

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192662 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.11

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.25

(54) МУТЕИН ЛИПОКАЛИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АСТМЫ

(31) 62/826,791; 62/845,774; 62/906,443

(32) 2019.03.29; 2019.05.09; 2019.09.26

(33) US

(86) PCT/EP2020/058360

(87) WO 2020/200960 2020.10.08

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:

Акселссон Лена Терез (SE), Клоуз
Дэвид Роберт (GB), Гардинер Филип,
Яухианинен Ауликки Ингергард
Александра, Пардали Екатерина (SE),
Фицджеральд Мари, Мачинер Габриле
(DE), Брунс Ингмар (US), Олссон
Гуннел Марита (SE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к лечению астмы у субъекта-человека путем введения с помощью ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α) или его варианта или фрагмента указанному субъекту, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,1 до около 160 мг. Мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно, например, вводить по меньшей мере один раз в день, один раз в день или два раза в день.

A1

202192662

202192662

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570813EA/061

МУТЕИН ЛИПОКАЛИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АСТМЫ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к лечению астмы у человека путем введения с помощью ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α) или его варианта или фрагмента указанному субъекту, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,1 мг до около 160 мг. Мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно, например, вводить по меньшей мере один раз в день, один раз в день или два раза в день.

Уровень техники

Липокалины представляют собой белковые связывающие молекулы, обладающие антителоподобными функциями, которые естественным образом эволюционировали для связывания лигандов. Липокалины встречаются во многих организмах, включая позвоночных, насекомых, растения и бактерии. Представители семейства белков липокалина (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214) обычно представляют собой небольшие секретируемые белки и имеют одну полипептидную цепь. Они характеризуются рядом различных свойств распознавания молекул: способностью связывать различные, в основном гидрофобные молекулы (такие как ретиноиды, жирные кислоты, холестерин, простагландины, биливердины, феромоны, вкусовые добавки и отдушки), способностью связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности и образовывать с ними макромолекулярные комплексы. Хотя в прошлом они классифицировались в первую очередь как транспортные белки, теперь ясно, что липокалины выполняют множество физиологических функций. Такие функции включают участие в транспорте ретинола, обонянии, передаче сигналов феромонов и синтезе простагландинов. Липокалины также участвуют в регуляции иммунного ответа и опосредовании клеточного гомеостаза (см. обзор, например, в публикации Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14 и Flower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24).

Липокалины имеют необычно низкие уровни консервативности общей последовательности, часто с идентичностью последовательностей менее 20%. В отличие от этого, их общий профиль складчатости очень консервативен. Центральная часть структуры липокалина состоит из одного восьмицепочечного антипараллельного β -слоя, замкнутого на себя, с образованием непрерывно связанного водородными связями β -цилиндра. Этот β -цилиндр образует центральную полость. Один конец цилиндра стерически заблокирован N-концевым пептидным сегментом, который проходит через его дно, а также тремя пептидными петлями, соединяющими β -нити. Другой конец β -цилиндра открыт для растворителя и охватывает сайт связывания мишени, который образован четырьмя гибкими петлями пептида. Именно это разнообразие петель в остальном жестком каркасе липокалина дает начало множеству различных способов

связывания, каждый из которых способен приспосабливаться к мишеням разного размера, формы и химической природы (см., например, в публикации Flower, D.R. (1996), *выше*; Flower, D.R. et al. (2000), *выше*, или Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350).

Липокалин слезной жидкости человека (TLPC или Tlc), также называемый липокалином-1, преальбумином слезы или белком железы фон Эбнера, первоначально был описан как основной белок слезной жидкости человека (примерно одна треть от общего содержания белка), но также был обнаружен в нескольких других секреторных тканях, включая предстательную железу, надпочечники, тимус, молочную железу, яички, слизистую оболочку носа и трахеи, а также кортикотрофы гипофиза. Гомологичные белки были обнаружены у макаки-резуса, шимпанзе, крысы, мыши, свиньи, хомяка, коровы, собаки и лошади. Липокалин слезы является нетиповым представителем липокалина в том смысле, что он демонстрирует необычно широкую лигандную специфичность по сравнению с другими липокалинами и высокую неселективность относительно нерастворимых липидов (см. публикацию Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482; 241-248). Эта особенность липокалина слезы объясняется его функцией подавления роста бактерий и грибков на роговице. Значительное количество липофильных соединений различных химических классов, таких как жирные кислоты, жирные спирты, фосфолипиды, гликолипиды и холестерин, являются эндогенными лигандами этого белка. Представляет интерес тот факт, что в отличие от других липокалинов сила связывания лиганда (мишени) с липокалином слезы коррелирует с длиной углеводородного хвоста как для алкиламидов, так и для жирных кислот. Таким образом, липокалин слезы сильнее всего связывается с наименее растворимыми липидами (Glasgow, B.J. et al. (1995) *Curr. Eye Res.* 14, 363-372; Gasymov, O.K. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 307-320). Кристаллическая структура липокалина слезы 1,8-А выявила необычно большую полость внутри его β -цилиндра (Breustedt, D.A. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 1, 484-493).

Международная патентная заявка WO 99/16873 описывает полипептиды семейства липокалинов с мутантными аминокислотными положениями в области четырех пептидных петель, которые расположены на конце цилиндрической β -цилиндрической структуры, охватывающей связывающий карман, и которые соответствуют этим сегменты в линейной полипептидной последовательности, которая включает положения аминокислот 28-45, 58-69, 86-99 и 114-129 билин-связывающего белка *Pieris brassicae*. Сообщалось о посттрансляционной модификации представителей семейства липокалинов, например, фосфорилирование и гликозилирование липокалина слезы (например, You, J., et al. (2010) *Electrophoresis* 31, 1853-1861). Тем не менее, для их свойств молекулярного распознавания посттрансляционная модификация не требуется.

Международная патентная заявка WO 00/75308 описывает мутеины билин-связывающего белка, которые специфически связывают дигоксигенин, тогда как международные патентные заявки WO 03/029463 и WO 03/029471 относятся к мутеинам липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов человека (hNGAL) и аполипопротеина D, соответственно. Для дополнительной оптимизации и точной

регуляции аффинности и специфичности лигандов, а также стабильности фолдинга варианта липокалина были предложены различные подходы с применением различных представителей семейства липокалинов (Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 257-275; Schlehuber, S., и Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* 96, 213-228), например, замена дополнительных аминокислотных остатков. В публикации РСТ WO 2006/56464 описаны мутеины липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов человека, с аффинностью связывания с CTLA-4 в низком наномолярном диапазоне.

Международная патентная заявка WO 2005/19256 описывает мутеины липокалина слезы по меньшей мере с одним сайтом связывания для разных или одинаковых лигандов-мишеней и предлагает способ получения таких мутеинов липокалина слезы человека. Согласно этой заявке РСТ, некоторые аминокислоты распространяются в пределах первичной последовательности липокалина слезы, в частности, участки петли, которые включают аминокислоты 7-14, 24-36, 41-49, 53-66, 69-77, 79-84, 87-98 и 103-110 зрелого липокалина слезы человека подвергаются мутагенезу для получения мутеинов с аффинностью связывания. Полученные мутеины обладают аффинностью связывания с выбранным лигандом (K_D) в наномолярном диапазоне, в большинстве случаев > 100 нМ. Международная патентная заявка WO 2008/015239 описывает мутеины липокалина слезы, связывающего данный неприродный лиганд, включая рецептор IL-4 альфа. Аффинности связывания находятся в наномолярном диапазоне. В международной патентной заявке WO 2011/154420 описаны мутеины липокалина слезы человека с высокой аффинностью, которые связываются с рецептором IL-4 альфа человека в наномолярном диапазоне, и способы получения таких мутеинов с высокой аффинностью. В международной патентной заявке WO 2013/087660 описано применение мутеинов липокалина слезы человека для лечения нарушений, при которых путь IL-4/IL-13 вносит вклад в патогенез заболевания, включая астму.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на исследованиях на людях липокалина слезы человека против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α) PRS-060/AZD1402, который является первым препаратом для лечения астмы на основе липокалина. Аминокислотная последовательность PRS-060/AZD1402 приведена в Таблице 20 как SEQ ID NO: 1. PRS-060/AZD1402 противодействует рецептору IL-4 альфа (IL-4R α) и предназначен для ингаляции. Первое исследование на людях с участием здоровых субъектов было проведено для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики (ФК) ингаляционных однократных возрастающих доз и доз для внутривенной инфузии (в/в). Второе исследование на людях с участием субъектов с легкой степенью астмы было проведено для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики (ФК) ингаляционных многократных возрастающих доз. После ингаляции AZD1402/PRS-060 системное связывание с мишенью определяли по ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 (pSTAT6), а фракционный оксид азота в выдыхаемом воздухе (FeNO), биомаркер воспаления легких, измеряли как индикатор локального поражения

легочной мишени.

Основываясь на результатах этих исследований, которые представлены в данном документе, в настоящем изобретении предлагается способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, указанному субъекту, при этом доставленная доза указанного мутеина липокалина, или его варианта или фрагмента, составляет от около 0,1 мг до около 160 мг. Мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить по меньшей мере один раз в день, один раз в день или два раза в день.

Настоящее изобретение также относится к мутеину липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или ее вариант или фрагмент, для применения в способе лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанный способ включает этап введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту путем ингаляции, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,1 мг до около 160 мг. Мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить по меньшей мере один раз в день, один раз в день или два раза в день.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, для изготовления лекарственного средства для лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанное лечение включает введение указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента, указанному субъекту путем ингаляции, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его фрагмента или варианта составляет от около 0,1 мг до около 160 мг. Мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить по меньшей мере один раз в день, один раз в день или два раза в день.

