лечения: CD24Fc по сравнению с плацебо [2]					
Отношение рисков (90% ДИ)					2,1 (0,6, 7,4)
Примечание: Один год = 365 день (+14 дней) после трансплантации (т. е. 380 день исследования).					
Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя.					
31. Кумулятивная частота (%) развития хронической РТПХ через 1 год после ТКГ и 95% ДИ были оценены с использованием функции кумулятивной частоты со смертью без хронической РТПХ в качестве конкурирующего риска. Если максимальное наблюдаемое время составило <380 дня исследования, для группы лечения представлена кумулятивная частота на максимальный наблюдаемый момент времени.					
32. Отношение рисков и 90% ДИ были основаны на модели Fine-Gray с лечением в качестве ковариаты и смертью без хронической РТПХ в качестве конкурирующего риска.					
ДИ = доверительный интервал; РТПХ = реакция «трансплантат против хозяина»; ТКГ = трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; кол-во = количество.					

[0171] Частота инфекции на 100 день

[0172] Как и в случае с воздействием на ТПЛ, терапевтические стратегии, разработанные для предупреждения РТПХ посредством глобального подавления иммунитета, могут привести к увеличению частоты инфекций, включая бактериальные инфекции и реактивацию CMV.

[0173] В таблице 19 приведены сводные данные по частоте инфекций до 100 дня для популяции mITT. В общей сложности 13 (72,2%) пациентов, получавших CD24Fc (5 [83,3%] пациентов в когорте однократной дозы 240 мг CD24Fc, 2 [33,3%] пациента в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc и 6 [100,0%] пациентов в когорте многократных доз 960 мг CD24Fc), и 2 (33,3%) пациента, получавших плацебо, к 100 дню имели инфекцию.

[0174] Большинство инфекций считалось контролируемыми и излеченными. Пациент 103-001 в группе плацебо умер от пневмонии. У пациента 102-002 в группе плацебо был конъюнктивит, который был описан как излечивающийся/разрешающийся. У пациента 101-010 в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc и пациента 101-011 в когорте однократной дозы 480 мг CD24Fc была пустулезная сыпь, которая была описана как не излечивающаяся/не разрешающаяся. У пациента 102-006 в когорте многократных доз 960 мг CD24Fc была инфекция верхних дыхательных путей и колит, вызванный *Clostridium difficile*, которые были описаны по мере продолжения вмешательства.

[0175] Большинство инфекций были бактериальными (9 [50,0%] пациентов, получавших CD24Fc, и 2 [33,3%] пациента, получавших плацебо) или вирусными (7 [38,9%] пациентов, получавших CD24Fc, и 1 [16,7%] пациент, получавший плацебо). Большинство инфекций происходило в крови (8 [44,4%] пациентов, получавших CD24Fc, и 1 [16,7%] пациент, получавший плацебо), моче (4 [22,2%] пациента, получавших CD24Fc, и ни одного пациента, получавшего плацебо) или экскрементах (2 [11,1%] пациента, получавших CD24Fc, и 2 [33,3%] пациента, получавших плацебо). Большинство бактерий, выделенных из посевов крови, были обычными обитателями кожи и патогенами с низкой вирулентностью (т. е. коагулазонегативными стафилококками).

Таблица 19. Сводная информация о частоте инфекций до 100 дня – популяция mITT

Статистика	Плацебо (N=6) n (%)	CD24Fc 240 мг Однократная доза (N=6) n (%)	CD24Fc 480 мг Однократная доза (N=6) n (%)	CD24Fc 960 мг Многократные дозы (N=6) n (%)	CD24Fc Всего (N=18) n (%)
Кол-во пациентов с какими-либо инфекциями до 100	2 (33,3)	5 (83,3)	2 (33,3)	6 (100,0)	13 (72,2)

дня					
Тип инфекции					
Бактериальная	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	5 (83,3)	9 (50,0)
Грибковая	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	2 (11,1)
Вирусная	1 (16,7)	3 (50,0)	1 (16,7)	3 (50,0)	7 (38,9)
Место инфекции					
Кровь	1 (16,7)	2 (33,3)	2 (33,3)	4 (66,7)	8 (44,4)
Диссеминированная (2 или более места)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (5,6)
Экскременты	2 (33,3)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (16,7)	2 (11,1)
Желудочно-кишечный тракт	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (5,6)
Гениталии	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)
Нижние дыхательные пути	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Кожа	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (11,1)
Верхние дыхательные пути	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	2 (33,3)	3 (16,7)
Моча	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	4 (22,2)
Процент был рассчитан с использованием количества пациентов в заголовке столбца в качестве делителя. Кол-во = количество.					

[0176] Как показано в таблице 20, в группе CD24Fc было 9 пациентов с высоким риском реактивации CMV (статус CMV донора/реципиента до ТКК: D+/R+, 5; D-/R+, 3; неизвестный D/R+, 1). Один пациент в группе CD24Fc с D+/R- имел средний риск реактивации CMV. Восемь пациентов в группе CD24Fc имели статус D-/R-, который считался низкорисковым. У двух пациентов D-/R+ имела место реактивация CMV на 42 день и 48 день, что составляет 22,2% кумулятивной частоты реактивации CMV на 100 день в группе высокого риска. Оба пациента получали лечение системными стероидами до обнаружения реактивации CMV. Для сравнения, 2 пациента в группе плацебо имели высокий риск реактивации CMV (D+/R+, 1; D-/R+, 1). У одного пациента в группе плацебо имела место реактивация CMV на 47 день перед лечением системными стероидами острой РТПХ (50,0% в группе высокого риска).

[0177] Частота инфекции CMV у пациентов с ТКК, стратифицированных по статусу CMV донора и реципиента до трансплантации. D = донор, R = реципиент, + означает положительный, - означает отрицательный, U означает неизвестный.

Цитомегаловирусный статус	Группа CD24Fc	Группа плацебо
D+, R+	5	1
D+, R-	1	0
D-, R+	3	1

D-, R-	8	4
DU, R+	1	0

[0178] В целом CD24Fc хорошо переносился в исследовании фазы IIa. Токсичностей, связанных с инфузией, отмечено не было. У пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, в группе 480 мг имело место возможное связанное с лекарственным средством НЯПНЛ (нежелательное явление, возникшее после начала лечения) \geq III степени, выражавшееся в гипергликемии, которая была купирована с помощью инсулина. Один случай дозолимитирующей токсичности (ДЛТ) наблюдался в группе плацебо, а в группах CD24Fc не наблюдалось каких-либо случаев ДЛТ. У пациентов, которым вводили CD24Fc, не наблюдалось нежелательных явлений, приведших к смерти, в течение 180 дней (по меньшей мере через 150 дней после последнего введения CD24Fc). Имело место одно нежелательное явление, выражавшееся в пневмонии, которое привело к смерти субъекта на 48 день в группе плацебо. Один пациент в группе CD24Fc умер через 7 месяцев после ТКК, однако было установлено, что смерть, скорее всего, не связана с исследуемым лекарственным средством. Антитела к лекарственному средству (ADA) не были обнаружены ни у одного из 24 пациентов ни в какой момент времени вплоть до 100 дня после ТКК.

[0179] Наиболее частые НЯПНЛ \geq III степени ($> 10\%$) включали снижение количества тромбоцитов (83,3% плацебо и 94,4% CD24Fc), снижение количества лейкоцитов (66,7% плацебо и 88,9% CD24Fc), снижение количества нейтрофилов (50% плацебо и 83,3% CD24Fc), снижение количества лимфоцитов (50% плацебо и 77,8% CD24Fc), анемию (50% плацебо и 66,7% CD24Fc), стоматит (83,3% плацебо и 50% CD24Fc) и тошноту (0% плацебо и 11,1% CD24Fc). Эти СНЯ согласуются с известным профилем безопасности миелоаблативных режимов кондиционирования, используемых при ТКК.

[0180] Миелоаблативное кондиционирование для ТКК часто связано с тяжелой токсичностью, вызванной режимом, включая органную недостаточность. Органная недостаточность является наиболее частой причиной ранней трансплантационной летальности (TRM) или безрецидивной смертности (NRM). В группе CD24Fc из 18 пациентов ни один не умер в течение первых 100 дней после ТКК, в то время как в группе плацебо 1 из 6 пациентов умер на 48 день из-за дыхательной недостаточности.

[0181] Результаты в отношении фармакокинетики

[0182] На фиг. 22-23 показаны ФК данные для трех когорт повышения дозы из исследования фазы 2a. Период полувыведения для когорт однократной дозы 240 и 480 мг

(ФИГ. 22) составлял около 14 дней, что согласуется с данными, полученными у здоровых субъектов. Для 480 мг C_{max} было выше, но реального увеличения воздействия через 14 дней, времени максимальной частоты развития РТПХ и приживления трансплантата не наблюдалось. В последней когорте многократных доз воздействие было увеличенным до 60 дня, как и ожидалось (ФИГ. 23), – периода, в течение которого пациенты наиболее подвержены развитию РТПХ.

[0183] В таблице 21 приведены сводные ФК параметры CD24Fc в плазме для популяции для оценки ФК в когортах однократной дозы. Средние геометрические значения $C_{max,-1д}$ составили 52 145,41 и 84 155,08 нг/мл, средние геометрические значения $AUC_{0-last,-1д}$ составили 10 156 549,9 и 15 522 686,2 нг*ч/мл, средние геометрические значения $AUC_{0-42д}$ составили 9 275 562,3 и 13 903 718,4 нг*ч/мл, а средние геометрические значения AUC_{0-inf} составили 10 383 503,9 и 15 716 616,4 нг*ч/мл для когорт однократной дозы 240 и 480 мг CD24Fc, соответственно. Медиана $t_{max,-1д}$ составила 2,10 ч для обеих когорт однократной дозы 240 и 480 мг CD24Fc. Средние значения $t_{1/2}$ составили 414,739 и 406,648 ч, а средние значения λ_z составили 0,0018 и 0,0017 ч⁻¹ для когорт однократной дозы 240 и 480 мг CD24Fc, соответственно. Средние значения V_z составили 13,83 и 18,18 л, а средние значения CL составили 0,024 и 0,031 л/ч для когорт однократной дозы 240 и 480 мг CD24Fc, соответственно.

Таблица 20 Сводные фармакокинетические параметры CD24Fc в плазме – популяция для оценки ФК – когорты однократной дозы

ФК параметр (единица измерения)	CD24Fc 240 мг Однократная доза		CD24Fc 480 мг Однократная доза	
	N	Статистика	N	Статистика
$C_{max,-1д}$ (нг/мл) [33]	6	52 145,41 (22,3)	6	84 155,08 (24,6)
$t_{max,-1д}$ (ч) [34]	6	2,10 (2,1, 2,4)	6	2,10 (2,0, 2,2)
$AUC_{0-42д}$ (нг·ч/мл) [33]	6	9 275 562,3 (23,2)	6	13 903 718,4 (19,7)
$AUC_{0-last,-1д}$ (нг·ч/мл) [33]	6	10 156 549,9 (26,2)	6	15 522 686,2 (21,3)
AUC_{0-inf} (нг·ч/мл) [33]	6	10 383 503,9 (25,2)	6	15 716 616,4 (21,5)
AUC_{extrap} (%) [35]	6	2,17 (1,669)	6	1,23 (0,519)
λ_z (ч ⁻¹) [35]	6	0,0018 (0,0005)	6	0,0017 (0,0002)
$t_{1/2}$ (ч) [35]	6	414,739 (110,4483)	6	406,648 (62,3044)
V_z (л) [35]	6	13,83 (3,586)	6	18,18 (4,529)
CL (л/ч) [35]	6	0,024 (0,0059)	6	0,031 (0,0071)
Геометрический $CV\% = 100 * (\exp(SKO^2) - 1)^{0,5}$, где SKO - среднеквадратическое отклонение логарифмически преобразованных данных.				
33. Среднее геометрическое (геометрический CV%)				
34. Медиана (минимум, максимум)				
35. Среднее (SKO)				
λ_z = кажущаяся константа скорости конечной элиминации; $AUC_{0-42д}$ = площадь под кривой				

зависимости концентрации в плазме от времени с 0 момента времени до 42 дня; AUC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от момента времени 0, экстраполированной до бесконечности; $AUC_{0-last,-1д}$ = площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от момента времени 0 до последней измеримой концентрации лекарственного средства в плазме для введения в -1 день; AUC_{extrap} = процент от AUC_{0-inf} для экстраполяции от последней измеримой концентрации лекарственного средства в плазме до бесконечности; CL = общий клиренс после внутривенного введения; $C_{max,-1д}$ = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме для введения в -1 день; $CV\%$ = коэффициент вариации; $ФК$ = фармакокинетический; $СКО$ = среднее квадратическое отклонение; $t_{1/2}$ = кажущийся конечный период полувыведения; $t_{max,-1д}$ = время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме для введения в -1 день; V_z = объем распределения на основе конечной фазы элиминации.

[0184] В таблице 22 приведены сводные $ФК$ параметры CD24 Fc в плазме для популяции для оценки $ФК$ в когорте многократных доз в -1 день, 28 день и с -1 дня по 100 день.

Средние геометрические значения $C_{max,-1д}$ и $C_{max,28д}$ составили 96 942,71 нг/мл и 62 563,05 нг/мл, соответственно, для когорты многократных доз 960 мг CD24Fc. Общие средние геометрические значения $AUC_{0-last,-1д}$, $AUC_{0-14д}$, $AUC_{0-100д}$ и AUC_{0-last} составили 12 317 971,2 нг*ч/мл, 9 688 933,9 нг*ч/мл, 37 736 555,1 нг*ч/мл и 37 363 953,5 нг*ч/мл, соответственно, для когорты многократных доз 960 мг CD24Fc. Медиана $t_{max,-1д}$ и $t_{max,28д}$ составила 2,13 ч и 2,52 ч, соответственно, для когорты многократных доз 960 мг CD24Fc.