Основываясь на результатах этих исследований, которые представлены в данном документе, в настоящем изобретении предлагается способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, указанному субъекту по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

Настоящее изобретение также относится к мутеину липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианту или фрагменту, для применения в способе лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанный способ включает этап введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту путем

ингаляции по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, для изготовления лекарственного средства для лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанное лечение включает введение указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента, указанному субъекту путем ингаляции по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его фрагмента или варианта составляет от около 0,2 мг до около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его фрагмента или варианта составляет от около 0,6 мг до около 60 мг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его вариант или фрагмент, вводят указанному субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить субъекту два раза в день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить указанному субъекту в течение по меньшей мере одного дня, по меньшей мере двух дней, по меньшей мере трех дней, по меньшей мере четырех дней, по меньшей мере пяти дней, по меньшей мере шести дней, по меньшей мере семи дней, по меньшей мере восьми дней, по меньшей мере девяти дней или по меньшей мере десяти дней.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить субъекту два раза в день в течение 9 дней и один раз в день на десятый день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, основанных на примерах, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 0,1 мг, около 0,5 мг, около 2 мг, около 8 мг, около 24 мг, около 72 мг или около 160 мг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, основанных на примерах, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 0,2 мг, около 2 мг, около 6 мг, около 20 мг или около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемые дозы вводят по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

доставляемые дозы вводят один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемые дозы вводят два раза в день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, основанных на примерах, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 0,2 мг, около 0,6 мг, около 2 мг, около 6 мг, около 20 мг или около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемые дозы вводят по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемые дозы вводят один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемые дозы вводят два раза в день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента достаточна для достижения системного воздействия, как продемонстрировано в примерах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента не приводит к попаданию существенной части вдыхаемого мутеина липокалина в систему кровообращения или к обнаруживаемому системному воздействию, как продемонстрировано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 8 мг. Системное воздействие мутеина липокалина наблюдали при доставляемых дозах, составляющих по меньшей мере около 8 мг, как сообщается в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. Системное воздействие мутеина липокалина наблюдали при доставляемых дозах, составляющих по меньшей мере около 6 мг, как сообщается в данном документе.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или менее чем около 2 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при

доставляемых дозах около 2 мг или менее чем около 2 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при доставляемых дозах около 2 мг или менее чем около 2 мг. Как сообщается в данном документе, в сыворотке субъектов не было обнаруживаемого мутеина липокалина до 30 дней после введения дозы, когда доставляемая доза составляла менее чем около 2 мг и, следовательно, в течение этого времени системное воздействие не определялось.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при доставляемых дозах около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при доставляемых дозах около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет более чем около 0,6 мг или менее чем около 2 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 8 мг, введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+T-клетках у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг, введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+T-клетках у указанного субъекта. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или менее чем около 2 мг, введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту

не приводит к значительному ингибированию П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+Т-клетках у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% , по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% ингибирования П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 20% ингибированию П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта. В других вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента не приводит к значительному ингибированию П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта, например, когда доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или его фрагмента составляет около 2 мг или менее чем около 2 мг.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% , по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% ингибирования П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 20% ингибированию П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта. В других вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента не приводит к значительному ингибированию П-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта, например, когда доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или его фрагмента составляет около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг.

В любых вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых введение

мутеина липокалина или его варианта или фрагмента не приводит к значительному ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+Т-клетках у указанного субъекта, введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, может привести к менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2% или менее чем 1% ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

В данном документе описан способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора ИЛ-4 альфа (ИЛ-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или его вариант или фрагмент указанному субъекту, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% , по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% ингибирования ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к по меньшей мере около 20% ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

Также в данном документе описан способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора ИЛ-4 альфа (ИЛ-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или его вариант или фрагмент указанному субъекту, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина не приводит к значительному ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день.

В любых вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента не приводит к значительному ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+Т-клетках у указанного субъекта, введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, может привести к менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2% или менее чем 1% ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента может привести к ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+Т-клетках со значением IC_{50} , составляющим около 10 нМ или ниже, около 5 нМ или ниже, около 4 нМ или ниже, около 3 нМ или ниже, около 2 нМ или ниже, около 1 нМ или ниже, или около 0,5 нМ или ниже. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует ИЛ-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+Т-клетках со значением IC_{50} , составляющим около 0,35 нМ, как продемонстрировано на Фигуре 3. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует ИЛ-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+Т-клетках со значением IC_{50} , составляющим около 0,306 нМ, как продемонстрировано на Фигуре 11. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует ИЛ-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+Т-клетках со значением IC_{50} , составляющим около 0,30 нМ, как продемонстрировано на Фигуре 15.

Как продемонстрировано в Таблице 1, мутеин липокалина, имеющий аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, ингибирует ИЛ-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+ Т-клетках *in vitro* со значением IC_{50} , составляющим около 1,3 нМ.

В данном документе описан способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора ИЛ-4 альфа (ИЛ-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или его вариант или фрагмент указанному субъекту, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию ИЛ-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC_{50} , составляющим около 10 нМ или ниже, около 5 нМ или ниже, около 4 нМ или ниже, около 3 нМ или ниже, около 2 нМ или ниже, около 1 нМ или ниже, или около 0,5 нМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина

или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует IL-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+T-клетках со значением IC₅₀, составляющим около 0,35 нМ. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует IL-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+T-клетках со значением IC₅₀, составляющим около 0,306 нМ. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения введение мутеина липокалина или его варианта или фрагмента ингибирует IL-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+T-клетках со значением IC₅₀, составляющим около 0,30 нМ.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, мутеин липокалина или его фрагмент или вариант может иметь период полужизни ($t_{1/2}$) от около 3 часов до около 7 часов в организме субъекта после ингаляционного введения. Эти значения основаны на данных, представленных в Таблице 7, с учетом стандартного отклонения.

Для сравнения, после внутривенного введения мутеин липокалина может иметь период полужизни ($t_{1/2}$) от около 1,5 до 2,5 часов, исходя из данных, представленных в Таблице 8.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, пиковая сывороточная концентрация (C_{max}) мутеина липокалина после введения субъекту может составлять от около 6 нг/мл до около 400 нг/мл. Эти значения основаны на данных, представленных в Таблице 7 для когорт 4-7, с учетом стандартного отклонения.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, сывороточная концентрация с течением времени (AUC_{inf}) указанного мутеина липокалина после введения субъекту составляет от около 60 ч*нг/мл до около 5000 ч*нг/мл. Эти значения основаны на данных, представленных в Таблице 7 для когорт 4-7, с учетом стандартного отклонения.

Сокращения, относящиеся к фармакокинетике (например, C_{max} и AUC_{inf}) и объяснение их значений представлены в Таблице 19 ниже.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) субъекта может снижаться после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения FeNO может быть снижено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% по сравнению с контрольным субъектом после введения указанного

мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту, при этом контрольный субъект представляет собой пациента-человека, которому не вводили указанный мутеин липокалина, или его вариант или фрагмент. Контрольный субъект может быть тем же субъектом (при этом FeNO оценивается до введения мутеина липокалина) или другим субъектом, которому не вводили какой-либо мутеин липокалина. В одном варианте осуществления настоящего изобретения контрольный субъект мог получать плацебо. Пригодное плацебо может включать физиологически забуференный солевой раствор, такой как раствор, применяемый для получения мутеина липокалина, например, забуференный фосфатом солевой раствор.

Данные, представленные в данном документе, демонстрируют, что содержание FeNO может быть снижено даже при отсутствии обнаруживаемого системного воздействия указанного мутеина липокалина в сыворотке (пролеченного) субъекта. Это может указывать на то, что можно достичь уменьшения местного воспаления, что оценивается с помощью FeNO в качестве биомаркера, без обнаруживаемого системного воздействия мутеина липокалина. Следовательно, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия в легких без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без обнаруживаемого системного воздействия. Таким образом, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг может обеспечить клиническую пользу пациенту с астмой. Следовательно, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия в легких без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без обнаруживаемого системного воздействия. Таким образом, доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 0,6 мг или менее чем около 0,6 мг может обеспечить клиническую пользу пациенту с астмой.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, мутеин липокалина или его вариант или фрагмент можно вводить субъекту путем распыления.

Когда мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят путем распыления, номинальная или отмеренная доза (которая представляет собой дозу мутеина липокалина в небулайзере) составляет от около 0,25 мг до около 400 мг. Это номинальная или отмеренная доза, присутствующая в небулайзере InnoSpire Go (Philips), применяемом в описанных в данном документе примерах. Специалист в данной области техники должен знать, что для введения путем ингаляции доступны различные устройства, как описано в данном документе, и сможет легко определить доставляемую дозу в соответствии с настоящим изобретением на основе номинальной или отмеренной дозы в конкретном

устройстве, применяемом для введения мутеина липокалина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения номинальная доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 20 мг. Системное воздействие мутеина липокалина наблюдали при номинальных дозах, составляющих по меньшей мере около 20 мг, как сообщается в настоящем документе, и при введении мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+T-клетках у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения номинальная доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 15 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. Системное воздействие мутеина липокалина наблюдали при номинальных дозах, составляющих по меньшей мере около 15 мг, как сообщается в настоящем документе, и при введении мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+T-клетках у указанного субъекта.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения номинальная доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 5 мг или менее чем около 5 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при номинальных дозах около 5 мг или менее чем около 5 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при номинальных дозах около 5 мг или менее чем около 5 мг. Как сообщается в данном документе, в сыворотке (пролеченных) субъектов не было обнаруживаемого мутеина липокалина, измеренного в течение 30 дней после введения дозы, когда номинальная доза составляла менее чем около 5 мг и, следовательно, в течение этого времени системное воздействие не определялось.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения номинальная доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 1,5 мг или менее чем около 1,5 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в

день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при номинальных дозах около 1,5 мг или менее чем около 1,5 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствует существенное системное воздействие мутеина липокалина при номинальных дозах около 1,5 мг или менее чем около 1,5 мг. Как сообщается в данном документе, в сыворотке (пролеченных) субъектов не было обнаруживаемого мутеина липокалина, измеренного в течение 30 дней после введения дозы, когда номинальная доза составляла менее чем около 1,5 мг и, следовательно, в течение этого времени системное воздействие не определялось.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения номинальная доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет более чем около 1,5 мг или менее чем около 5 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту два раза в день.

Краткое описание графических материалов

Варианты осуществления и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, далее будут обсуждаться со ссылкой на прилагаемые фигуры.

На Фиг.1 продемонстрировано, что добавление *in vitro* мутеина липокалина, специфичного для IL-4R α (PRS-060/AZD1402 имеющего SEQ ID NO: 1), ингибирует передачу сигнала IL-4 в цельной крови, снижая уровни фосфорилирования STAT6 (pSTAT6) (Фиг. 1A), и продукцию эотаксина-3 (Фиг. 1B), TARC (Фиг. 1C) и MDC (Фиг. 1D), индуцированную стимуляцией IL-4. Мутеин липокалина имеет эффективность, аналогичную эталонному антителу к IL-4R α (дупилумаб) в этих функциональных анализах *in vitro*. Дупилумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело Ig4, направленное против субъединицы рецептора интерлейкина-4 α (IL-4R α) семейства рецепторов IL-4 и IL-13. Обычно он вводится подкожно и одобрен для лечения атопического дерматита и умеренной и тяжелой эозинофильной астмы в США.

На Фигуре 2 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1) в различных доставляемых дозах.

На Фигуре 3 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших

ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1). Наблюдалось дозозависимое ингибирование STAT6 фосфорилирования со значением IC_{50} , составляющим 0,35 нМ

На Фигуре 4 представлен результат фармакокинетического анализа однократной дозы PRS-060/AZD1402 (продемонстрированный как SEQ ID NO: 1), вводимой путем пероральной ингаляции здоровым субъектам. Системное воздействие ингаляционного PRS-060/AZD1402 наблюдали при доставляемой дозе 8,00 мг или выше. Средние сывороточные концентрации PRS-060/AZD1402 увеличивались с повышением доз. Наблюдалось медленное снижение ФК в сыворотке после ингаляции, что указывает на элиминацию, обусловленную абсорбцией. На этой фигуре продемонстрирована средняя (СО) концентрация ингаляционного PRS-060/AZD1402 в сыворотке *в сравнении с* временными профилями только в Когортах 4-7 с линейной шкалой (популяция для изучения ФК). СО=стандартное отклонение; ФК=фармакокинетика.

На Фигуре 5 представлен результат фармакокинетического анализа однократной дозы PRS-060/AZD1402 (продемонстрированный как SEQ ID NO: 1), вводимой путем пероральной ингаляции здоровым субъектам. Системное воздействие ингаляционного PRS-060/AZD1402 наблюдали при доставляемой дозе 8,00 мг или выше. Средние сывороточные концентрации PRS-060/AZD1402 увеличивались с повышением доз. Наблюдалось медленное снижение ФК в сыворотке после ингаляции, что указывает на элиминацию, обусловленную абсорбцией. На этой фигуре продемонстрирована средняя (СО) концентрация ингаляционного PRS-060/AZD1402 в сыворотке *в сравнении с* временными профилями только в Когортах 4-7 с лог-линейной шкалой (популяция ФК). СО=стандартное отклонение; ФК=фармакокинетика.

На Фигуре 6 представлен результат фармакокинетического анализа однократной дозы PRS-060/AZD1402 (продемонстрированный как SEQ ID NO: 1), вводимой внутривенным путем здоровым субъектам. Средние уровни PRS-060/AZD1402 в сыворотке указывают на фазу быстрой элиминации со значением $t_{1/2}$ примерно вдвое меньшим, чем у субъектов, получавших ингаляционные дозы. На фигуре продемонстрирована средняя (СО) концентрация ингаляционного PRS-060/AZD1402 в сыворотке *в сравнении с* временными профилями после внутривенного введения в когорте 8 (1 мг) и когорте 9 (2 мг) с линейной шкалой (популяция для изучения ФК). СО=стандартное отклонение; ФК=фармакокинетика.

На Фигуре 7 представлен результат фармакокинетического анализа однократной дозы PRS-060/AZD1402 (продемонстрированный как SEQ ID NO: 1), вводимой внутривенным путем здоровым субъектам. Средние уровни PRS-060/AZD1402 в сыворотке указывают на фазу быстрой элиминации со значением $t_{1/2}$ примерно вдвое меньшим, чем у субъектов, получавших ингаляционные дозы. На этой фигуре продемонстрирована средняя (СО) концентрация ингаляционного PRS-060/AZD1402 в сыворотке *в сравнении с* временными профилями после внутривенного введения в Когорте 8 (1 мг) и Когорте 9 (2 мг) с лог-линейной шкалой (популяция для изучения ФК). СО=стандартное отклонение; ФК=фармакокинетика.

На Фигуре 8 продемонстрировано среднее процентное изменение концентрации фракционного оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) от исходного уровня для группы плацебо и доставляемых доз 2 мг, 6 мг и 20 мг. Групповые средние значения рассчитывали на основе логарифма (FeNO) изменения от исходного уровня, обратного преобразования в линейную шкалу и выражали в процентах.

На Фигуре 9 продемонстрированы профили средней концентрации в сыворотке после введения доз 2, 6 и 20 мг PRS-060/AZD1402 дважды в день.

На Фигуре 10 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1) в различных доставляемых дозах (2,0 мг, 6,0 мг и 20 мг).

На Фигуре 11 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1). Наблюдали дозозависимое ингибирование STAT6 фосфорилирования со значением IC₅₀, составляющим 0,306 нМ.

На Фигуре 12 продемонстрировано среднее процентное изменение FeNO относительно исходного уровня для группы плацебо (n=12) и дозовых групп когорты 1-4. Групповые средние значения рассчитывали на основе log (FeNO) изменения от исходного уровня, обратного преобразования в линейную шкалу и выражали в процентах.

На Фигуре 13 продемонстрированы профили медианной концентрации в сыворотке после введения доз 2, 6, 20 и 60 мг PRS-060/AZD1402.

На Фигуре 14 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1) в различных доставляемых дозах (2,0 мг, 6,0 мг, 20 мг и 60 мг).

На Фигуре 15 продемонстрировано ингибирование STAT6 фосфорилирования (pSTAT6) *ex vivo* в цельной крови, стимулированной IL-4, у субъектов, получавших ингаляционный PRS-060/AZD1402 (имеющий SEQ ID NO: 1). Наблюдали дозозависимое ингибирование STAT6 фосфорилирования со значением IC₅₀, составляющим 0,30 нМ.

На Фигуре 16 продемонстрирован дизайн исследования MAD, соответствующий только когортам 1-4 из Примера 4. Продемонстрированные дозы представляют собой многократные дозы препарата (доставляемые дозы с частотой 2 р/д (два раза в день)) PRS-060/AZD1402 с частотой 2 р/д, вводимые с интервалом 12 часов. В день -1, за 1 день до получения первой дозы AZD1402/PRS-060 или соответствующего плацебо, участников оценивали для подтверждения соответствия критериям возможности участия в исследовании. Участники госпитализировались в больницу/исследовательский центр и оставались в больнице/исследовательском центре до момента выписки, наступавшего через 48 часов после (день 12) последней дозы исследуемого препарата (день 10). Исследуемый препарат вводили с помощью небулайзера InnoSpire Go в дозах от 2 до 60 мг два раза в день. в течение 9 дней с одной дозой на день 10. Продолжительность

исследования от скрининга до контрольного визита после исследования составляла примерно 9 недель для каждого участника.

На Фигуре 17 продемонстрирован дизайн исследования SAD из Примера 2.

Подробное описание изобретения

Аспекты и варианты осуществления данного изобретения теперь будут проиллюстрированы со ссылкой на прилагаемые фигуры. Дополнительные аспекты и варианты осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники.

Настоящее изобретение относится к способу лечения астмы у субъекта-человека. Астма представляет собой хроническое, комплексное и гетерогенное респираторное заболевание, характеризующееся рядом патогенных признаков, включая воспаление легких, гиперсекрецию слизи, непостоянную обструкцию дыхательных путей и ремоделирование дыхательных путей. Заболевание определяется наличием респираторных симптомов в анамнезе, включая хрипы, одышку и кашель, которые меняются с течением времени и по степени тяжести. Как симптомы заболевания, так и обструкция дыхательных путей могут быть вызваны рядом факторов, включая физические упражнения, воздействие вдыхаемых раздражителей или аллергенов или респираторные инфекции. Пациенты подвержены риску обострения астмы (обострения). Эти обострения астмы могут быть опасными для жизни и могут значительно повлиять на качество жизни пациента. Лечение большинства пациентов с астмой состоит из контролирующего режима и терапии бронходилататорами. Ингаляционные кортикостероиды (ICS) считаются «золотым стандартом» в борьбе с симптомами астмы, а бета-агонисты длительного действия (LABA) являются наиболее эффективными бронходилататорами, доступными в настоящее время. Пероральные кортикостероиды остаются стандартом лечения тяжелой астмы, но ассоциированы со значительными побочными эффектами, в то время как омализумаб, моноклональное антитело против IgE; бенрализумаб, меполизумаб и реслизумаб, антитела против IL-5 и дупилумаб (США), моноклональное антитело, блокатор IL-4R α и IL-13, предлагают ограниченное количество вариантов для тяжелых пациентов. Кроме того, состояние пациентов часто не контролируется посредством ICS/LABA и даже ограниченным количеством альтернативных методов лечения, что подчеркивает неудовлетворенную потребность в новых методах лечения астмы.

Интерлейкин-4, интерлейкин-13, интерлейкин-4-рецептор альфа и сигнальный преобразователь и активатор фактора транскрипции-6 являются ключевыми компонентами в развитии воспаления дыхательных путей, образования слизи и гиперчувствительности дыхательных путей при астме.

Способ лечения астмы включает введение терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α) или его варианта или фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается доза, которая вызывает эффекты, с целью которых ее вводят. «Терапевтически эффективное

количество» мутеина липокалина, как описано в данном документе, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол, диета, время введения, взаимодействие с лекарственными средствами и тяжесть состояния, и может быть установлено с помощью обычных экспериментов специалистами в данной области техники. Терапевтически эффективное количество при применении в настоящей заявке также представляет собой такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты мутеина липокалина уступают терапевтически полезным эффектам.

Альфа-цепь рецептора интерлейкина-4 (IL-4R α) представляет собой трансмембранный белок типа I, который может связывать интерлейкин 4 и интерлейкин 13, регулируя выработку антител IgE в В-клетках. Среди Т-клеток, кодируемый белок также может связывать интерлейкин 4, способствуя дифференцировке клеток Th2.

Мутеины липокалина, которые специфичны для рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), в частности IL-4R α человека описаны в международных патентных публикациях WO 2008/015239, WO 2011/154420 и WO 2013/087660. Альфа-цепь рецептора интерлейкина-4 человека может иметь аминокислотную последовательность в банке данных SWISS-PROT с номером доступа P24394, которая представлена как SEQ ID NO: 4, или ее фрагменты. Иллюстративный пример фрагмента альфа-цепи рецептора интерлейкина-4 человека включает аминокислоты с 26 по 232 рецептора IL-4 альфа.

Мутеин липокалина, специфичный к IL-4R α , имеющий аминокислотную последовательность, продемонстрированную как SEQ ID NO:1 представляет собой мутеин липокалина слезы человека.

В данном контексте термин «мутеин» относится к замене, делеции или вставке одного или большего количества нуклеотидов или аминокислот по сравнению с природной (дикого типа) нуклеиновой кислотой или «эталонным» белком, который предпочтительно представляет собой зрелый липокалин слезы человека, продемонстрированный как SEQ ID NO: 3. Указанный «эталонный каркас» также включает мутеин или его фрагмент или вариант, как описано в данном документе.

Аминокислотная последовательность липокалина слезы человека представлена в банке данных SWISS-PROT с номером доступа P31025, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 2. Зрелый липокалин слезы человека не включает N-концевой сигнальный пептид, который включен в последовательность SWISS -PROT с номером доступа P31025, т.е. в нем отсутствует N-концевой сигнальный пептид (аминокислоты 1-18), который включен в последовательность SWISS-PROT с инвентарным номером SWISS-PROT с номером доступа P31025. Аминокислотная последовательность зрелого липокалина слезы человека представлена в SEQ ID NO: 3.

Мутеин липокалина, применяемый в настоящем изобретении, содержит SEQ ID NO: 1 или является ее вариантом или фрагментом. Мутеин липокалина, продемонстрированный как SEQ ID NO: 1, представляет собой вариант зрелого липокалина слезы человека, продемонстрированный как SEQ ID NO: 3, в котором

отсутствуют первые четыре аминокислоты и который включает, *среди прочего*, следующие аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям последовательности. аминокислотной последовательности зрелого липокалина слезы человека, представленной как SEQ ID NO: 3: Arg 26 → Ser, Glu 27 → Arg, Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg, Met 31 → Ala, Asn 32 → Val, Leu 33 → Tyr, Glu 34 → Asn, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gln, Ile 57 → Arg, Ser 58 → Lys, Cys 61 → Trp, Glu 63 → Lys, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Arg, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Cys, His 106 → Pro и Lys 108 → Gln.