Таблица 21 Сводные фармакокинетические параметры CD24Fc в плазме – популяция для оценки $ФК$ – когорта многократных доз: -1 день, 28 день и с -1 дня по 100 день

ФК параметр (единица измерения)	CD24Fc 960 мг Многократные дозы -1 день		CD24Fc 960 мг Многократные дозы 28 день		CD24Fc 960 мг Многократные дозы с -1 дня по 100 день	
	N	Статистика	N	Статистика	N	Статистика
$C_{max,-1д}$ (нг/мл) [36]	6	96 942,71 (41,5)	-	-	-	-
$t_{max,-1д}$ (ч) [37]	6	2,13 (2,0, 3,2)	-	-	-	-
$AUC_{0-last,-1д}$ (нг·ч/мл) [36]	6	12 317 971,2 (24,9)	-	-	-	-
$C_{max,28д}$ (нг/мл) [36]	-	-	6	62 563,05 (34,1)	-	-
$t_{max,28д}$ (ч) [37]	-	-	6	2,52 (2,0, 4,0)	-	-
C_{min} (нг/мл) [36]	-	-	6	13 233,79 (33,6)	-	-
T_{min} (ч) [37]	-	-	6	0,00 (0,0, 308,2)	-	-
$AUC_{0-14д}$ (нг·ч/мл) [36]	-	-	6	9 688 933,9 (30,9)	-	-
C_{avg} (нг/мл) [36]	-	-	6	28 836,11 (30,9)	-	-
Cl_{ss} (л/ч) [38]	-	-	6	0,026 (0,0078)	-	-
$AUC_{0-last,overall}$ (нг·ч/мл) [36]	-	-	-	-	6	37 363 953,5 (27,6)

AUC _{0-100д} (нг·ч/мл) [36]	-	-	-	-	6	37 736 555,1 (29,3)
---	---	---	---	---	---	------------------------

Геометрический CV% = $100 * (\exp(\text{СКО}^2) - 1)^{0,5}$, где СКО - среднеквадратическое отклонение логарифмически преобразованных данных.

36. Среднее геометрическое (геометрический CV%)

37. Медиана (минимум, максимум)

38. Среднее (СКО)

AUC_{0-14д} = площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от момента времени 0 до Та_у; AUC_{0-100д} = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от момента времени 0 в -1 день до 100 дня; AUC_{0-last,-1д} = площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от момента времени 0 до последней измеримой концентрации лекарственного средства в плазме для введения в -1 день; AUC_{0-last,overall} = площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от момента времени 0 в -1 день до последней измеримой концентрации лекарственного средства в плазме после последней дозы на 28 день; C_{avg} = рассчитывается как AUC_{0-14д}, деленная на Та_у; C_{l_{ss}} = рассчитывается как доза/AUC_{0-14д}; C_{max,-1д} = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме для введения в -1 день; C_{max,28д} = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме между временем введения и временем введения + Та_у для введения на 28 день; C_{min} = минимальная концентрация между временем введения и временем введения + Та_у (во время, соответствующее минимальной концентрации в образце, взятом в течение интервала дозирования); CV% = коэффициент вариации; ФК = фармакокинетический; СКО = среднеквадратическое отклонение; t_{max,-1д} = время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме для введения в -1 день; t_{max,28д} = время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме в течение интервала дозирования для введения на 28 день; T_{min} = время достижения минимальной концентрации в образце, взятом в течение интервала дозирования.

[0185] Клинические данные исследования фазы IIa убедительно свидетельствуют о том, что CD24Fc, вводимый в сочетании с метотрексатом и такролимусом, значительно улучшает исходы у пациентов с лейкозом, проходящих миелоаблативную алло-ТГК, за счет снижения как вероятности тяжелой оРТПХ (III-IV степени), так и вероятности рецидива лейкоза. Как описано выше, кумулятивная частота развития оРТПХ III-IV степени составляет 5,6% у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc, по сравнению с 16,7% в когорте плацебо (физиологический раствор плюс метотрексат и такролимус) и 24% в современной внешней контрольной когорте (только метотрексат и такролимус). Эти данные дают основания полагать, что введение CD24Fc в сочетании с метотрексатом и такролимусом в качестве профилактики снижает риск развития оРТПХ III-IV степени у пациентов с ТГК – наиболее серьезных степеней оРТПХ, которые связаны с повышенным риском безрецидивной смертности. Наблюдается тенденция к снижению частоты рецидивов у пациентов, получавших CD24Fc (11,1%), по сравнению с не получавшими его пациентами, как по сравнению с группой плацебо (33,3%), так и по сравнению с современной внешней контрольной группой (23%), что свидетельствует о том, что CD24Fc не влияет на эффекты ТПЛ трансплантата и может даже снижать риск рецидива лейкоза. Преимущество включения CD24Fc в стандартные схемы профилактики РТПХ

дополнительно подтверждается лучшим NRM у пациентов, подвергшихся воздействию CD24Fc (5,6%), по сравнению с плацебо (16,7%), лучшей 1,5-летней общей выживаемостью (89% против 50%, CD24Fc по сравнению с контролем плацебо), статистически значимым улучшением RFS без oРТПХ III-IV степени (83% против 33%, CD24Fc по сравнению с контролем плацебо, соответственно), дозозависимым снижением тяжелого мукозита и хорошим профилем безопасности только с одним связанным с лекарственным средством НЯПНЛ (III степени), наблюдаемым в исследовании.

[0186] Профилактическое средство, которое снижает риск как oРТПХ, так и рецидива лейкоза, будет новым и чрезвычайно полезным для пациентов с лейкозом, проходящих алло-ТГК после миелоаблативного кондиционирования. Как описано выше, ранние клинические данные, приведенные в данной заявке, убедительно свидетельствуют о том, что введение CD24Fc в комбинации с метотрексатом и такролимусом обеспечивает существенное улучшение по сравнению с существующими схемами профилактики в отношении клинически значимых конечных точек предупреждения oРТПХ III-IV степени и рецидива лейкоза, и, следовательно, попадает под критерии статуса «прорыва в терапии». Эффекты CD24Fc, наблюдаемые в части фазы IIa клинического исследования, будут дополнительно изучены в части фазы IIb, которая была разработана для подтверждения эффективности профилактического введения CD24Fc для снижения oРТПХ III-IV степени и рецидива лейкоза у пациентов с лейкозом, проходящих алло-ТГК после миелоаблативного кондиционирования.

Пример 6

CD24 может быть использован для уменьшения мукозита у пациентов, проходящих ТГК

[0187] Миелоаблативное кондиционирование для ТГК часто связано с тяжелой токсичностью, связанной с используемым режимом, включая мукозит 3-4 степени. Пациенты с ТГК сообщали, что тяжелый мукозит полости рта был самым тягостным симптомом, который они испытывали. В качестве меры воздействия лечения CD24Fc на мукозит у субъектов в исследовании профилактики РТПХ фазы IIa, описанном в примере 5, авторы создали комбинированную систему оценки мукозита для изучения результата лечения. Эти данные показаны на ФИГ. 24А и включают число дней с серьезным мукозитом (3 или 4 степени) у пациентов. Величина оценки приведена в столбцах вместе с количеством пациентов, имевших мукозит, указанным в скобках. Мукозит полости рта классифицировали в соответствии с СТСАЕ 4.01. Как показано на ФИГ. 24В, дозозависимое снижение оценок мукозита по степени и числу дней наблюдалось во всех

когортах CD24Fc по сравнению с плацебо ($R = -0,9983$; $P = 0,0009$), и статистически значимое снижение наблюдалось в когорте многократных доз (плацебо против многократных доз 960 мг: $P = 0,035$, t-критерий Стьюдента).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предупреждения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту белка CD24.
2. Способ по п. 1, где способ снижает риск развития у субъекта острой РТПХ III-IV степени.
3. Способ лечения или предупреждения мукозита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту белка CD24.
4. Способ по любому из пп. 1-3, где субъект имеет рак.
5. Способ по п. 4, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).
6. Способ по любому из пп. 1-5, где белок CD24 вводят в дозе 240 мг или 480 мг.
7. Способ по любому из пп. 1-6, где субъекту будет проведена или была проведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГК).
8. Способ по п. 7, где белок CD24 вводят до или после ТГК.
9. Способ по п. 8, где белок CD24 вводят за один день до ТГК.
10. Способ по п. 8 или п. 9, где белок CD24 вводят более одного раза.
11. Способ по п. 10, где белок CD24 вводят тремя дозами, по дозе раз в две недели, где дозы включают дозу за день до ТГК, дозу на 14 день после ТГК и дозу на 28 день после ТГК.
12. Способ по п. 11, где дозы белка CD24 составляют 480 мг, 240 мг и 240 мг, соответственно.
13. Способ по любому из пп. 1-12, где белок CD24 содержит зрелый человеческий полипептид CD24, слитый на его N-конце или C-конце с Fc-областью белка иммуноглобулина (Ig) млекопитающего.
14. Способ по п. 13, где зрелый человеческий полипептид CD24 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 2.
15. Способ по п. 14, где белок Ig является человеческим, и где Fc-область содержит шарнирную область и домены CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA.
16. Способ по п. 14, где белок Ig является человеческим, и где Fc-область содержит шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM.

17. Способ по п. 15, где белок CD24 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
18. Способ по п. 17, где аминокислотная последовательность белка CD24 состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
19. Способ по любому из пп. 1-18, где белок CD24 является растворимым.
20. Способ по любому из пп. 1-19, где белок CD24 гликозилирован.
21. Способ по любому из пп. 1-20, где белок CD24 получен с использованием эукариотической системы экспрессии.
22. Способ по п. 21, где эукариотическая система экспрессии включает экспрессию из вектора в клетках млекопитающих.
23. Способ по п. 22, где клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка.
24. Применение белка CD24 для изготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у субъекта.
25. Применение по п. 24, где применение снижает риск развития у субъекта острой РТПХ III-IV степени.
26. Применение белка CD24 для изготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения мукозита у субъекта.
27. Применение по любому из пп. 24-26, где субъект имеет рак.
28. Применение по п. 27, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).
29. Применение по любому из пп. 24-28, где белок CD24 вводят в дозе 240 мг или 480 мг.
30. Применение по любому из пп. 24-29, где субъекту будет проведена или была проведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГК).
31. Применение по п. 30, где белок CD24 вводят до или после ТГК.
32. Применение по п. 31, где белок CD24 вводят за один день до ТГК.
33. Применение по п. 31 или п. 32, где белок CD24 вводят более одного раза.
34. Применение по п. 33, где белок CD24 вводят тремя дозами, по дозе раз в две недели, где дозы включают дозу за день до ТГК, дозу на 14 день после ТГК и дозу на 28 день после ТГК.
35. Применение по п. 34, где дозы белка CD24 составляют 480 мг, 240 мг и 240 мг, соответственно.

36. Применение по любому из пп. 24-35, где белок CD24 содержит зрелый человеческий полипептид CD24, слитый на его N-конце или С-конце с Fc-областью белка иммуноглобулина (Ig) млекопитающего.
37. Применение по п. 36, где зрелый человеческий полипептид CD24 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 2.
38. Применение по п. 37, где белок Ig является человеческим, и где Fc-область содержит шарнирную область и домены CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA.
39. Применение по п. 37, где белок Ig является человеческим, и где Fc-область содержит шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM.
40. Применение по п. 38, где белок CD24 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
41. Применение по п. 40, где аминокислотная последовательность белка CD24 состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
42. Применение по любому из пп. 24-41, где белок CD24 является растворимым.
43. Применение по любому из пп. 24-42, где белок CD24 гликозилирован.
44. Применение по любому из пп. 24-43, где белок CD24 получен с использованием эукариотической системы экспрессии.
45. Применение по п. 44, где эукариотическая система экспрессии включает экспрессию из вектора в клетках млекопитающих.
46. Применение по п. 45, где клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка.

ФИГ. 1А

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNGLAP**
NP**TNATTK**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 1В

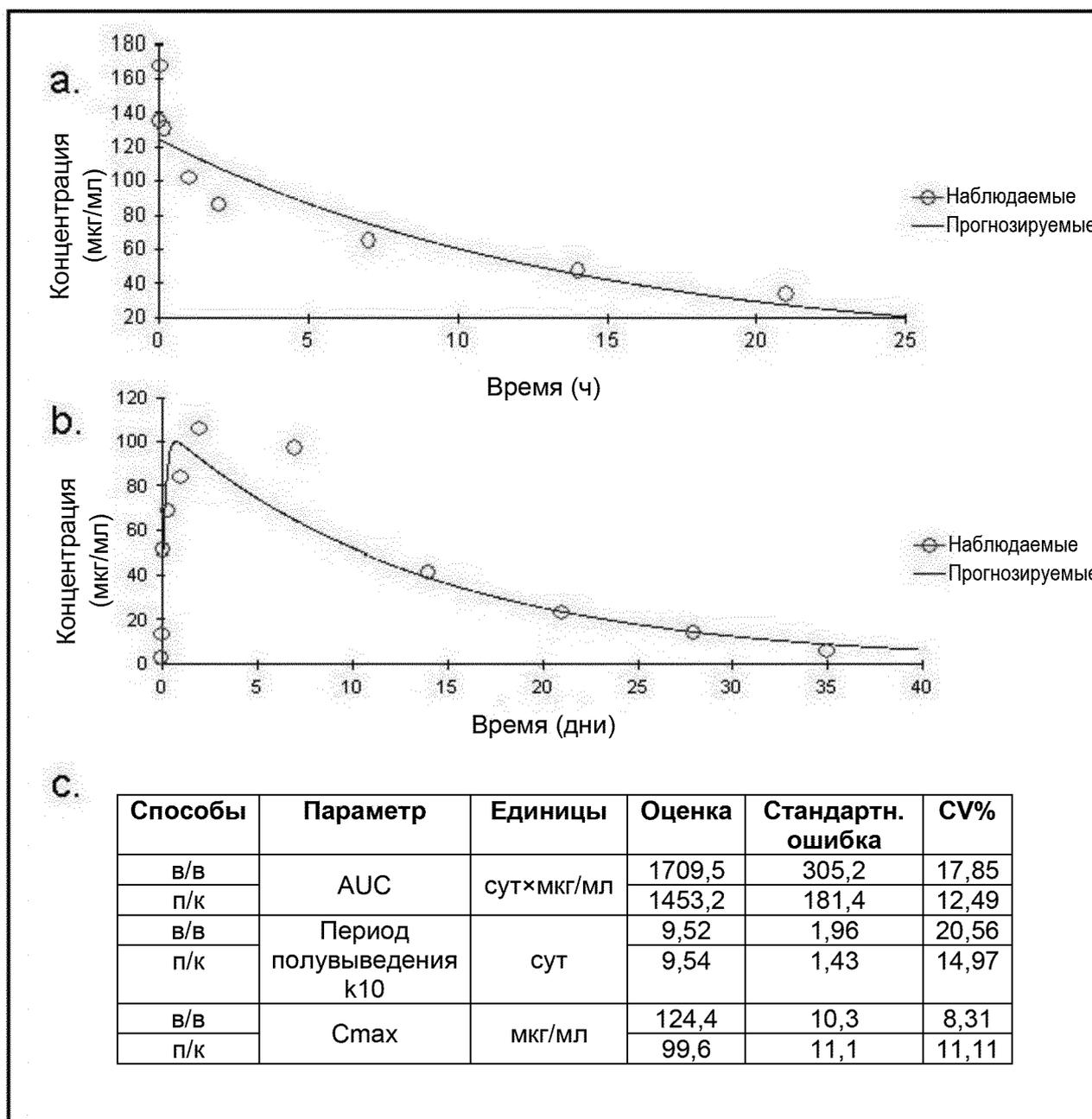
MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNGLAP**
NP**TNATTKV**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 1С