Мутеин липокалина, применяемый в настоящем изобретении, содержит SEQ ID NO: 1 или является ее вариантом или фрагментом. Мутеин липокалина, продемонстрированный как SEQ ID NO: 1, представляет собой вариант зрелого липокалина слезы человека, продемонстрированный как SEQ ID NO: 3, в котором отсутствуют первые четыре аминокислоты и который включает, *среди прочего*, следующие аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям последовательности. аминокислотной последовательности зрелого липокалина слезы человека, представленной как SEQ ID NO: 3: Arg 26 → Ser, Glu 27 → Arg, Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg, Met 31 → Ala, Asn 32 → Val, Leu 33 → Tyr, Glu 34 → Asn, Val 53 → Phe, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gln, Ile 57 → Arg, Ser 58 → Lys, Cys 61 → Trp, Glu 63 → Lys, Val 64 → Tyr, Ala 66 → Leu, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Arg, Tyr 100 → His, Cys 101 → Ser, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Cys, His 106 → Pro, Lys 108 → Gln, Arg 111 → Pro, Lys 114 → Trp и Cys 153 → Ser.

В данном контексте термин «вариант» относится к производным белка или полипептида, которые включают мутации, например, путем замен, делеций, вставок и/или химических модификаций аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такие мутации и/или химические модификации не снижают функциональность белка или пептида. Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток заменен химически подобным аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замены среди представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. Такие варианты включают белки или полипептиды, в которых одна или большее количество аминокислот были заменены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от встречающихся в природе 20 аминокислот, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Такие варианты также включают, например, белки или полипептиды, в которых один или большее количество аминокислотных остатков добавлены или удалены на N- и/или C-конце, например, делеция четырех аминокислот с N-конца и/или двух аминокислот с C-конца. Как правило, вариант содержит по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере

мере около 90%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности аминокислотной последовательности с нативной последовательностью белка или полипептида. Вариант предпочтительно сохраняет биологическую активность, например, связывание с той же мишенью белка или полипептида, из которого она получена.

Таким образом, вариант мутеина липокалина, содержащий аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 1, в соответствии с настоящим изобретением, имеет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO: 1, и сохраняет способность связываться с рецептором IL-4 альфа, в частности с IL-4R α человека, или его фрагментом. Предпочтительно вариант мутеина липокалина способен ингибировать связывание IL-4 с IL-4R α .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант мутеина липокалина, содержащий аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 1, в соответствии с настоящим изобретением, имеет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 72%, по меньшей мере около 74%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина слезы человека, представленной как SEQ ID NO: 3, и сохраняет способность связываться с рецептором IL-4 альфа, в частности с IL-4R α человека, или его фрагментом. Предпочтительно вариант мутеина липокалина способен ингибировать связывание IL-4 с IL-4R α .

В данном контексте термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» обозначает свойство последовательностей, которое измеряет их сходство или взаимосвязь. Термин «идентичность последовательностей» или «идентичность», в данном контексте, означает процент попарно идентичных остатков - после (гомологичного) выравнивания последовательности белка или полипептида по данному описанию с рассматриваемой последовательностью - в отношении к количеству остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей измеряется путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество остатков и умножения произведения на 100.

Квалифицированному специалисту известны доступные компьютерные программы, например, BLAST (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 1997), BLAST2 (Altschul et al., J Mol Biol, 1990), FASTA (которая использует метод Пирсона и Липмана (1988)), программа TBLASTN, описанная Altschul et al. (1990) выше, GAP (Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, Сан-Диего, США) и Smith-Waterman (Smith and Waterman, J Mol Biol, 1981), для определения идентичности последовательностей с применением стандартных параметров. Процент идентичности последовательностей может быть определен в настоящем изобретении, например, с помощью программы BLASTP, версия 2.2.5, от 16 ноября 2002 г. (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 1997). В этом варианте осуществления настоящего изобретения процент гомологии основан на выравнивании всех последовательностей белка или полипептида (матрица: BLOSUM 62; штрафы за гэпы: 11.1; значение отсечения установлено на 10^{-3}), включая полипептидные последовательности, предпочтительно с применением белкового каркаса дикого типа в качестве эталона при парном сравнении. Он рассчитывается как процентное отношение числа «положительных результатов» (гомологических аминокислот), указанных как результат в выходных данных программы BLASTP, деленный на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания. Идентичность последовательности обычно определяется со ссылкой на алгоритм GAP (пакет Wisconsin GCG, Accelrys Inc, Сан-Диего, США). GAP использует алгоритм Нидлмана и Вунша для выравнивания двух полных последовательностей, максимизируя количество совпадений и минимизируя количество гэпов, которые представляют собой пробелы в выравнивании, являющиеся результатом добавления или делеции аминокислот. Обычно используются параметры по умолчанию, со штрафом за создание гэпа, равным 12, и штрафом за расширение промежутка, равным 4.

В частности, чтобы определить, отличается ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности липокалина (мутеина) от мутеина липокалина, имеющего аминокислотную последовательность, продемонстрированную как SEQ ID NO: 1, квалифицированный специалист может надлежащим образом использовать средства и способы, хорошо известные в данной области техники, например, выравнивания вручную или с помощью компьютерных программ, таких как BLAST 2.0, что расшифровывается как Basic Local Alignment Search Tool (Средство поиска основного локального выравнивания), или ClustalW, или любой другой пригодной программой, которая является пригодной для генерации выравнивания последовательностей. Соответственно, SEQ ID NO: 1 может быть «эталонной последовательностью», тогда как аминокислотная последовательность липокалина, отличная от мутеина липокалина, имеющая аминокислотную последовательность, продемонстрированную как SEQ ID NO: 1, описанную в данном документе, является «запрашиваемой последовательностью».

Термин «фрагмент», применяемый в данном документе в связи с мутеинами липокалина по настоящему описанию, относится к белкам или пептидам, полученным из мутеина липокалина, содержащим аминокислотную последовательность, указанную в

SEQ ID NO: 1, которые укорочены на N-конце и/или на C-конце, т.е. лишены по меньшей мере одной из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. В таком фрагменте может отсутствовать до 1, до 2, до 3, до 4, до 5, до 10, до 15, до 20, до 25 или до 30 (включая все числа между ними) N-концевых и/или C-концевых аминокислот. В качестве иллюстративного примера такой фрагмент может не иметь одной, двух, трех или четырех N-концевых и/или одной или двух C-концевых аминокислот. Следует понимать, что фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент полноразмерного липокалина (мутеина), что означает, что он предпочтительно содержит связывающий карман полноразмерного липокалина (мутеина), из которого он получен. В качестве иллюстративного примера такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере аминокислоты в положениях 5-158, 1-156, 5-156, 5-153, 26-153, 5-150, 9-148, 12-140, 20-135 или 26-133, что соответствует линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека. Такие фрагменты могут включать по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, обычно обнаруживаемых в иммуноанализе мутеина липокалина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Фрагмент может иметь по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной как SEQ ID NO: 1. Предпочтительно указанный фрагмент сохраняет способность связываться с рецептором IL-4 альфа, в частности с IL-4R α человека, или с его фрагментом. Предпочтительно фрагмент мутеина липокалина способен ингибировать связывание IL-4 с IL-4R α .

«Фрагмент» по отношению к соответствующему целевому IL-4R α настоящего описания (который описан в UniProt P24394 и продемонстрирован как SEQ ID NO: 4, и не включает сигнальный пептид из 25 остатков) относится к N-концу и/или усеченный на C-конце IL-4R α или белковые домены IL-4R α . Фрагменты IL-4R α , как описано в настоящем документе, сохраняют способность полноразмерного IL-4R α распознаваться и/или связываться мутеином липокалина по настоящему изобретению. В качестве иллюстративного примера фрагмент может быть внеклеточным доменом IL-4R α , таким как внеклеточный домен, содержащий аминокислотные остатки 26-232 UniProt P24394, который продемонстрирован как SEQ ID NO: 5.

Мутеин липокалина согласно настоящему изобретению вводят человеку путем ингаляции. В данном контексте термин «введение путем ингаляции» относится к введению мутеина липокалина, обычно путем пероральной ингаляции. Мутеин

липокалина может быть в форме распыляемого жидкого аэрозоля или жидкого спрея. Мутеин липокалина можно вводить путем распыления.

Средства и устройства для ингаляционного введения мутеина липокалина известны специалисту в данной области техники. Такие средства и устройства включают небулайзеры и неаэрозольные дозирующие ингаляторы. Другие средства и устройства, пригодные для непосредственного ингаляционного введения мутеина липокалина, также известны в данной области техники.

Небулайзер представляет собой устройство для доставки лекарственных средств, применяемое для введения лекарственного средства в виде тумана, вдыхаемого в легкие. Специалистам известны различные типы небулайзеров, включая струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры и технологию с вибрирующей сеткой. Некоторые небулайзеры обеспечивают непрерывный поток распыляемого раствора, то есть они будут обеспечивать непрерывное распыление в течение длительного периода времени, независимо от того, вдыхает ли субъект от небулайзера или нет, в то время как другие устройства активируются дыханием, то есть субъект получает некоторую дозу только тогда, когда он вдыхает от такого устройства.

Неаэрозольный дозирующий ингалятор (metered-dose inhaler, MDI), также известный как ингалятор, продуцирующий мягкий туман, представляет собой устройство, которое доставляет определенное количество лекарственного средства в легкие в виде короткой струи жидкого аэрозольного препарата. Такой дозирующий ингалятор обычно состоит из трех основных компонентов; баллон, который содержит состав для введения, дозирующий клапан, который позволяет дозировать определенное количество состава при каждом нажатии, и воздействующий механизм (или мундштук), который позволяет пациенту управлять устройством и направляет жидкий аэрозоль в легкие пациента.

Мутеины липокалина для применения в настоящем изобретении обычно вводят в форме фармацевтической композиции, которая может содержать по меньшей мере один компонент в дополнение к представителю специфического связывания. Таким образом, фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут содержать, помимо активного ингредиента, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Например, мутеин липокалина для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть приготовлен в водном растворе фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline, PBS).

Фармацевтическую композицию, содержащая мутеин липокалина, можно вводить отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно.

В способе лечения астмы, описанном в данном документе, доставляемая доза указанного мутеина липокалина составляет от около 0,1 мг до около 160 мг. Термин

«доставляемая доза» относится к дозе мутеина липокалина, которая доставляется субъекту, то есть доза, которая выходит из ингаляционного устройства при применении этого устройства. Например, небулайзеры иногда намеренно переполняют, так как окончательный общий объем не будет распылен. Для небулайзера, доставляемая доза обычно составляет менее 50% от номинальной дозы, которая представляет собой дозу мутеина липокалина, загруженную в устройство. Номинальная доза также известна как отмеренная доза. Специалист может легко определить доставляемую дозу, определив количество мутеина липокалина, которое выходит из ингаляционного устройства. Например, способы, применяемые для экспериментального измерения «доставляемой дозы», представлены в разделе 2.9.44 Европейской фармакопеи 9.0.