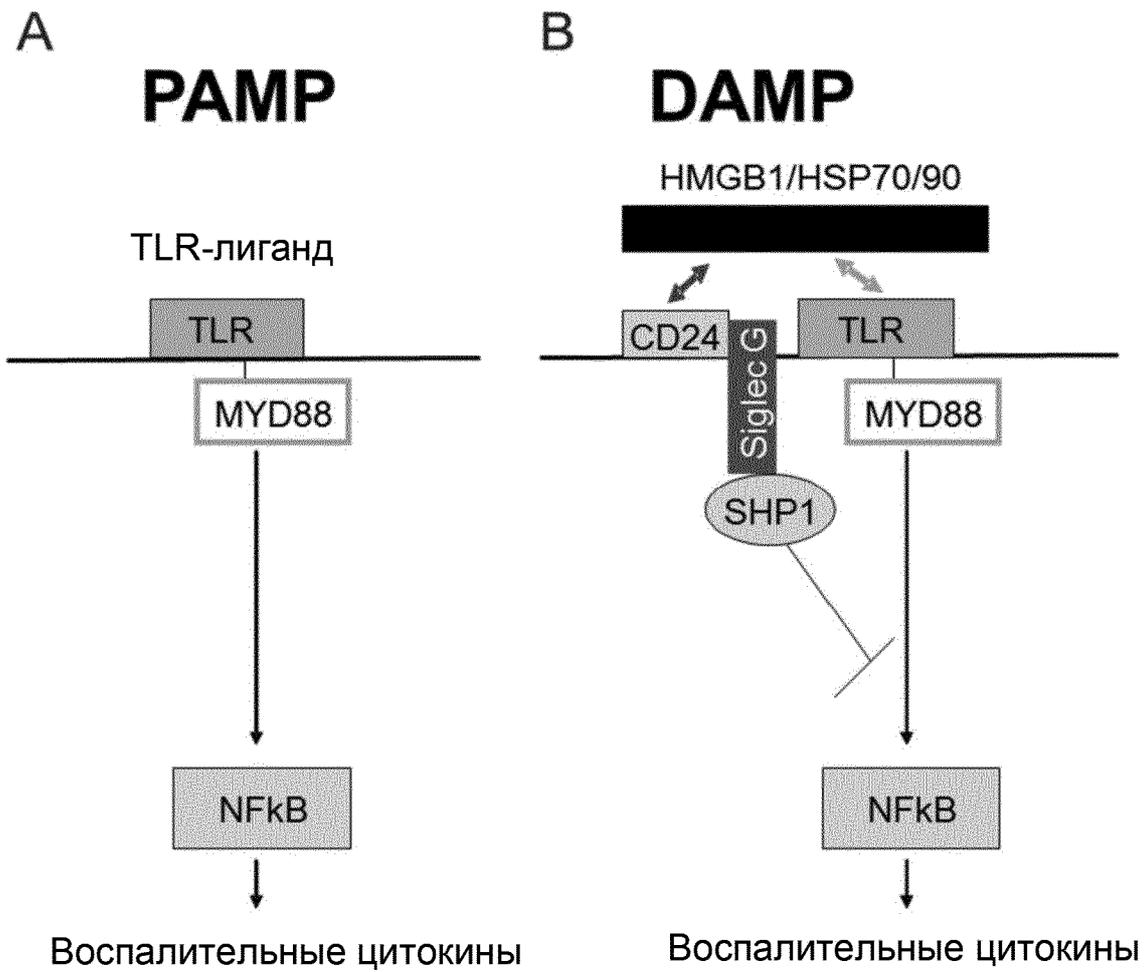
MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNGLAP**
NP**TNATTKA**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Мышинный CD24 NQTSVAPFPGN--QNISAS----PNPTNATTRG
-* - * * * * *
Человеческий CD24 SETTTGTSS-NSSQSTSNS-GLAPNPTNATTKA (V)

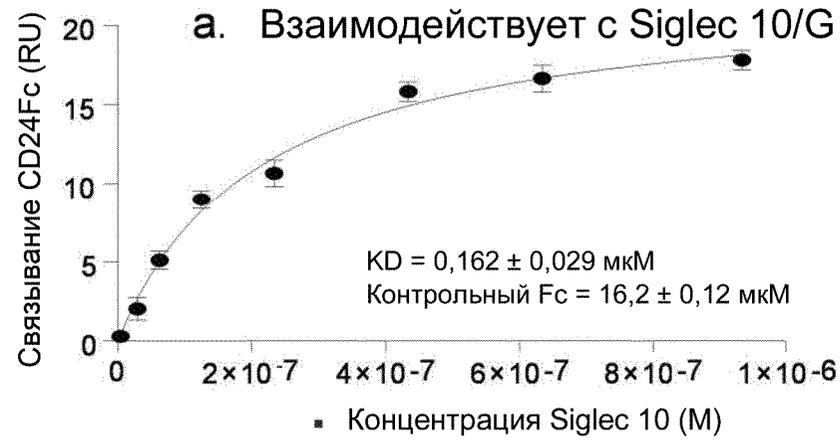
ФИГ. 2



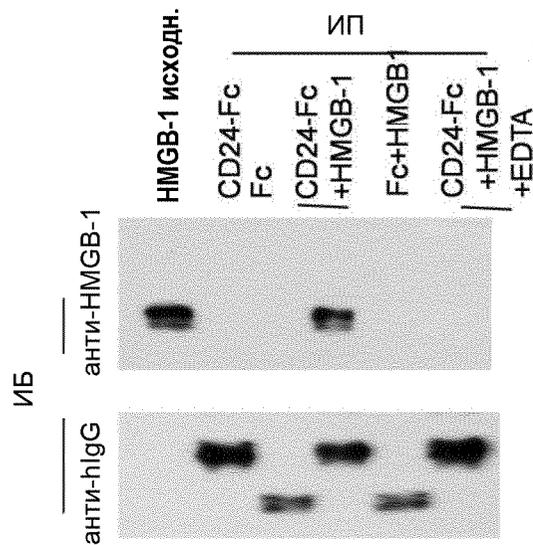
ФИГ. 3



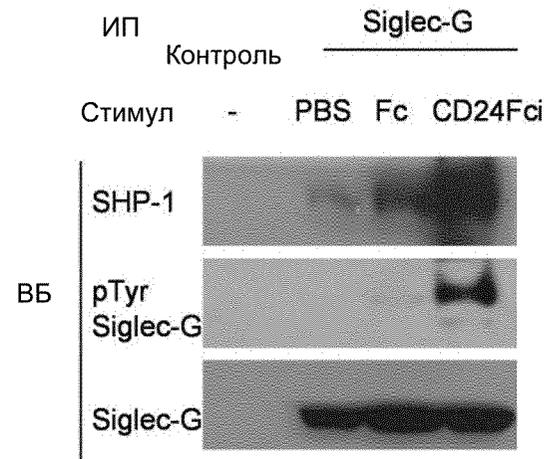
ФИГ. 4



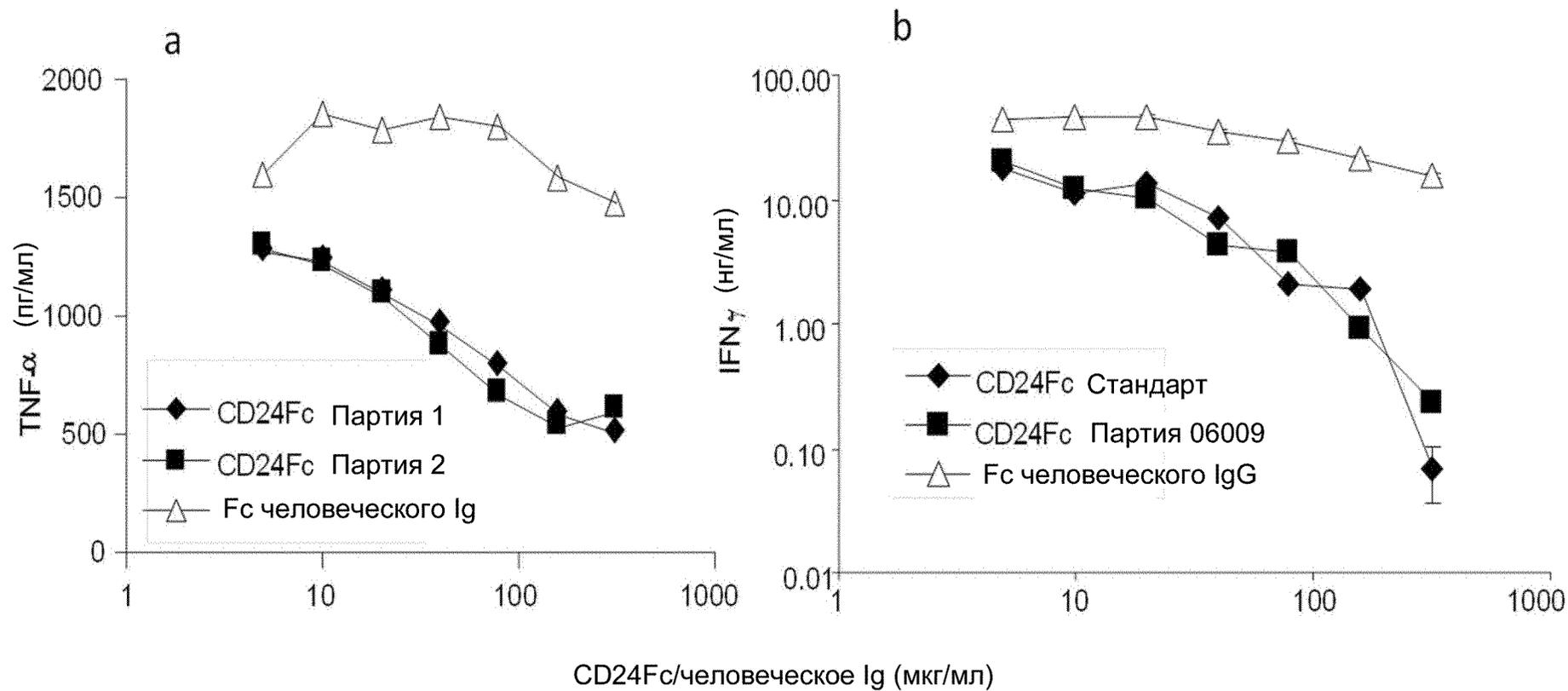
b. Взаимодействует с HMGB1



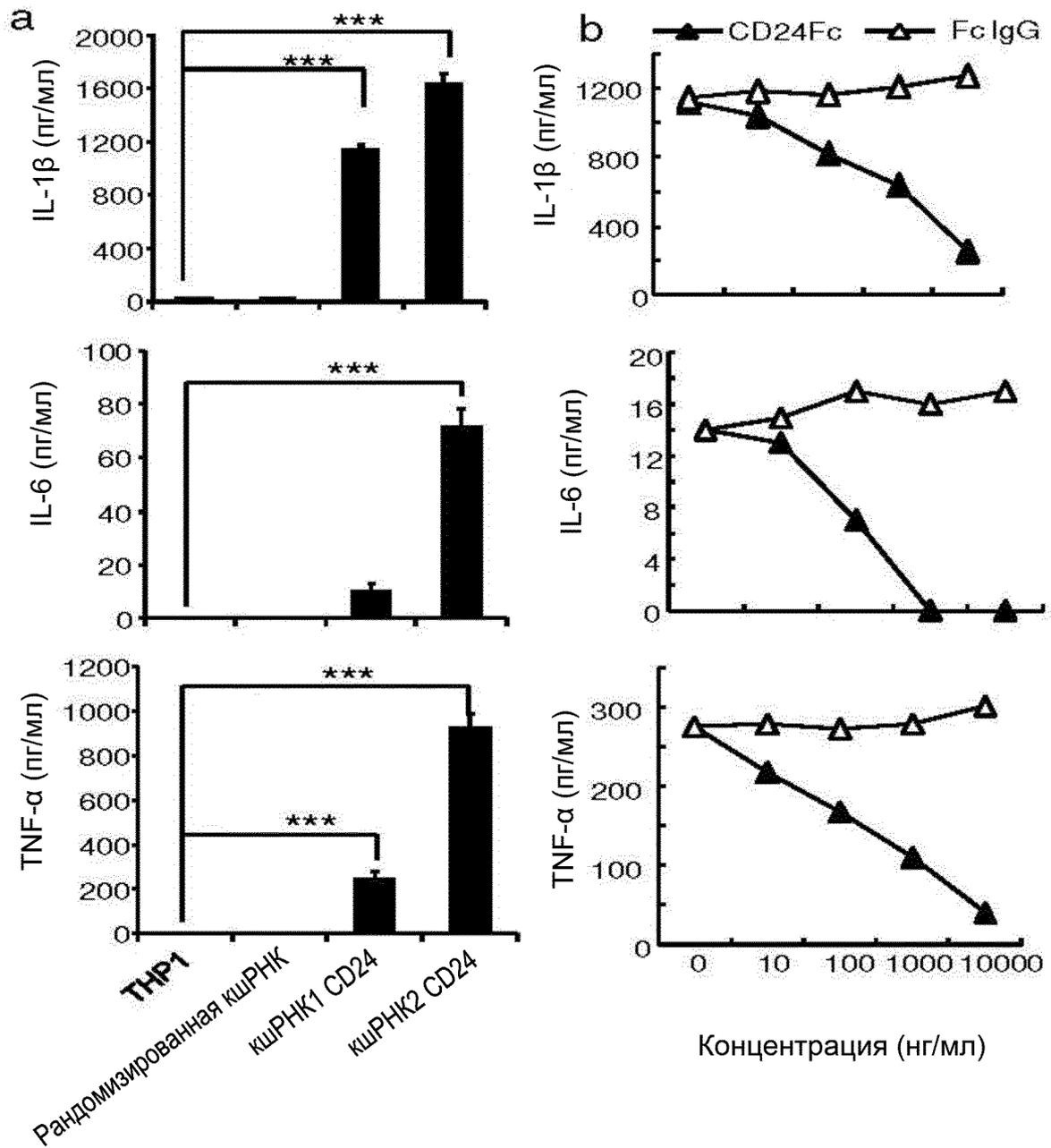
с. Стимулирует передачу сигналов Siglec 10/G



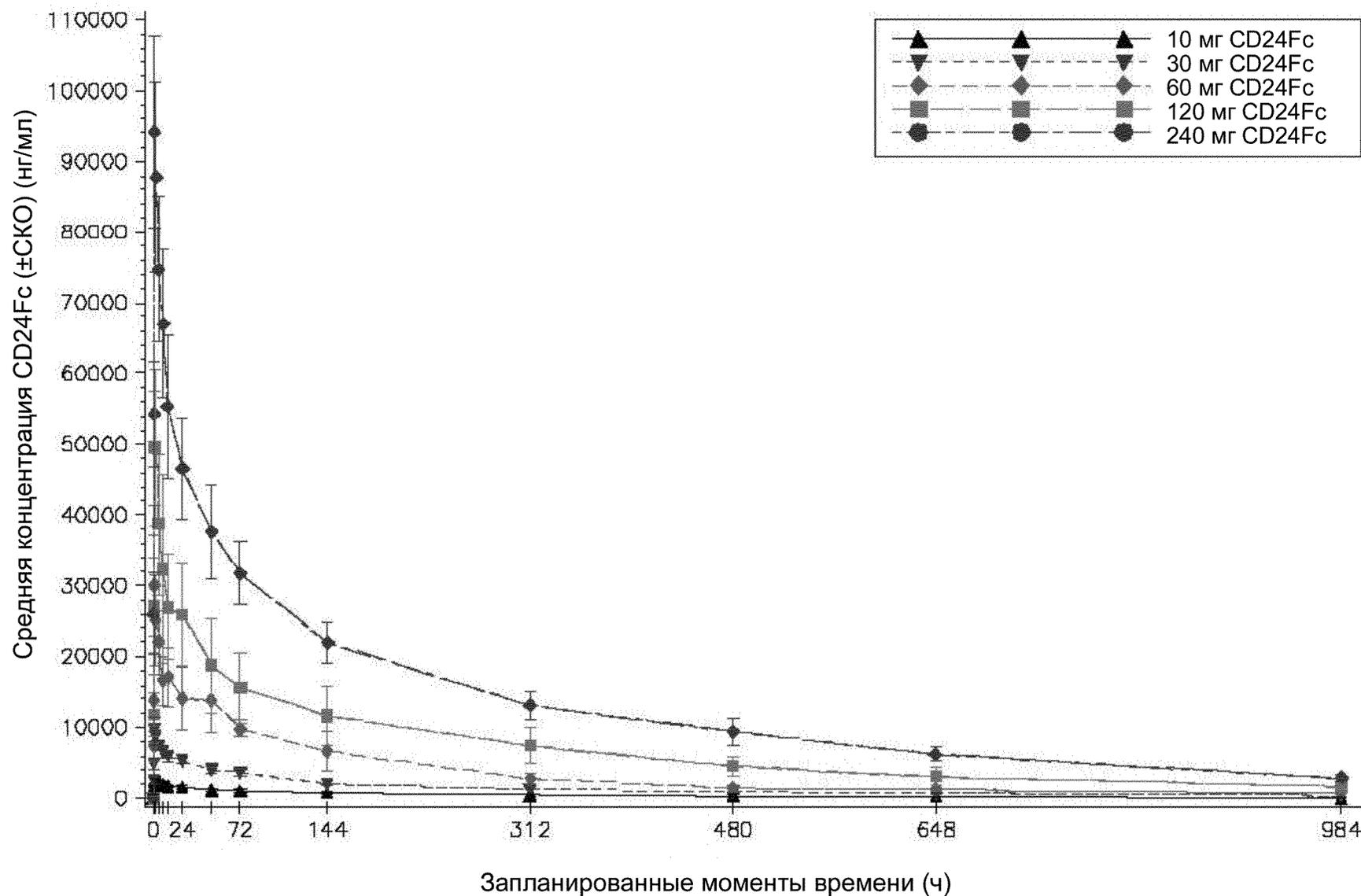
ФИГ. 5



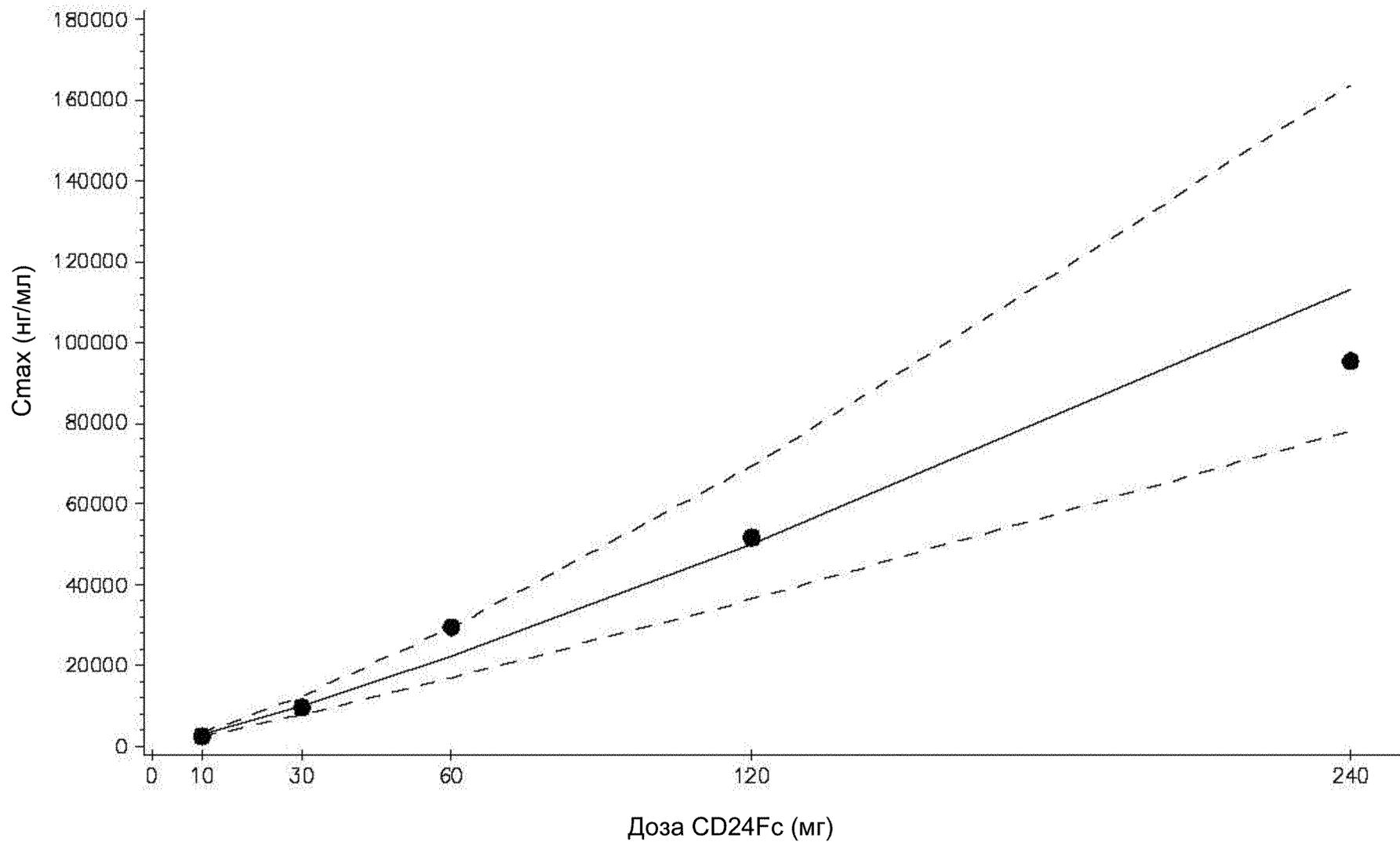
ФИГ. 6



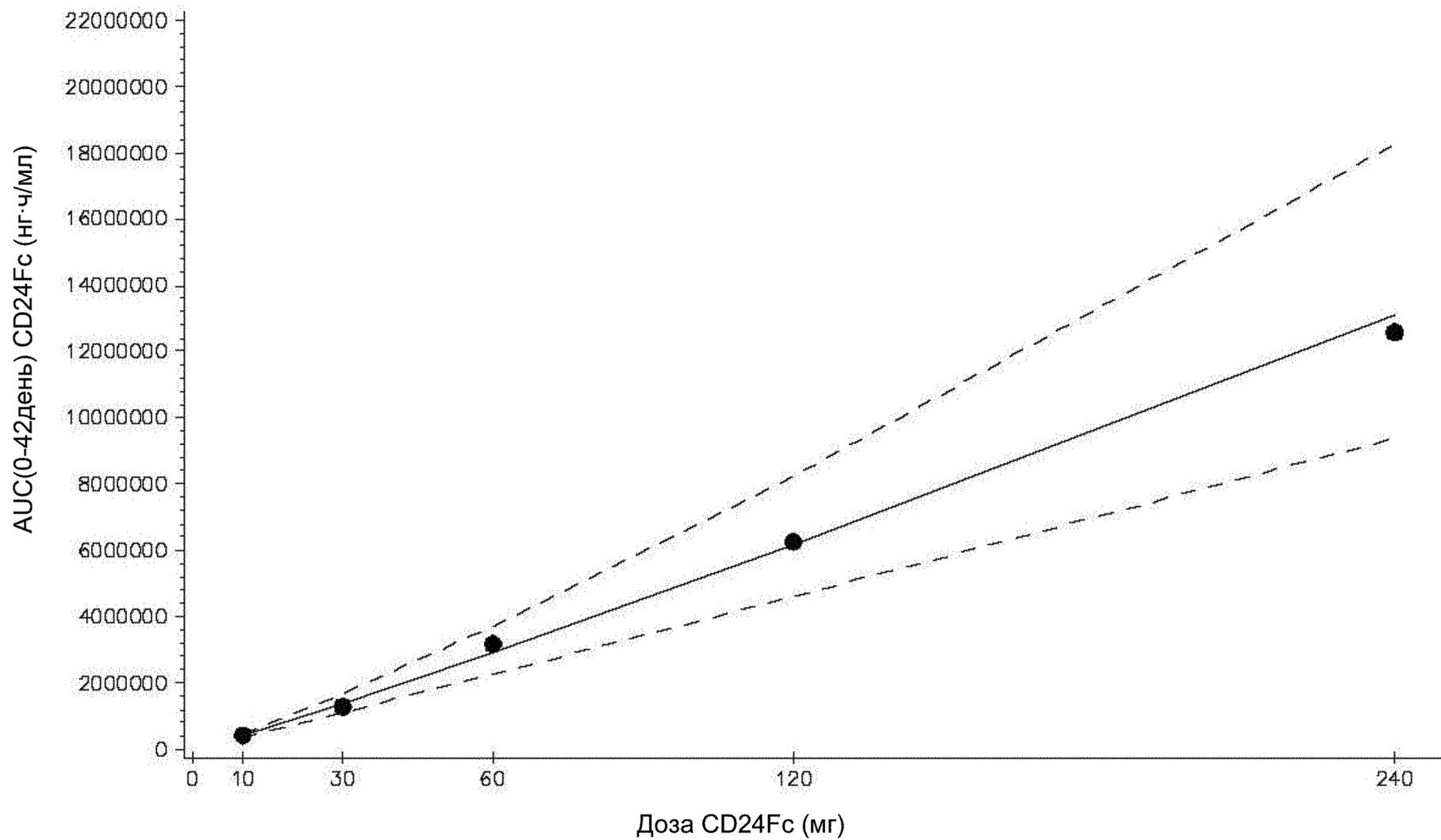
ФИГ. 7



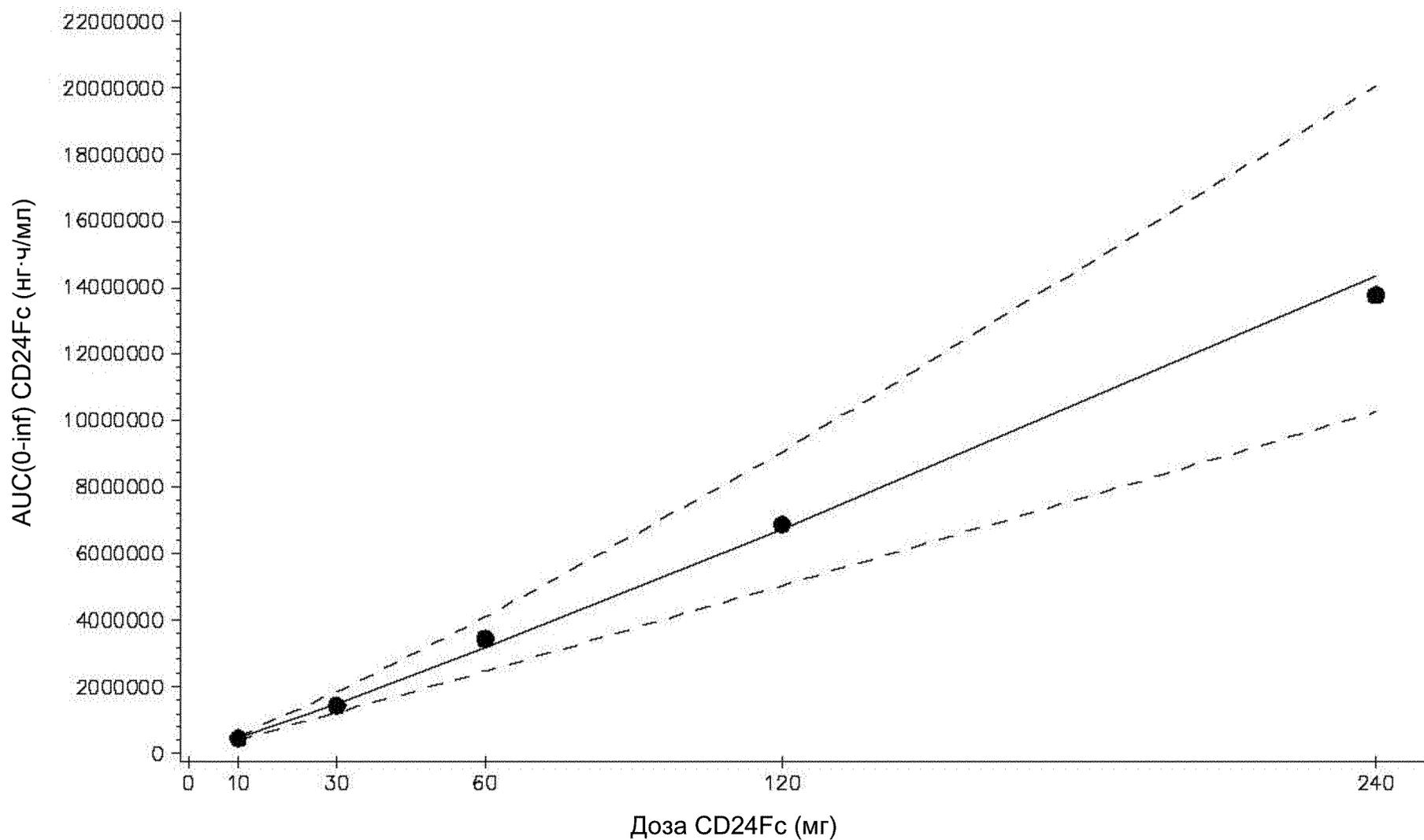
ФИГ. 8



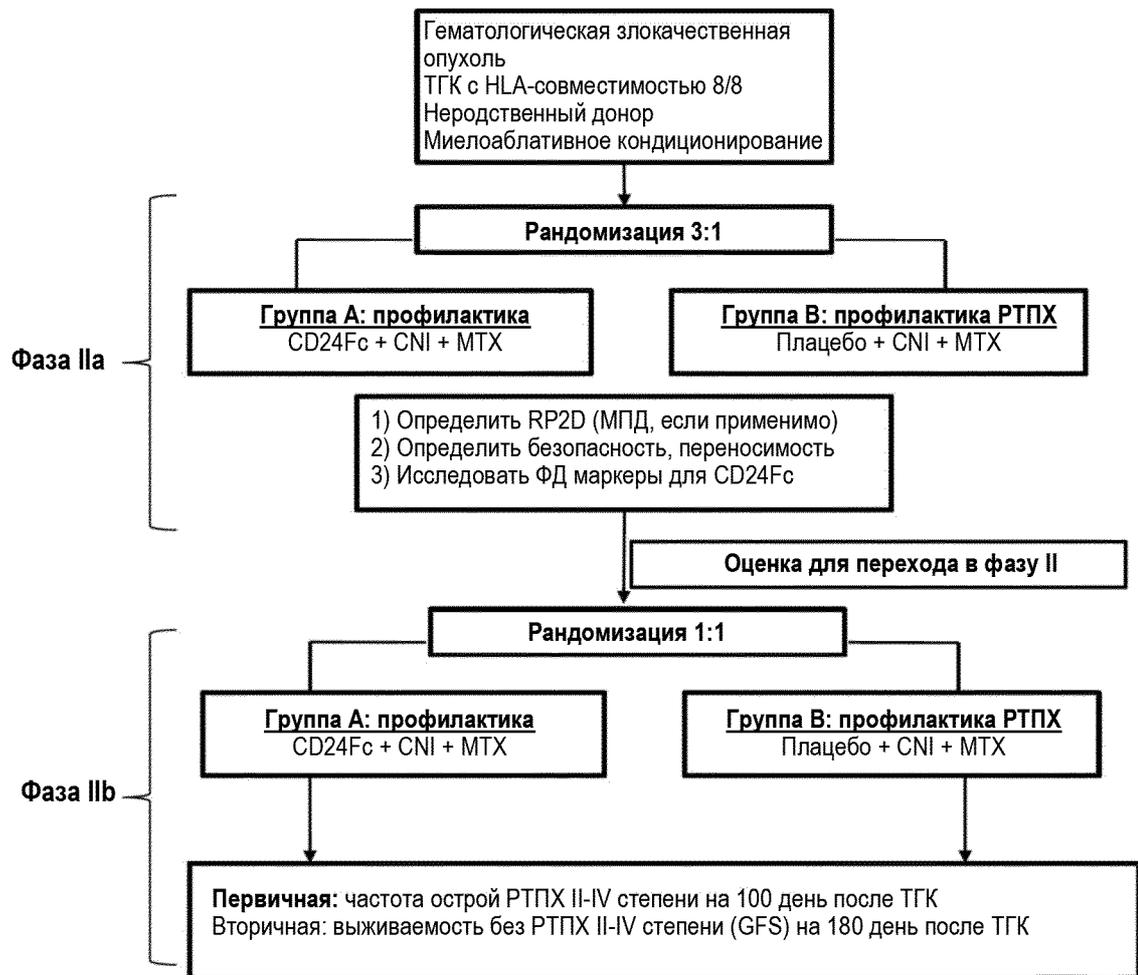
ФИГ. 9



ФИГ. 10

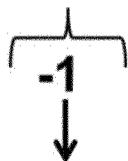


ФИГ. 11

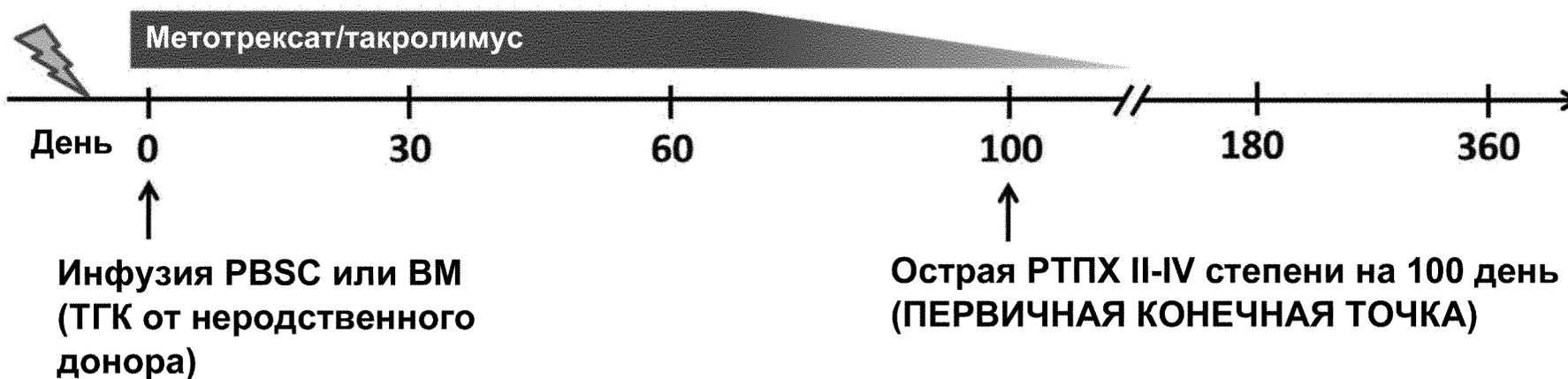
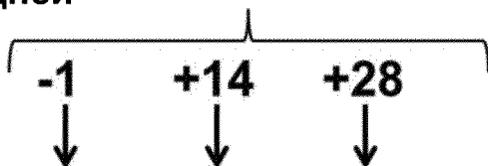


ФИГ. 12

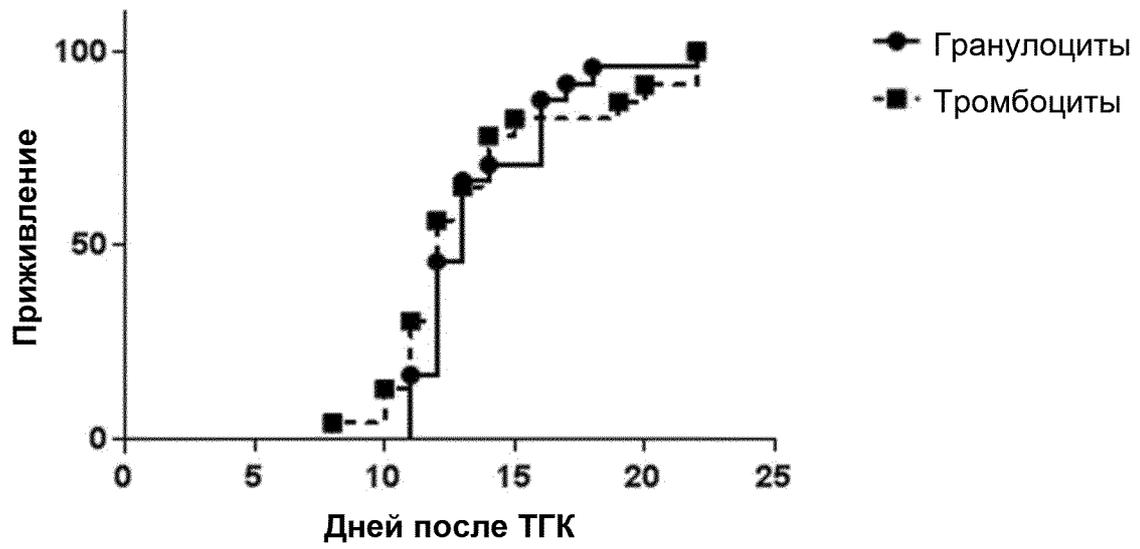
Однократная доза: в/в инфузия CD24Fc в -1 день



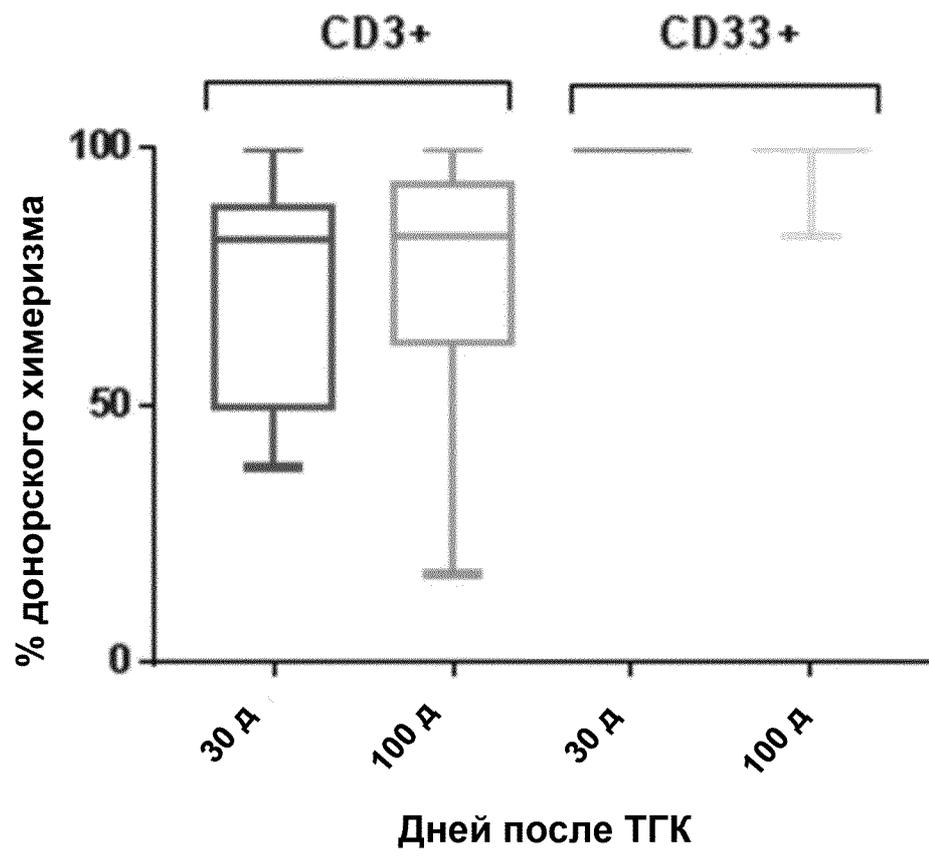
Множественные дозы: три в/в инфузии CD24Fc раз в 14 дней