Номинальные (или отмеренные) дозы 0,25 мг, 1,25 мг, 5 мг, 20 мг, 60 мг, 180 мг и 400 мг, загруженные в небулайзер в описанном в данном документе исследовании SAD (Пример 2), коррелируют с доставляемыми дозами 0,1 мг, 0,5 мг, 2,0 мг, 8,0 мг, 24 мг, 72 мг и 160 мг соответственно.

Номинальные (или отмеренные) дозы 0,5 мг, 5 мг, 15 мг, 50 мг и 150 мг, загруженные в небулайзер и вводимые два раза в день в исследовании MAD (Пример 3 и Пример 4), описанном в данном документе, коррелируют с доставляемыми дозами 0,2 мг, 2,0 мг, 6,0 мг, 20 мг и 60 мг соответственно два раза в день. Номинальная или отмеренная доза 1,5 мг соответствует доставляемой дозе 0,6 мг.

Результаты исследования SAD (Пример 2), представленные в настоящем документе, демонстрируют, что системное воздействие возникает при доставляемой дозе, составляющей по меньшей мере около 8 мг мутеина липокалина, тогда как при доставляемых дозах ниже около 2 мг не наблюдается обнаруживаемого системного воздействия.

Результаты когорт 1-3 в исследовании MAD (Пример 3), представленные в настоящем документе, демонстрируют, что системное воздействие возникает при доставляемой дозе, составляющей по меньшей мере около 6 мг мутеина липокалина, тогда как при доставляемых дозах около 2 мг или ниже около 2 мг системного воздействия не наблюдается.

Результаты когорт 1-5 в исследовании MAD (Пример 4), представленные в настоящем документе, демонстрируют, что системное воздействие возникает при доставляемой дозе, составляющей по меньшей мере около 6 мг мутеина липокалина, тогда как при доставляемых дозах около 2 мг или ниже около 2 мг системного воздействия не наблюдается.

В данном контексте термин «системное воздействие» означает, что значительная часть вдыхаемого мутеина липокалина попадает в систему кровообращения и, необязательно, что мутеин липокалина может воздействовать на весь организм. Системное воздействие может означать, что количество мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, поддается количественной оценке. Системное воздействие может быть приравнено к концентрации мутеина липокалина, попадающей в

кровоток, которая поддается количественной оценке. Это воздействие может быть представлено концентрацией мутеина липокалина в крови (сыворотке, плазме или цельной крови), которую можно измерить с течением времени и зарегистрировать с помощью ряда параметров, включая площадь под кривой (AUC). Системное воздействие мутеина липокалина также может влиять на биомаркеры, уровни которых могут напрямую коррелировать с концентрацией мутеина липокалина и, следовательно, с системным воздействием. Термин «поддающийся количественной оценке» или «поддающийся обнаружению», когда он применяется в связи с системным воздействием, относится к воздействию, представленному концентрацией мутеина липокалина в крови (сыворотке, плазме или цельной крови) или уровнями биомаркеров, измеряемых с помощью одного или большего количества аналитических методов, известных в данной области техники. Такие аналитические методы включают, помимо прочего ИФА, конкурентный ИФА, флуоресцентное титрование, калориметрические методы, масс-спектрометрию (МС) и методы хроматографии, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Также понятно, что измерения, выполняемые с помощью таких аналитических методов, ассоциированы с пределами обнаружения, такими как предел обнаружения прибора, пределы обнаружения метода и предел количественного определения.

Результаты когорт 1-3 в исследовании MAD (Пример 3), представленные в данном документе, демонстрируют, что доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия в легких без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без обнаруживаемого системного воздействия.

Результаты когорт 1-4 в исследовании MAD (Пример 4), представленные в данном документе, демонстрируют, что доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия в легких без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без обнаруживаемого системного воздействия.

Результаты когорт 1-5 в исследовании MAD (Пример 4), представленные в данном документе, демонстрируют, что доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг, но более чем 0,2 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия на легкие без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без обнаруживаемого системного воздействия. Доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента, составляющая около 2 мг или менее чем около 2 мг, но около 0,6 мг или более чем около 0,6 мг, может привести к снижению содержания FeNO в результате местного воздействия в легких без существенной части вдыхаемого мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения, или без

обнаруживаемого системного воздействия.

В данном контексте термин «местное воздействие» означает, что уровни вдыхаемого мутеина липокалина, присутствующего в легких, достаточны для взаимодействия с мишенью в легких. Это может происходить без обнаруживаемого связывания с мишенью в крови или без измеримых концентраций мутеина липокалина в крови или сыворотке. По мере увеличения уровней ингаляционной дозы уровень связывания с мишенью в легких может повышаться, и это также может быть ассоциировано с существенным ингибированием связывания с мишенью в крови и измеримыми концентрациями мутеина липокалина в крови или сыворотке. Термин «местное воздействие в легких» относится к концентрации в легких вдыхаемого мутеина липокалина, которая отвечает за его связывание с мишенью в легких. Снижение фракционной концентрации оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) можно учитывать для определения того, достигается ли достаточное «местное воздействие». В некоторых других случаях, в частности, если субъект является человеком, поскольку прямое измерение количества мутеина липокалина, остающегося в легких, затруднительно, определение «местного воздействия» или «местного воздействия в легких» может быть выполнено косвенно путем определения количества мутеина липокалина, попадающего в систему кровообращения.

Фосфорилирование STAT6 в популяции CD3+ Т-клеток можно использовать в качестве маркера системного воздействия мутеина липокалина. Офосфорилирования STAT6 (pSTAT6) можно выполнять с помощью любого пригодного способа, известного специалисту в данной области техники. Например, после введения субъекту мутеина липокалина, у указанного субъекта может быть собрана цельная кровь, стимулированная IL-4 и pSTAT6 в субпопуляции CD3+ Т-клеток, оцениваемой с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), как описано в разделе Примеры. Ингибирование IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках после введения субъекту мутеина липокалина указывает на системное воздействие мутеина липокалина. Процент ингибирования IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках мутеином липокалина можно, например, определить относительно контрольного субъекта, которому не вводили какой-либо мутеин липокалина. Это может быть тот же субъект (при оценке IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках до введения мутеина липокалина) или другой субъект, которому не вводили какой-либо мутеин липокалина.

Ингибирование IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках можно оценить путем определения значения IC₅₀, которое представляет собой половину максимальной ингибирующей концентрации мутеина липокалина; то есть концентрация мутеина липокалина, измеренная в плазме, необходимая для ингибирования IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в 50% CD3+ Т-клеток. Значение IC₅₀ мутеина липокалина может быть определена путем построения кривой «доза-ответ» и изучение влияния различных концентраций мутеина липокалина на обратное IL-4-

стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+ Т-клетках. Значения IC₅₀ могут быть рассчитаны путем определения концентрации мутеина липокалина, необходимой для ингибирования фосфорилирования STAT6 в половине CD3+ Т-клеток после стимуляции IL-4. Необнаруживаемое IL-4-стимулированное фосфорилирование STAT6 в CD3+ Т-клетках или отсутствие значительного его ингибирования может означать, что существенная часть вдыхаемого мутеина липокалина не попадает в систему кровообращения или не обнаруживается его системное воздействие.

Концентрация фракционного оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) может использоваться в качестве маркера для определения эффективности мутеина липокалина при лечении астмы. Специалист в данной области техники легко сможет измерить FeNO, используя известные методы, например, тест FeNO, который проводится самими пациентами, медленно и равномерно выдыхающими через мундштук, прикрепленный к ручному монитору. Показания отображаются на мониторе, а результат теста FeNO демонстрирует, насколько воспалены дыхательные пути. Часто используемый тест FeNO представляет собой тест Американского торакального общества (ATS) от 2005 года.

Процентное снижение FeNO мутеином липокалина можно, например, определить относительно контрольного субъекта, которому не вводили какой-либо мутеин липокалина. Контрольный субъект может быть тем же субъектом (при этом FeNO оценивается до введения мутеина липокалина) или другим субъектом, которому не вводили какой-либо мутеин липокалина. Этому другому субъекту могли вводить плацебо.

Во всем данном описании, включая прилагаемую формулу изобретения, если контекст не требует иного, под термином «содержать» и «включать», а также под вариантами, такими как «содержит», «содержащий» и «включающий» следует понимать включение указанного целого числа, или этапа, или группы целых чисел, или этапов, но не исключение любого другого целого числа, этапа или группы целых чисел или этапов.

Следует отметить, что, как они используются в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, ссылка на «мутеин липокалина» включает один или большее количество мутеинов липокалина.

Термин «и/или» везде, где он используется, включает в себя значение «и», «или» и «все или любую другую комбинацию элементов, связанных указанным термином».

В контексте данного документа термин «около» или «приблизительно» означает значение в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Однако термин также включает конкретное число, например, «около 20» включает 20.

Термин «по меньшей мере около» в контексте данного документа включает конкретное число, например, «по меньшей мере около 6» включает 6.

Признаки, описанные в предшествующем описании, или в прилагаемой формуле изобретения, или в сопроводительных графических материалах, выраженные в их конкретных формах или в терминах средств для выполнения описанной функции, или

способа или процесса для получения описанных результатов, в зависимости от обстоятельств, можно, по отдельности или в любой комбинации таких признаков, использовать для осуществления настоящего изобретения в его различных формах.

Хотя изобретение было описано в связи с типовыми вариантами его осуществления, описанными выше, многие эквивалентные модификации и вариации будут очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с этим описанием. Соответственно, типовые варианты осуществления настоящего изобретения, изложенные выше, считаются иллюстративными, а не ограничивающими. В описанные варианты осуществления могут быть внесены различные изменения, не выходящие за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

Во избежание каких-либо сомнений любые теоретические объяснения, представленные в данном документе, предназначены для улучшения понимания читателем. Авторы не хотят быть связанными ни одним из этих теоретических объяснений.

Любые заголовки разделов, используемые в данном описании, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет изучения.

Примеры

Пример 1. Анализ цельной крови человека *in vitro* как оценка иммунного ответа человека на PRS-060/AZD1402

С целью характеристики влияния PRS-060/AZD1402 на передачу сигналов IL-4R α , цельную кровь человека здоровых субъектов стимулировали IL-4 в присутствии или в отсутствие PRS-060/AZD1402 и количественно определяли фосфорилирование компонентов сигналинга и высвобожденных растворимых биомаркеров.

Цельную кровь человека брали у здоровых добровольцев и собирали в стерильную пробирку, содержащую гепарин. Цельную кровь, обработанную гепарином, стимулировали 8 нг/мл IL-4 в течение 15 минут с увеличивающимися концентрациями PRS-060/AZD1402 или эталонного антитела IL4-R α , а затем оценивали фосфорилированный STAT6 (pSTAT6) в субпопуляции CD3⁺ Т-клеток с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (fluorescence-activated cell sorting, FACS).