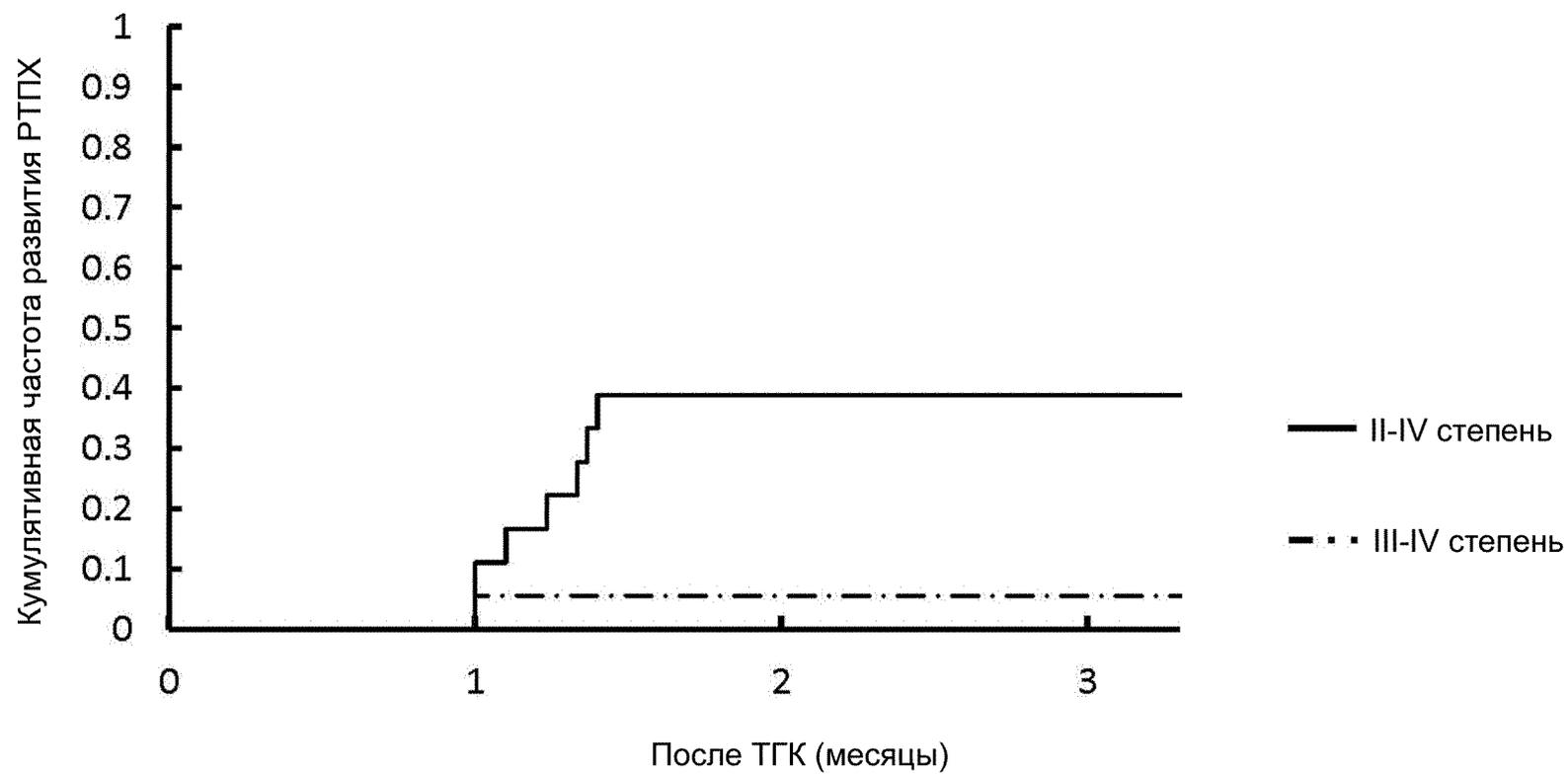
ФИГ. 13



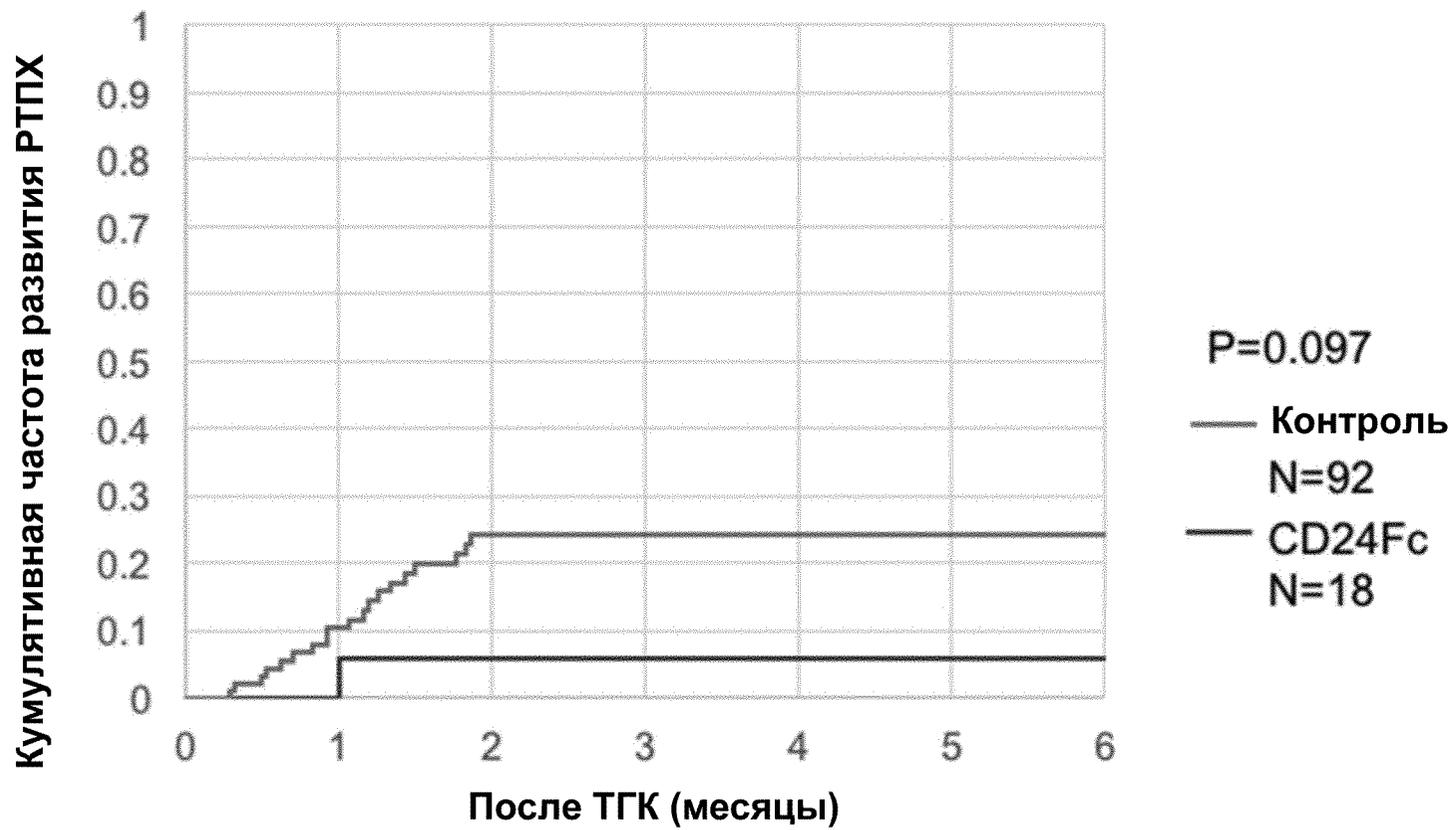
ФИГ. 14



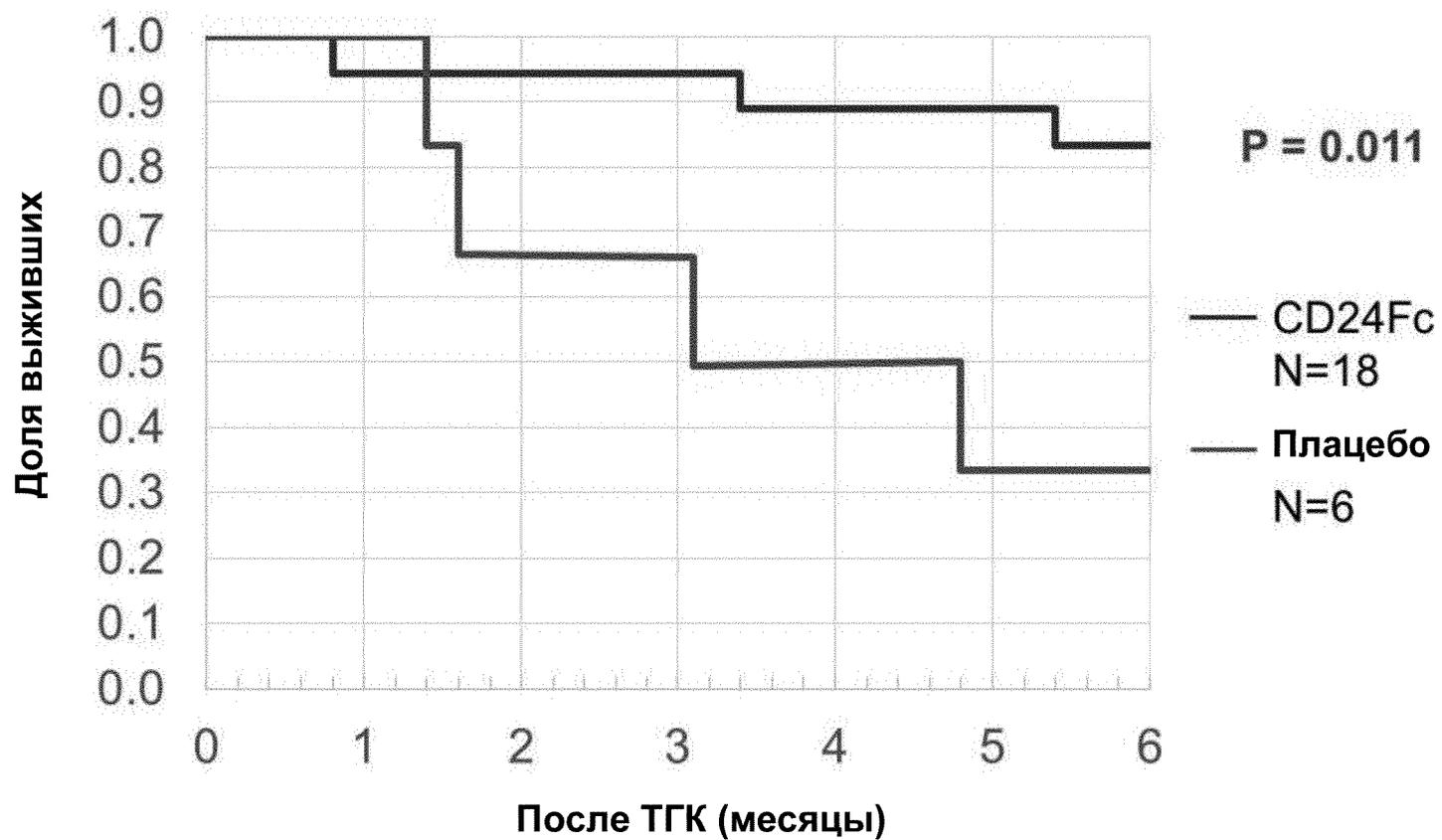
ФИГ. 15



ФИГ. 16

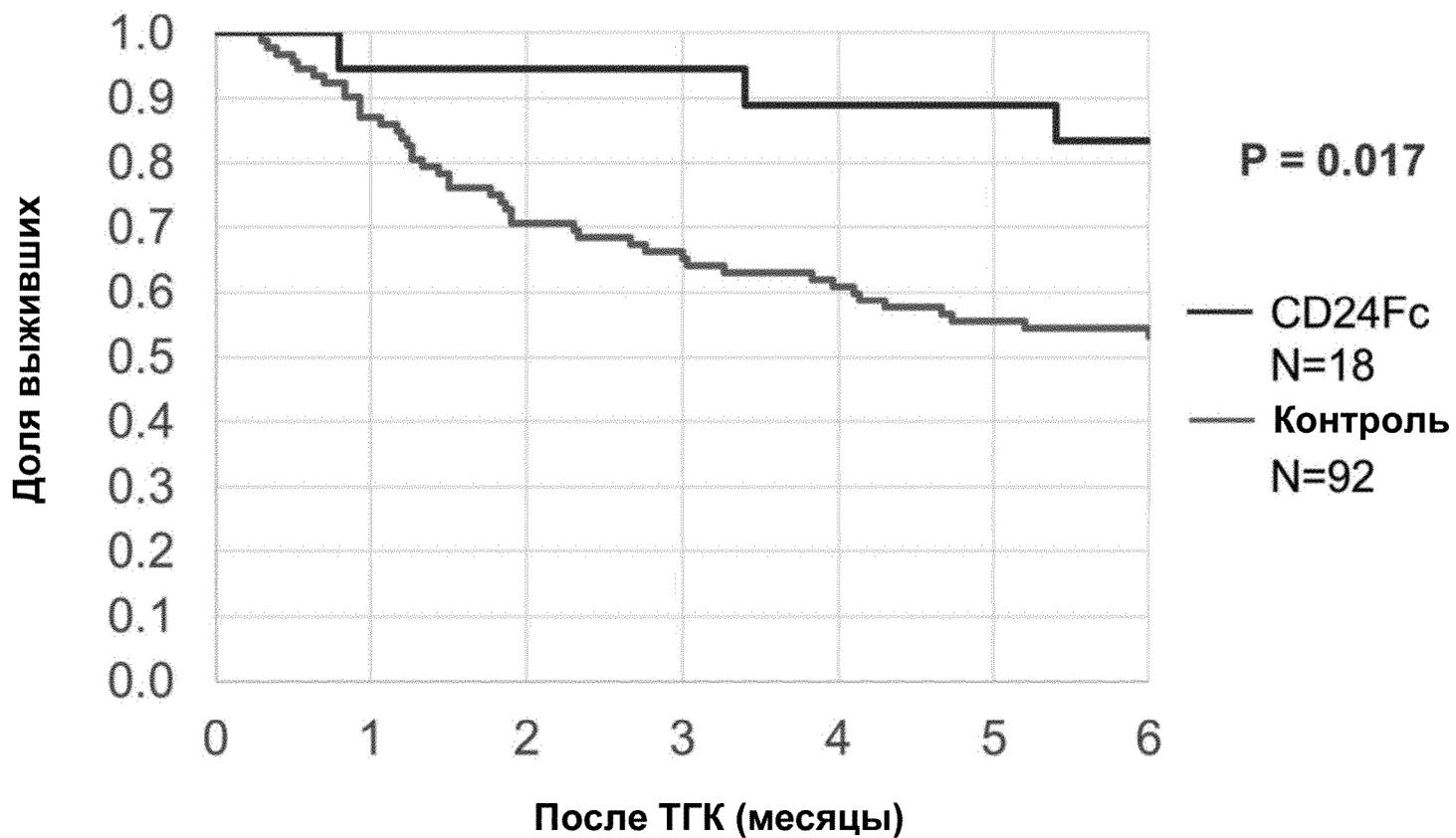


ФИГ. 17

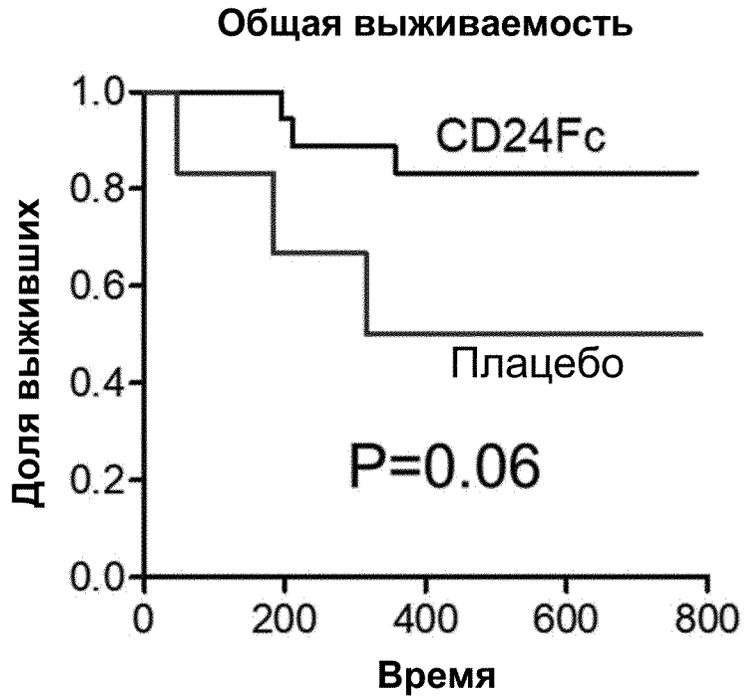
180-дневная выживаемость без рецидива и острой РТПХ III-IV степени

ФИГ. 18

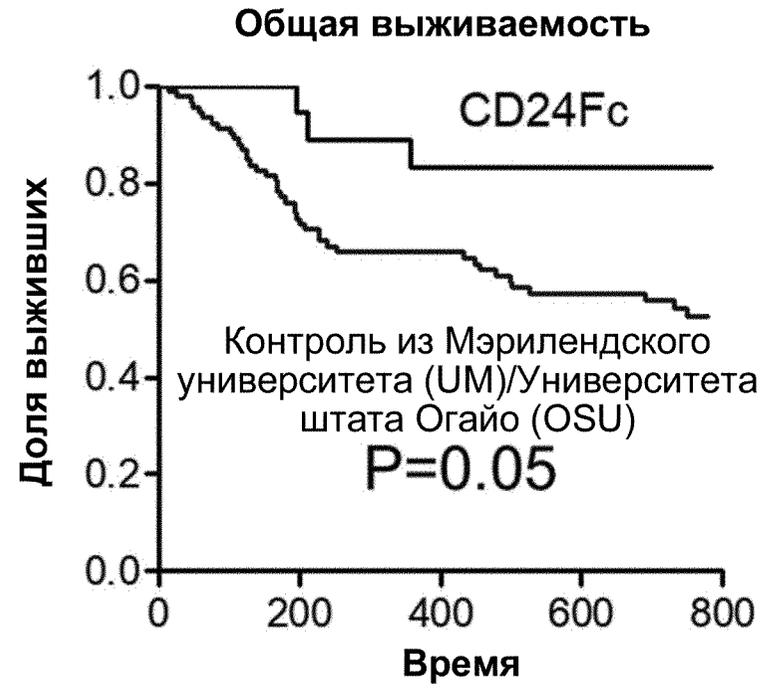
180-дневная выживаемость без рецидива и острой РТПХ III-IV степени