Кроме того, цельную кровь, обработанную гепарином, стимулировали 8 нг/мл IL-4 в течение 24 часов с увеличивающимися концентрациями PRS-060/AZD1402 или эталонного антитела к IL4-R α с последующими измерениями эотаксина-3, хемокина, регулируемого тимусом и активацией (thymus- and activation-regulated chemokine, TARC), и хемокина, полученного из макрофагов (macrophage-derived chemokine, MDC), с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Результаты репрезентативных экспериментов изображены на Фигуре 1, а соответствующие значения IC₅₀ для PRS-060/AZD1402, а также эталонное ингибирование pSTAT6 антителом IL4-R α и высвобождение растворимых цитокинов суммированы в Таблице 1. Стимуляция цельной крови человека посредством IL-4 приводила к

увеличению уровней pSTAT6 и высвобождению эотаксина-3, TARC и MDC. PRS-060/AZD1402 ингибирует pSTAT6 зависимым от концентрации образом и с той же эффективностью, что и эталонное антитело к IL-4R α . Также наблюдалось ингибирование высвобождения растворимых цитокинов эотаксин-3, TARC и MDC под действием PRS-060/AZD1402, с эффективностью, эквивалентной эталонному антителу к IL-4R α .

Полученные данные дают основания предполагать, что PRS-060/AZD1402 способен ингибировать передачу сигналов IL-4R α в цельной крови человека и имеет значения IC₅₀, сравнимые со значениями эталонного антитела к IL4R α . Кроме того, наблюдаемый низкий уровень вариабельности делает этот метод пригодным для обнаружения наличия системных уровней PRS-060/AZD1402 после ингаляционного введения. Например, данные ответов pSTAT6, а также последующее высвобождение цитокинов в цельной крови можно использовать в клинических испытаниях для оценки системного воздействия.

Таблица 1. Ингибирование pSTAT6 и высвобождение растворимых цитокинов

	pSTAT IC₅₀ (нМ)	Эотаксин-3 IC₅₀ (нМ)	TARC IC₅₀ (нМ)	MDC IC₅₀ (нМ)
PRS-060/AZD1402	1,3	2,1	1,3	2,0
Эталонное антитело к IL-4R α	0,8	1,5	0,8	1,1

Связывание IL-4 с его рецептором (IL-4R) приводит к тирозин-фосфорилированию киназы Janus (Jak) 3-1 и Jak-3, что дополнительно приводит к тирозин-фосфорилированию цепи IL-4R α . После связывания с сайтом стыковки фосфотирозина на IL-4R через домен Src гомологии 2, Stat6 фосфорилируется киназами Jak. Фосфорилированный STAT6 (pSTAT6), высвобождаемый из IL-4R, образует гомодимер и перемещается в ядро, где он связывается с определенной последовательностью ДНК и запускает транскрипцию своих генов-мишеней (Nelms et al., Annu Rev Immunol, 1999, 17:701-738). Процент ингибирования pSTAT6 можно использовать как непосредственный показатель, отражающий ингибирование IL-4R α после добавления/введения PRS-060/AZD1402.

Транслокация pSTAT6 в ядро регулирует ряд генов на уровне транскрипции, которые ассоциированы с иммунитетом 2 типа (Chen et al., 2003. J Immunol, 171:3627-3635). Индукция TARC/CCL17, MCD/CCL22 и эотаксина-3/CCL26 на уровне транскрипции была продемонстрирована после стимуляции IL-4 (см., например, публикации Wirnsberger et al., Eur J Immunol., 2006, 36(7):1882-1891, Rahal et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 100(4): 1034-1043 и Hoesck and Woisetsschläger, J Immunol, 2001, 167(6):3216-3222). Кроме того, стимуляция цельной крови здоровых доноров IL-4 в течение 24 часов приводила к сильной индукции и высвобождению цитокинов TARC/CCL17, MCD/CCL22 и эотаксина-3/CCL26, которые могут ингибироваться

посредством IL-4R α . После этого эти цитокины можно легко обнаружить в бесклеточной части крови.

Пример 2. Простое слепое исследование с эскалацией дозы для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики однократной дозы препарата PRS-060/AZD1402, вводимого путем пероральной ингаляции или внутривенной инфузии здоровым субъектам

А. Цели и обзор исследования

В этом примере описывается рандомизированное плацебо-контролируемое разовое заслепленное исследование с эскалацией однократной дозы, проведенное с пероральным ингаляционным или внутривенным (в/в) введением участвующим субъектам однократной дозы либо PRS-060/AZD1402, либо плацебо. Основная цель исследования заключалась в оценке безопасности и переносимости однократных ингаляционных и однократных внутривенных доз PRS-060/AZD1402 у здоровых субъектов мужского и женского пола. Вторичная цель исследования заключалась в оценке фармакокинетики PRS-060/AZD1402 после однократных ингаляционных и однократных внутривенных доз PRS-060/AZD1402 у здоровых субъектов мужского и женского пола. Поисковые цели этого исследования включали изучение влияния PRS-060/AZD1402 на фармакодинамические биомаркеры, такие как ингибирование активации цельной крови посредством путей IL-4/IL-13 *ex-vivo*.

Вовлеченные субъекты были случайным образом распределены на дозовые когорты. Каждая когорта включала в общей сложности 8 субъектов, в т.ч. 6 субъектов, получающих PRS-060/AZD1402, и 2 субъекта, получающих плацебо. 2 сентинельных субъекта на когорту были рандомизированы 1:1 на получение препарата PRS-060/AZD1402 и плацебо, которые вводили этим субъектам по меньшей мере на 24 часа раньше от остальных субъектов в когорте. Остальные субъекты на когорту (рандомизированные 5:1 на получение препарата PRS-060/AZD1402 или плацебо) получали исследуемое лекарственное средство с интервалом не более 40 минут.

Субъекты, включенные в первую когорту, получали самую низкую дозу PRS-060/AZD1402 (номинальная или отмеренная доза 0,25 мг; эквивалент доставляемой дозы 0,1 мг). Фактические дозы для каждой когорты были определены после анализа предопределенных пределов воздействия, установленных в результате доклинических токсикологических исследований. Фактические дозы для когорт с пероральной ингаляцией сведены в Таблице 2. Для введения использовали небулайзер InnoSpire Go (Philips). PRS-060/AZD1402 составляли с целевой концентрацией белка 10 мг/мл или 50 мг/мл в водном растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) (1,06 мМ КН₂РO₄, 2,96 мМ Na₂НРO₄, 154 мМ NaCl, pH 7,4) и обеспечивали минимальным извлекаемым объемом 5,2 мл.

Таблица 2 Дозы для пероральной ингаляции PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо

Когорта	Номинальные дозы (доставляемые дозы) PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо (мг)
1	0,25 (0,10)
2	1,25 (0,50)
3	5,00 (2,00)
4	20,0 (8,00)
5	60 (24,0)
6	180 (72,0)
7	400 (160)

После оценки безопасности всех когорт субъектов, получавших пероральные ингаляционные дозы (когорты с 1 по 7), еще 2 когорты субъектов (которые не состояли в когортах ингаляционных доз) были допущены к внутривенному введению. PRS-060/AZD1402 с концентрацией 10 мг/мл разводили в PBS для введения путем инфузии с помощью шприцевого насоса. Дополнительные 2 когорты приведены в Таблице 3.

Таблица 3 Дозы для внутривенного введения PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо

Когорта	Дозы для внутривенного введения PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо (мг)
8	1,0
9	2,0

Субъектов включали в исследование на основании следующих критериев: (1) здоровые мужчины и женщины, не способные к деторождению (в постменопаузе или хирургически стерилизованные), в возрасте от 18 до 55 лет; (2) индекс массы тела (ИМТ) 18-35 кг/м²; и (3) субъекты, которые не курили или были курильщиками в прошлом, и при этом не курили в течение последних 6 месяцев (что определялось по содержанию котинина в моче < 500 нг/мл во время скринингового визита). Субъекты, которые соответствовали всем критериям включения, были дополнительно проверены на следующие критерии исключения: (1) наличие в анамнезе или клинические проявления любого клинически значимого заболевания, которое, по мнению исследователя, могло подвергнуть субъекта риску из-за участия в исследовании, повлиять на результаты исследования или повлиять на способность субъекта участвовать в исследовании; (2) анамнез злоупотребления наркотиками или алкоголем; (3) наличие в анамнезе или известная значимая инфекция, включая гепатит А, В или С, вирус иммунодефицита человека, туберкулез (т.е. положительный результат анализа высвобождения интерферона-γ, QuantiFERON TB-Gold), что могло подвергнуть субъекта риску из-за участия в исследовании; (4) любое клинически значимое заболевание, инфекция, медицинская/хирургическая процедура или травма в пределах 4 недель от Дня 1 или запланированная стационарная хирургическая операция или госпитализация в течение

периода исследования; (5) любые клинически значимые отклонения в клинической биохимии, гематологии или результатах анализа мочи, по мнению главного исследователя; (6) субъекты с анамнезом злокачественных опухолей или новообразований; (7) наличие в анамнезе рецидивирующего или продолжающегося «синдрома сухого глаза» любой причины, который мог быть хроническим или острым, что могло повлиять на интерпретацию данных безопасности, ассоциированных с потенциалом антител против лекарственных препаратов (ADA), нацеленных на PRS-060/AZD1402 (структурно связанные с липокалином слезы); (8) субъекты, получившие живую или ослабленную вакцину за 4 недели до Дня 1; (9) субъекты с анамнезом болезни, предполагающей нарушение иммунной функции; (10) анафилаксия в анамнезе после любой биологической терапии и известный анамнез аллергии или реакции на любой компонент состава исследуемого продукта; (11) неспособность надлежащим образом контактировать с исследователем (т.е. языковая проблема, плохое умственное развитие или нарушение церебральной функции); (12) участие в любом клиническом исследовании нового химического вещества в течение предыдущих 16 недель или клиническом исследовании доступного на рынке лекарственного средства в течение предыдущих 12 недель или в течение 5 периодов полураспада, в зависимости от того, какой период был дольше, до первой дозы исследуемого лекарственного средства; (13) сдача 450 мл или более крови в течение предыдущих 12 недель; (14) беременные женщины; и (15) мужчины, ведущие половую жизнь с партнершей-женщиной, способной к деторождению, не подвергавшиеся вазэктомии и не согласившиеся на применение двойных методов контрацепции со Дня 1 в течение 90 дней.

В. Процедуры исследования

Субъекты госпитализировались в центр проведения исследования во второй половине дня накануне дня 1 и оставались в центре до завершения измерений в момент времени 48 часов в День 3. Утром в День 1 субъекты получали дозу лечения: однократную ингаляционную дозу или внутривенную инфузию либо активного вещества (PRS-060/AZD1402), либо плацебо. Для субъектов, которые получали пероральные ингаляционные дозы, исследуемое лекарственное средство предоставлялось в концентрации 10 мг/мл или 50 мг/мл в PBS и вводилось с помощью небулайзера InnoSpire Go (Philips). Для субъектов, получивших внутривенную инфузию, в течение 60-минутного периода вливали объем 10 мл PRS-060/AZD1402 в PBS. Оценку безопасности и ФК проводили в заранее определенные моменты времени в течение периода исследования. Субъекты выписывались из центра проведения исследования в День 3 после того, как все оценки в исследовании были завершены, и при этом было запланировано возвращение в центр для визита последующего наблюдения для оценки безопасности, ФК и фармакодинамических оценок в День 7 (± 1 день) и День 30 (± 3 дня).