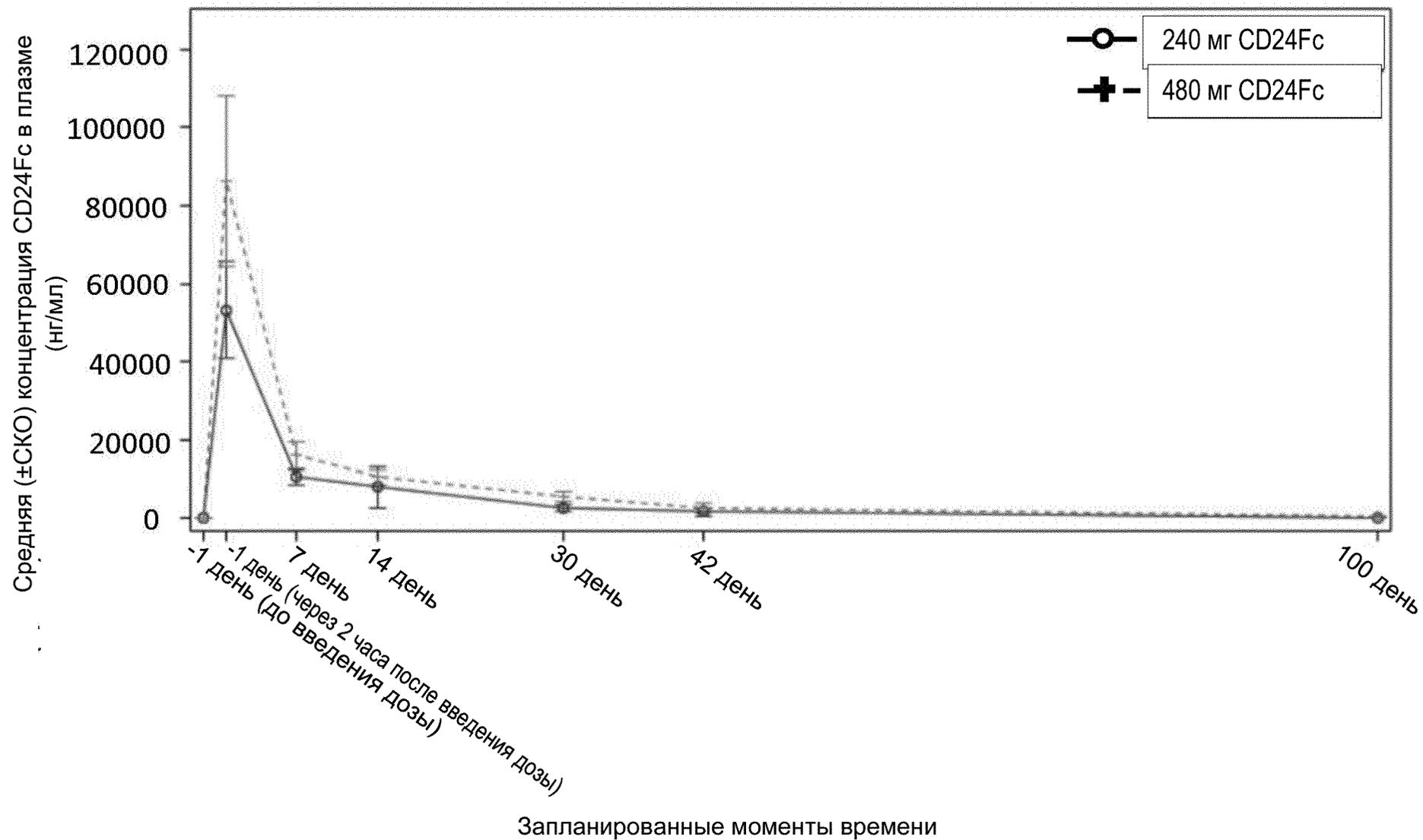
ФИГ. 19



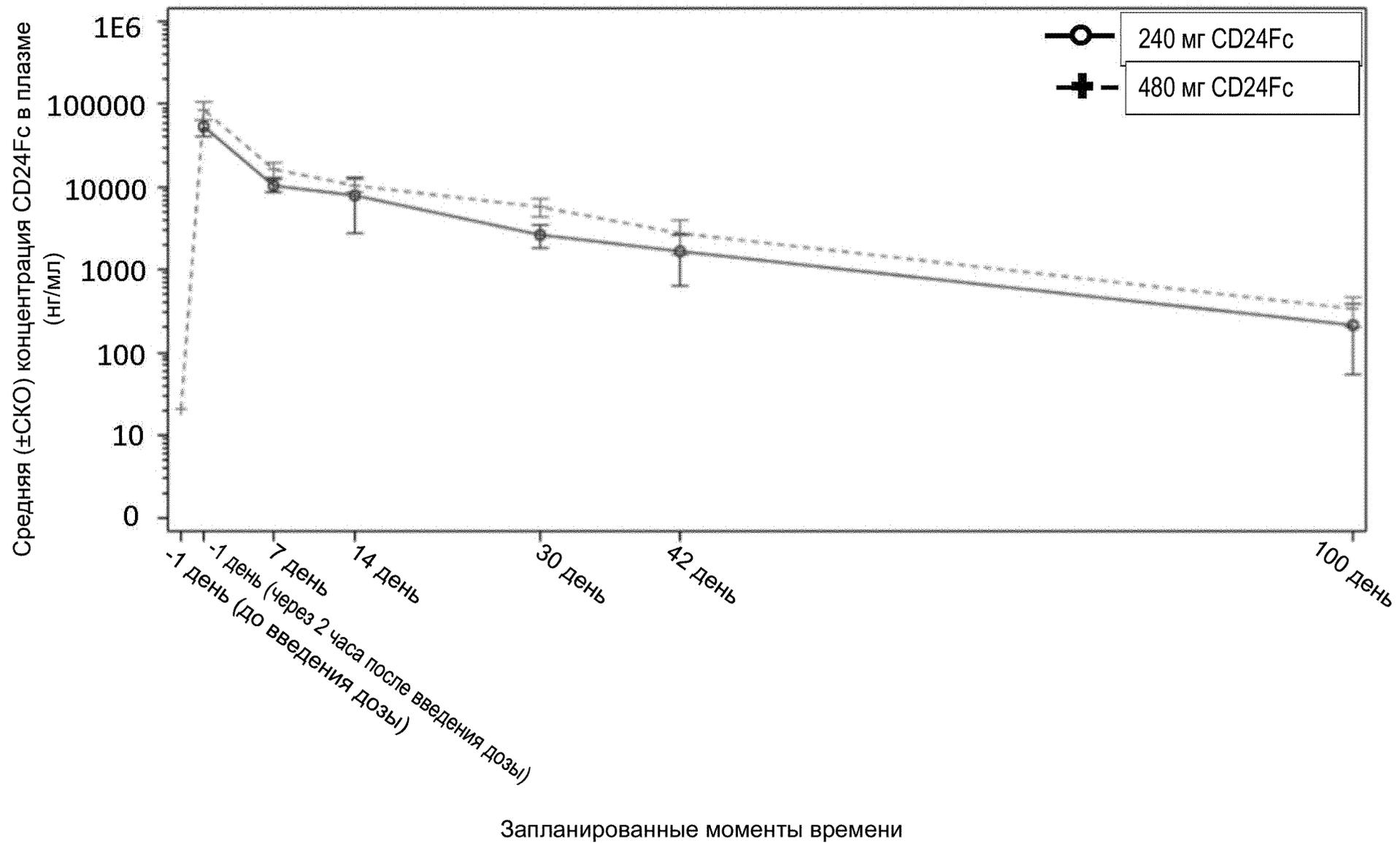
ФИГ. 20



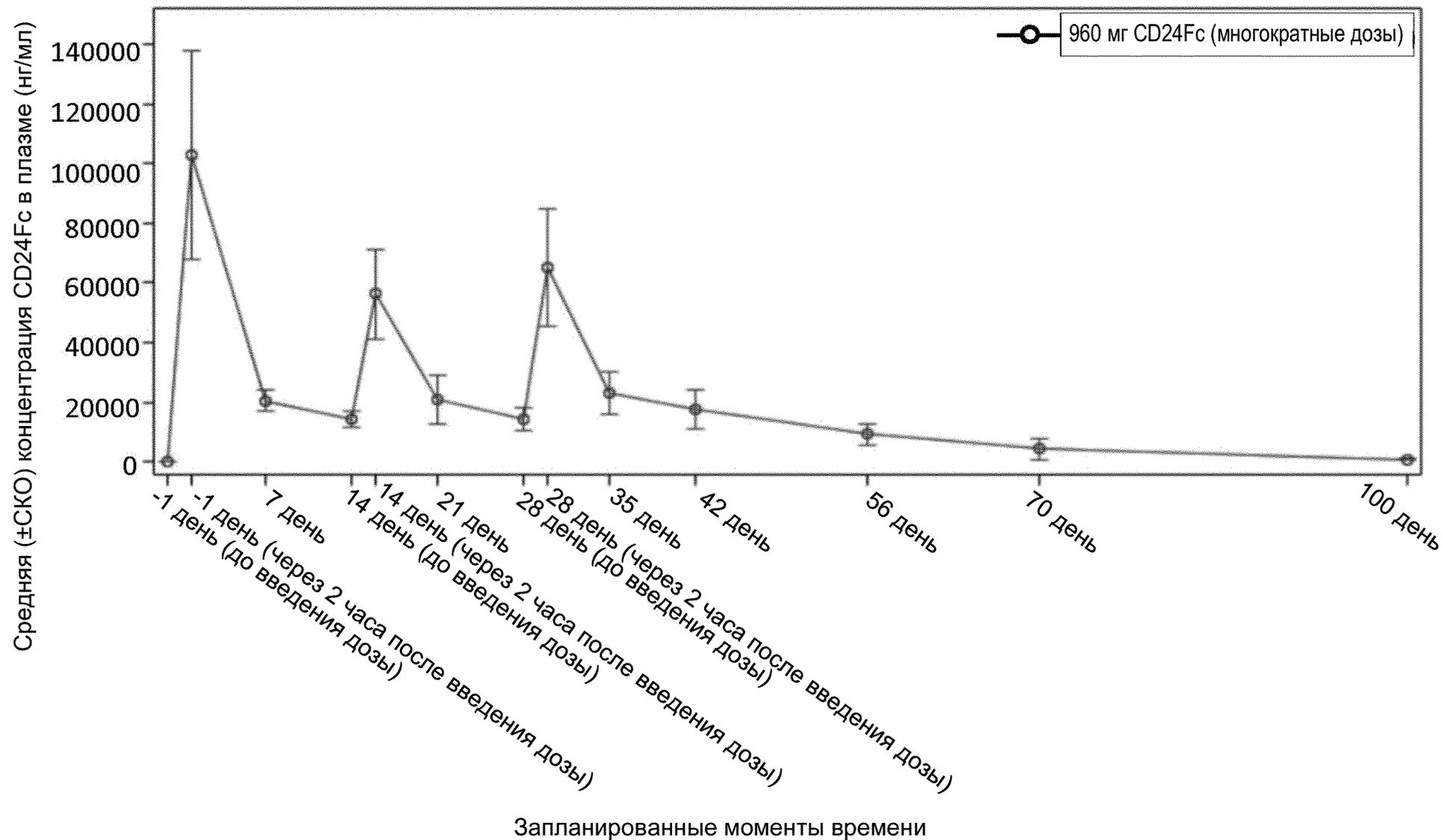
ФИГ. 21



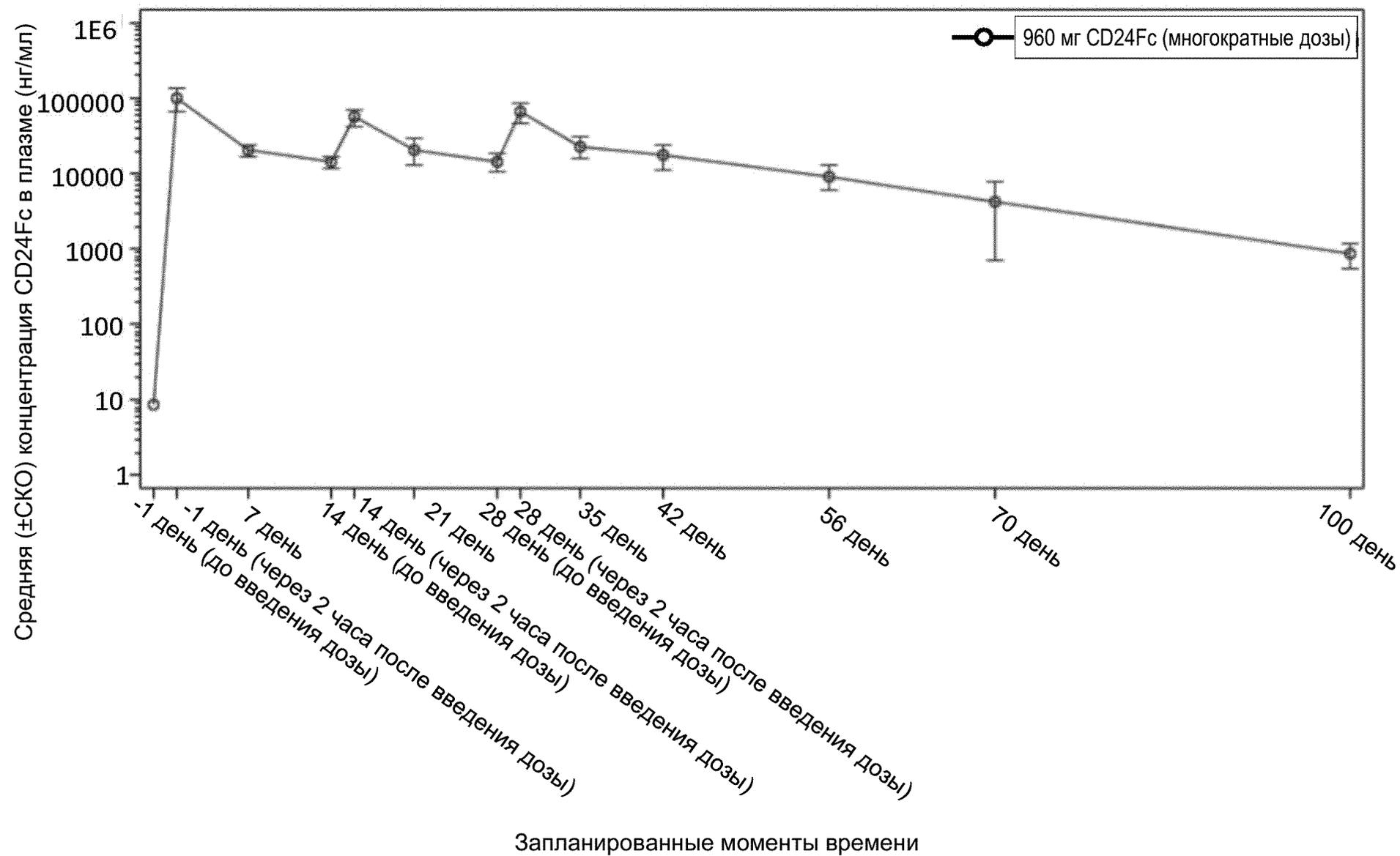
ФИГ. 22А



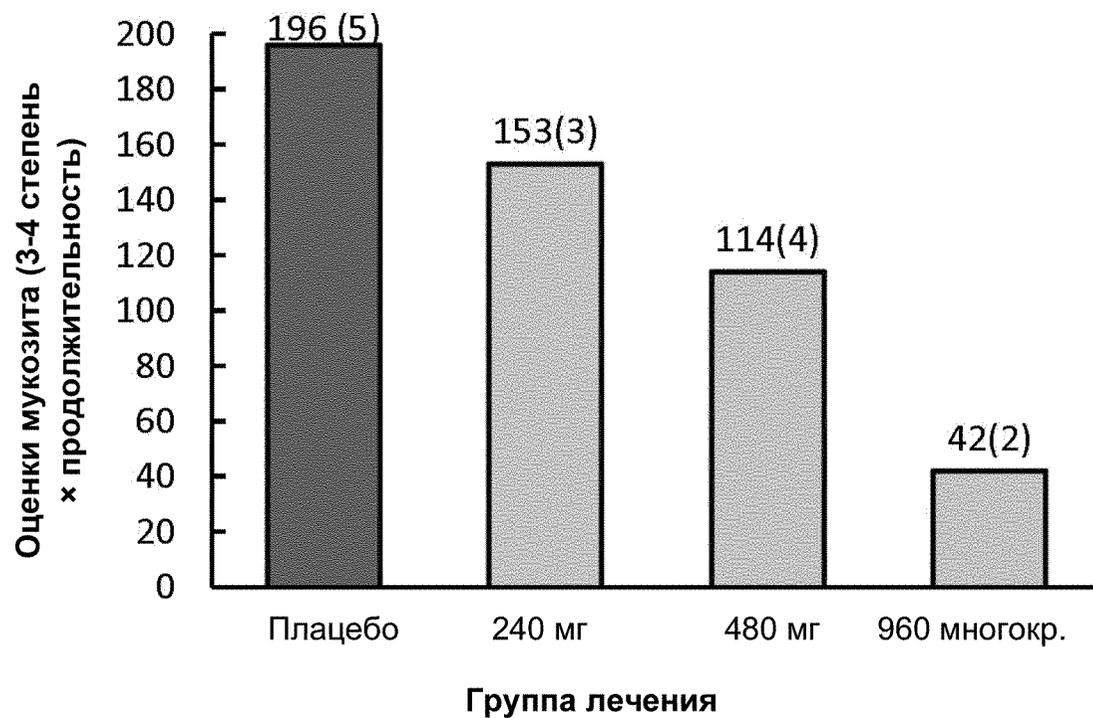
ФИГ. 22В