С. Критерии конечного результата и оценки

Основным критерием оценки в исследовании является безопасность/переносимость, оцениваемые по нежелательным явлениям (АЕ),

показателям жизненно важных функций, объему форсированного выдоха в 1 секунд (FEV_1), электрокардиограмме (ЭКГ) и лабораторным показателям безопасности на постоянной основе во время исследования. АЕ определялось как развитие нежелательного патологического состояния или ухудшение ранее существовавшего патологического состояния после или во время воздействия фармацевтического продукта, независимо от того, считается ли оно причинно связанным с этим продуктом или нет. Оценка жизненно важных функций включала измерение температуры тела, показателей систолического и диастолического кровяного давления (мм рт.ст.), пульса (ударов в минуту (BPM)), и частоты дыхания (дыхательных движений в минуту (BRPM)). Образцы крови и мочи собирали для лабораторных исследований, включая гематологию, биохимию сыворотки и анализ мочи. Трехкратные ЭКГ в 12 отведениях выполняли в заранее определенные моменты времени до сбора крови, если сбор крови следовало проводить в то же время.

Вторичными критериями оценки в исследовании являются ФК-параметры, в том числе: (1) максимальная концентрация в сыворотке (как при пероральном ингаляционном, так и внутривенном введении) (C_{max}), время до достижения максимальной концентрации (T_{max}), конечный период полужизни ($t_{1/2}$), площадь под кривой от момента времени «нуль» до 24 часов после введения дозы (AUC_{0-24}), площадь под кривой от момента времени «нуль» до последнего измеряемого времени отбора образцов (T_{last}) ($масса \times время \times объем-1$) (AUC_{last}), площадь под кривой от момента времени «нуль» до бесконечности ($масса \times время \times объем-1$) (AUC_{inf}), площадь под кривой от момента времени «нуль» до последней измеряемой концентрации (AUC_{last}), $C_{max}/доза$, $AUC_{0-24h}/доза$, $AUC_{0-last}/доза$, $AUC_{inf}/доза$, и (среднее время удержания) MRT; (2) объем распределения сыворотки (только внутривенное введение) в терминальной фазе (V_z), кажущийся объем распределения в устойчивом состоянии (V_{ss}), и системный клиренс (CL); (3) кажущийся объем распределения (V_z/F) и CL/F (только при пероральной ингаляции), и $F_{inhalation, total}$ и среднее время абсорбции (MAT) (оба значения получены из данных в/в ФК); и (4) моча (как при пероральной ингаляции, так и при внутривенном введении): общее количество препарата, выделяемого с мочой (A_e), $A_e(t_x-t_{x+1})$, $A_e(0-t_x)$, фракция дозы, выводимая с мочой (fe), $fe(t_x-t_{x+1})$, $fe(0-t_x)$, и почечный клиренс (CL_r).

Поисковые критерии оценки в исследовании включают оценку вкусовых характеристик и влияния PRS-060/AZD1402 на фармакодинамические биомаркеры, такие как ингибирование активации цельной крови ex-vivo и поисковые системные биомаркеры, относящиеся к путям IL-4/IL-13. Вкусовые характеристики оценивали с помощью анкеты. Плазму и сыворотку собирали и использовали для оценки потенциальных биомаркеров, ассоциированных с путем IL-4R α . Ингибирование активации цельной крови ex-vivo оценивали путем стимуляции цельной крови, взятой у субъектов, с применением IL-4 (10 нг/мл IL-4 человека в течение 15 минут) и последующего измерения фосфорилированного STAT6 (pSTAT6) в субпопуляциях CD3⁺ Т-клеток.

D. Статистические методы

Что касается основного критерия оценки, у всех субъектов, предоставивших

информированное согласие и получивших 1 дозу исследуемого препарата, отбирали образцы для проведения анализов. Данные субъектов анализировали в соответствии с полученным лечением. Безопасность оценивали на основе сообщений о АЕ, клинических лабораторных данных, показателей жизненно важных функций, спирометрии и параметров ЭКГ в 12 отведениях.

Все сводные данные по АЕ были ограничены только НЯ, возникшими в ходе лечения (treatment-emergent АЕ, ТЕАЕ), но все АЕ были включены в перечни данных. ТЕАЕ были определены как АЕ, которые начались во время или после первого введения дозы. Связанные с препаратом ТЕАЕ были определены как ТЕАЕ, которые могут иметь возможную, вероятную или определенную связь с исследуемым препаратом. Количество и процент субъектов, а также количество явлений были представлены для обобщенных данных по ТЕАЕ. В обобщенных данных по Классам по поражению органов и систем органов (system organ class, SOC) MedDRA и предпочтительному термину (preferred term, РТ) субъект учитывался один раз на уровне SOC и один раз с каждым РТ в рамках уровня SOC. Для обобщенных данных по SOC, РТ и тяжести, субъект учитывался один раз на каждом уровне тяжести, для которого явление произошло на уровне SOC, и на каждом уровне тяжести, для которого явление произошло для каждого уникального РТ в пределах этого уровня SOC. Для обобщенных данных по взаимосвязи с исследуемым препаратом, результаты обрабатывались аналогично обобщенным данным по степени тяжести.

Лабораторные данные, включая гематологические данные, биохимический анализ сыворотки и анализ мочи, получали и описательно обобщали при каждом запланированном визите в рамках протокола: Скрининг, День -1, День 1, День 2, День 3, визит последующего наблюдения для оценки безопасности (День 7 ± 1) и 30-дневный период последующего наблюдения, по когортам и лечению, в виде абсолютных значений и изменений от исходного уровня.

Получали данные спирометрии, включая FEV₁ (мл), объем форсированного выдоха за 6 секунд (FEV₆) (мл), форсированную жизненную емкость легких (FVC) (мл), пиковую скорость выдоха (PEFR) (л/мин), и соотношение FEV₁/FVC, их описательно обобщали относительно каждого запланированного момента времени протокола (скрининг; до введения дозы; 5 минут, 40 минут, 1 час, 4 часа после введения дозы), по когортам и лечению, в виде абсолютных значений и изменений от исходного уровня.

ЭКГ в 12 отведениях, включая интервал RR (мс), интервал PR (мс), интервал QT (мс), интервал QTcF (мс) и интервал QTcB (мс), получены и описательно обобщали относительно каждого запланированного момента времени протокола (скрининг; скрининг; до введения дозы, 20 минут, 30 минут, 1 час, 1,5 часа, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа после введения дозы; День 3; визит последующего наблюдения для оценки безопасности; 30-дневный период последующего наблюдения), по когортам и лечению, в виде абсолютных значений и изменений от исходного уровня. Однократную ЭКГ в 12 отведениях выполняли через 20 минут, 30 минут и 1 час после введения дозы в День 1, а оценки в трех повторностях - в другие моменты времени.

Среднее значение трех регистраций ЭКГ, выполненных до введения дозы в День 1, служило в качестве скорректированного до исходного уровня значения QT (QTc) субъекта для всех сравнений после введения дозы.

Что касается вторичного критерия оценки, данные всех субъектов, подписавших информированное согласие, которые получили 1 дозу PRS-060/AZD1402 и имели по меньшей мере 1 поддающийся оценке образец крови для анализа ФК, использовали для анализа расчетов параметров ФК, графического отображения индивидуальных данных, перечней данных параметров ФК, суммирования данных о концентрации ФК и параметрах ФК, а также всех других перечней ФК.

Е. Результаты

Результаты, полученные для всех 72 включенных в исследование субъектов, приведены ниже. Из 72 субъектов 54 были рандомизированы для получения PRS-060/AZD1402 и 18 субъектов были рандомизированы для получения плацебо. Средний возраст участников составлял 26,4 года, а средний ИМТ - 24,5 кг/м². В каждой когорте было по восемь субъектов. В каждой когорте (когорты с 1 по 9) 6 субъектов получали PRS-060/AZD1402 и 2 субъекта получали плацебо. Все 72 включенных субъекта получили 1 дозу исследуемого препарата и завершили это исследование. Ни один из субъектов преждевременно не прекратил участие в исследовании. Демографические и исходные характеристики были одинаковы для разных групп и когорт.

Все 72 включенных субъекта, которые получили 1 дозу исследуемого препарата, были включены в популяцию для изучения безопасности. Всего в популяцию для изучения ФК было включено 37 субъектов (51,4%). Из 37 субъектов 1 субъект входил в Когорту 3, а 36 субъектов входили в Когорты с 4 по 9 (по 6 субъектов в каждой когорте). Ни один из субъектов в Когорте 1 и Когорте 2 и ни один из субъектов, получавших плацебо, не был включен в популяцию для изучения ФК.

(i) Основной критерий оценки

Однократные ингаляционные дозы и однократные внутривенные дозы PRS-060/AZD1402 вводимые здоровым субъектам мужского пола, хорошо переносились и были безопасными.

Сводная информация о ТЕАЕ представлена в Таблицах 4 и 5 для всех субъектов и в Таблице 6 по когортам. Из 72 субъектов частота любого ТЕАЕ составила 34,7% (25 субъектов): 33,3% в группе плацебо (6 субъектов) и 35,2% в группе PRS-060/AZD1402 (19 субъектов). Субъекты во всех когортах PRS-060/AZD1402 испытали по меньшей мере 1 ТЕАЕ. Субъекты в Когортах плацебо 1, 3, 4 и 8 испытали по меньшей мере 1 ТЕАЕ. Из 25 субъектов, у которых наблюдались какие-либо ТЕАЕ, 10 субъектов (40,0%) сообщили об 11 явлениях, которые были оценены как возможно связанные с исследуемым препаратом, а 15 субъектов (60,0%) сообщили о 17 явлениях, не связанных с исследуемым препаратом. Один субъект, получавший плацебо в Когорте 8, испытал головную боль, которая, по оценкам, могла быть связана с исследуемым препаратом, при этом нежелательное явление у этого субъекта было определено как связанное с препаратом ТЕАЕ, но указанное

явление было легким по интенсивности и купировалось без последствий через 1 час после возникновения. Ни одно из ТЕАЕ не было серьезным и не привело к прекращению лечения. В этом исследовании летальных исходов не было. Субъекты, получавшие плацебо и субъекты, получавшие PRS-060/AZD1402, испытывали следующие ТЕАЕ: головная боль, инфекция верхних дыхательных путей и скелетно-мышечная боль в грудной клетке. Чаще всего сообщалось о головной боли у 6 субъектов (8%) и инфекции верхних дыхательных путей у 5 субъектов (7%). За исключением головной боли и инфекции верхних дыхательных путей, у субъектов, получавших AZD1402/PRS-060 и плацебо, не было общих явлений. Из 25 субъектов, у которых наблюдались какие-либо ТЕАЕ, 20 субъектов (80,0%) сообщили о легких ТЕАЕ, а 5 субъектов (20,0%) сообщили об умеренных ТЕАЕ. Ни один из субъектов не сообщил о серьезных ТЕАЕ.