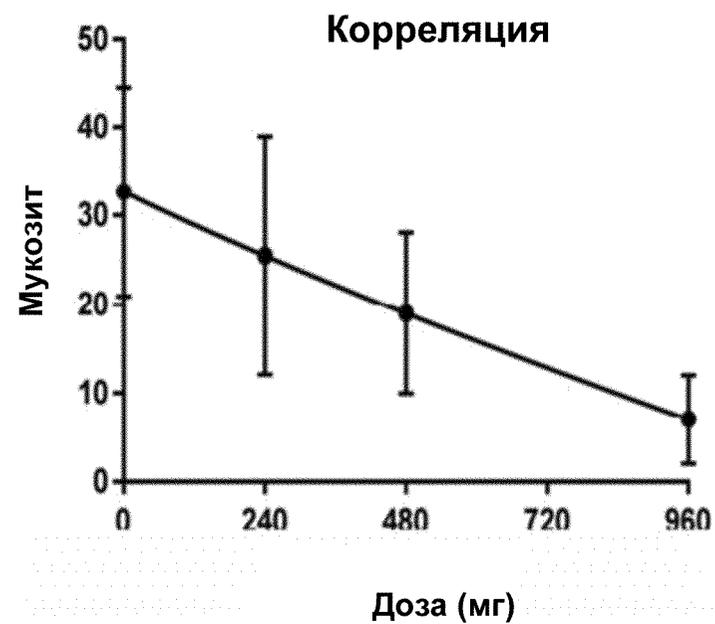
ФИГ. 23А



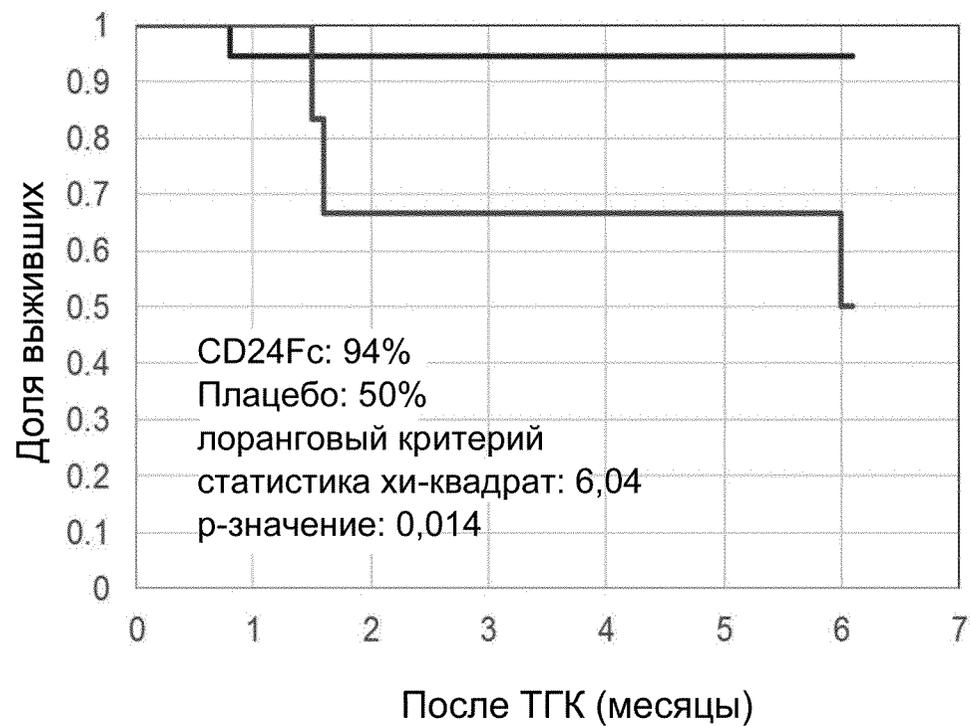
ФИГ. 23В



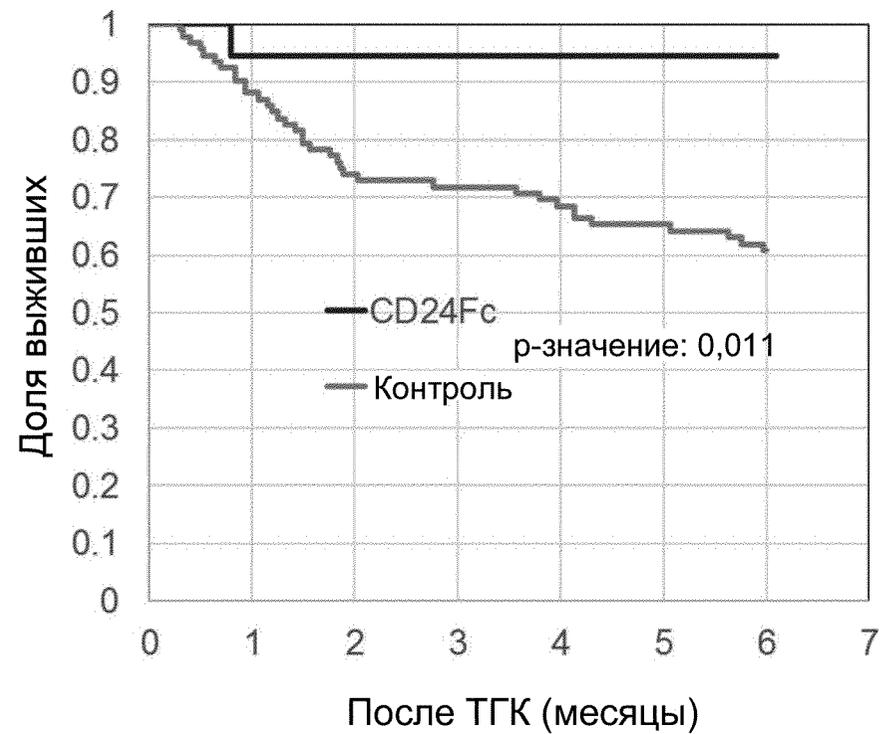
ФИГ. 24А



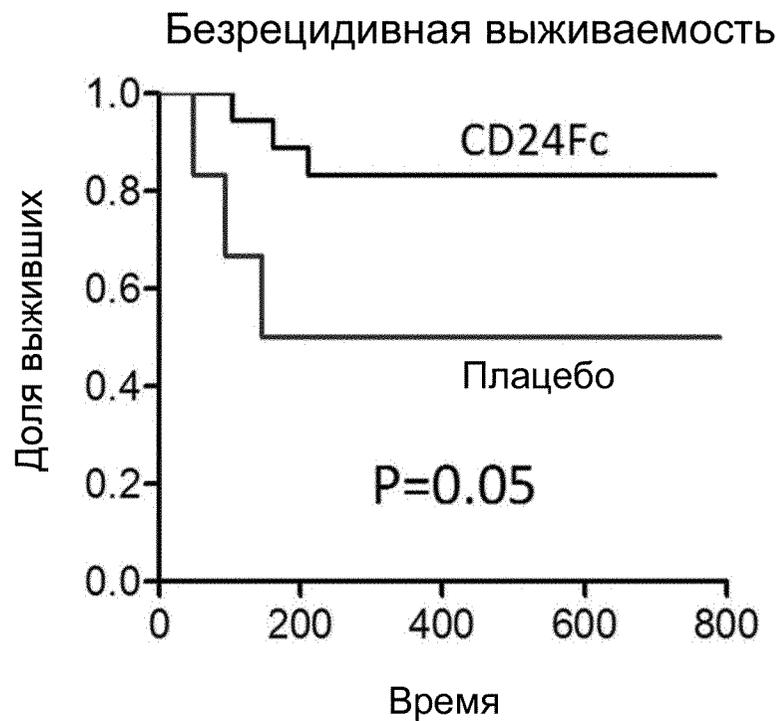
ФИГ. 24В



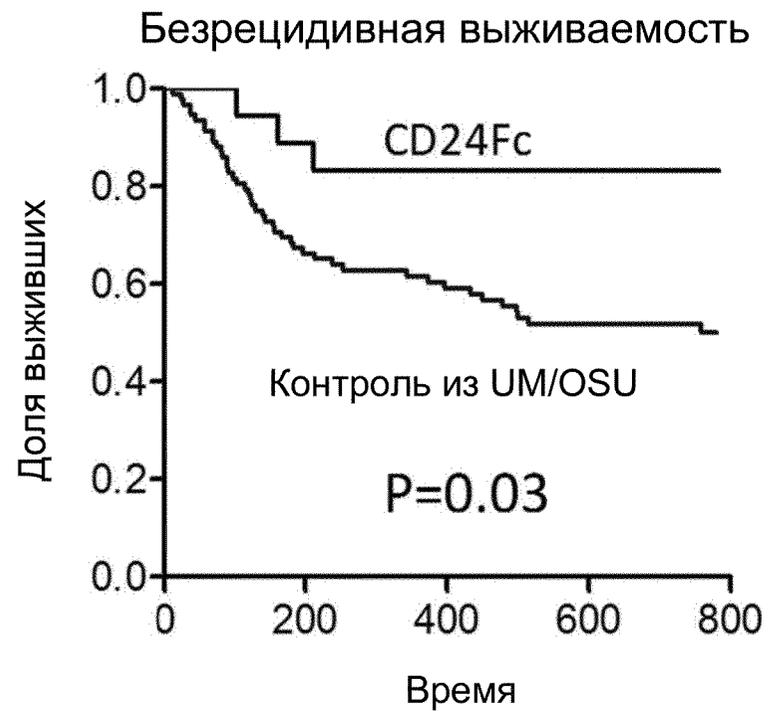
ФИГ. 25А



ФИГ. 25В



ФИГ. 26А



ФИГ. 26В