Таблица 4 Общая частота нежелательных явлений, возникших в ходе лечения, для всех субъектов (популяция для изучения безопасности)

	Плацебо N=18 n (%) m	PRS-060/AZD1402 N=54 n (%) m	Всего N=72 n (%) m
ТЕАЕ	6 (33,3) 8	19 (35,2) 20	25 (34,7) 28
Серьезные ТЕАЕ	0	0	0
ТЕАЕ, связанные с препаратом	1 (5,6) 1	9 (16,7) 10	10 (13,9) 11
ТЕАЕ, приводящие к прекращению участия в исследовании	0	0	0

Таблица 5. Частота возникновения ТЕАЕ у всех субъектов (популяция для изучения безопасности).

Класс по поражению органов и систем органов Предпочтительный термин	Плацебо (n=18) n (%) m	AZD1402/PRS-060 (n=54) n (%) m	Всего (n=72) n (%) m
Субъекты с ТЕАЕ	6 (33) 8	19 (35) 20	25 (35) 28
Нарушения со стороны нервной системы	1 (6) 1	5 (9) 6	6 (8) 7
Головная боль	1 (6) 1	5 (9) 5	6 (8) 6
Сонливость	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Инфекционные и паразитарные заболевания	2 (11) 2	5 (9) 5	7 (10) 7
ОРВИ	2 (11) 2	3 (6) 3	5 (7) 5
Инфекция дыхательных путей	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Тонзиллит	0	1 (2) 1	1 (1) 1

Нарушения со стороны органов дыхания, грудной клетки и средостения	2 (11) 2	3 (6) 3	5 (7) 5
Сухость в горле	0	2 (4) 2	2 (3) 2
Плевритическая боль в грудной клетке	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Раздражение в горле	2 (11) 2	0	2 (3) 2
Общие расстройства и нарушения в месте введения	1 (6) 1	2 (4) 2	3 (4) 3
Усталость	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Гриппоподобное заболевание	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Дерматит в месте введения	1 (6) 1	0	1 (1) 1
Нарушения со стороны скелетно-мышечной и соединительной ткани	1 (6) 1	2 (4) 2	3 (4) 3
Боль в спине	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Мышечно-скелетная боль в груди	1 (6) 1	1 (2) 1	2 (3) 2
Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Тошнота	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Лабораторные и инструментальные данные	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Повышение кровяного давления	0	1 (2) 1	1 (1) 1
Травмы, отравления и осложнения процедур	1 (6) 1	0	1 (1) 1
Травма мышцы	1 (6) 1	0	1 (1) 1

Таблица 6 Частота нежелательных явлений, возникших в ходе лечения по когортам (популяция для изучения безопасности)

Когорта	Исследуемый препарат	Плацебо	PRS-060/AZD1402	Всего
		N=2	N=6	N=8
		n (%) m	n (%) m	n (%) m
Любые нежелательные явления, возникшие в ходе лечения				
1	Пероральная ингаляция	1 (50,0) 2	1 (16,7) 1	2 (25,0) 3
2		0	3 (50,0) 3	3 (37,5) 3
3		2 (100) 2	3 (50,0) 3	5 (62,5) 5
4		1 (50,0) 2	1 (16,7) 1	2 (25,0) 3
5		0	1 (16,7) 1	1 (12,5) 1
6		0	2 (33,3) 2	2 (25,0) 2
7		0	3 (50,0) 3	3 (37,5) 3

8		2 (100) 2	3 (50,0) 4	5 (62,5) 6
9	в/в инфузия	0	2 (33,3) 2	2 (25,0) 2

Нежелательные явления, возникшие в ходе лечения и связанные с препаратом

1		1 (50,0) 2	1 (16,7) 1	2 (25,0) 3
2		0	3 (50,0) 3	3 (37,5) 3
3		2 (100) 2	3 (50,0) 3	5 (62,5) 5
4	Пероральная ингаляция	1 (50,0) 2	1 (16,7) 1	2 (25,0) 3
5		0	1 (16,7) 1	1 (12,5) 1
6		0	2 (33,3) 2	2 (25,0) 2
7		0	3 (50,0) 3	3 (37,5) 3
8		2 (100) 2	3 (50,0) 4	5 (62,5) 6
9	в/в инфузия	0	2 (33,3) 2	2 (25,0) 2

Сокращения: АЕ=нежелательное явление, m=количество явлений, N=количество субъектов в группе, n=количество субъектов в указанной категории, ТЕАЕ=нежелательное явление, возникшее в ходе лечения.

Примечание: ТЕАЕ были определены как АЕ, которые начались во время или после первого введения дозы.

Примечание: Проценты были основаны на количестве субъектов в популяции изучения безопасности для каждой группы лечения.

При клинической лабораторной оценке не выявили клинически значимых отклонений или изменений по сравнению с исходным уровнем. В этом исследовании не было отмечено каких-либо индивидуальных клинически значимых отклонений. Точно так же не наблюдалось заметных изменений в показателях жизненно важных функций, каких-либо легочных механических измерениях или оценке ЭКГ. Ответы отдельных субъектов на оценку вкусовых характеристик были положительными, поскольку не было особого вкуса или запаха, связанного с исследуемым лекарственным препаратом или плацебо.

(ii) Вторичный критерий оценки

После пероральной ингаляции для Когорт с 1 по 7, ФК-профили PRS-060/AZD1402 в сыворотке для всех субъектов в Когорте 1 (доставляемая доза 0,10 мг) и Когорте 2 (доставляемая доза 0,50 мг) были ниже предела количественного определения (BLOQ) до 30 дней после введения дозы. Для когорты 3 (доставляемая доза 2,00 мг), у 1 субъекта определялись обнаруживаемые концентрации PRS-060/AZD1402 только через 4 часа после введения дозы (1,58 нг/мл) и через 5 часов после введения дозы (1,67 нг/мл), но были ниже BLOQ для всех других концентраций. Следовательно, параметры ФК не могли быть определены для первых 3 когорт этого исследования. ФК-профили PRS-060/AZD1402 зависимости от времени оценивали начиная с Когорты 4 (доставляемая доза 8,00 мг) и далее. Повышение рангового порядка концентраций PRS-060/AZD1402 в сыворотке с увеличением дозы от Когорты 4 > Когорты 5 > Когорты 6 > Когорты 7

наблюдалось в профилях средних концентраций PRS-060/AZD1402 (Фигуры 4 и 5). Соответствующие ФК-параметры сыворотки приведены в Таблице 7. Из приведенных данных можно наблюдать более чем пропорциональное увеличение ФК-параметров C_{max} и AUC с дозой. Например, увеличение дозы в 2,2 раза от Когорты 6 (доставляемая доза 72 мг) до Когорты 7 (доставляемая доза 160 мг) приводило к приблизительному увеличению C_{max} и AUC в 2,8 раза. Дозопропорциональной зависимости не наблюдалось, вероятно, из-за высокой степени межсубъектной вариабельности при наивысшей ингаляционной доставленной дозе в Когорте 7 (67,2% и 87,1% для $AUC_{inf}/\text{доза}$ и $C_{max}/\text{доза}$, соответственно). Значение T_{max} для всех когорт составляло от 2 до 8 часов. В Когортах 4 и 5, PRS-060/AZD1402 можно было обнаружить примерно через 18 часов после введения дозы, тогда как значение T_{last} было более позднее в Когортах 6 и 7. Терминальная фаза обеспечивала среднее значение (СО) $t_{1/2}$, составляющее 4,163 (1,7032) часа (Когорта 4), 4,100 (0,8974) часа (Когорта 5), 6,156 (0,7305) часа (Когорта 6) и 5,998 (0,6803) часа (Когорта 7).

Таблица 7 ФК-параметры сыворотки после пероральной ингаляции PRS-060/AZD1402 в доставляемой дозе для Когорт 4-7 (ФК-популяция)

Параметр	Когорта 4	Когорта 5	Когорта 6	Когорта 7
	8,00 мг n=6	24,0 мг n=6	72,0 мг n=6	160 мг n=6
AUC_{0-24} (ч*нг/мл)	84,65 (26,562) ^a	250,18 (112,847) ^b	1152,02 (377,432)	3187,08 (2176,968)
AUC_{0-last} (ч*нг/мл)	61,94 (37,992)	201,59 (118,163)	1234,81 (400,317)	3419,70 (2302,299)
AUC_{inf} (ч*нг/мл)	87,17 (27,753) ^a	261,50 (125,628) ^b	1252,14 (398,874)	3445,99 (2314,929)
AUC_{0-24}/D (ч*нг/мл/мг)	10,58 (3,320) ^a	10,42 (4,702) ^b	16,00 (5,242)	19,92 (13,606)
AUC_{0-last}/D (ч*нг/мл/мг)	7,74 (4,749)	8,40 (4,923)	17,15 (5,560)	21,37 (14,389)
AUC_{inf}/D (ч*нг/мл/мг)	10,90 (2,969) ^a	10,90 (5,235) ^b	17,39 (5,540)	21,54 (14,468)
C_{max} (нг/мл)	8,278 (4,8164)	21,155 (9,7602)	93,017 (33,7836)	266,833 (232,4749)
C_{max}/D (нг/мл/мг)	1,035 (0,6020)	0,881 (0,4067)	1,292 (0,4692)	1,668 (1,4530)
MRT_{inf} (ч)	7,76 (2,848) ^a	8,90 (2,107) ^b	10,86 (1,616)	11,49 (1,304)
T_{max} (ч) (min, max)	4,592 (2,10, 5,12)	4,667 (4,12, 8,18)	4,583 (1,65, 8,08)	8,225 (1,73, 8,27)

$t_{1/2}$ (ч)	4,163 (1,7032) ^a	4,100 (0,8974) ^b	6,156 (0,7305)	5,998 (0,6803)
CL/F (л/ч)	95,314 (25,9729) ^a	104,141 (32,9355) ^b	64,293 (26,1382)	64,573 (35,5707)
V_z/F (л)	504,392 (390,2042)	509,505 (248,1413)	547,153 (259,6759)	538,533 (253,7528)

Сокращения: D=доза, ч=час, min=минимум, max=максимум, MRT=среднее время удержания, ФК=фармакокинетика.

^a n=2

^b n=5

Примечание. Значения, указанные для T_{max} , являются медианами (мин, макс).

После внутривенного введения Когортам 8 и 9 среднее (СО) значение PRS-060/AZD1402 в сыворотке указывало на фазу быстрого выведения со значением $t_{1/2}$ примерно вдвое меньшим, чем при ингаляционных дозах в Когортах 4-7 (Фигуры 6 и 7 и Таблица 8). При двукратном увеличении внутривенной дозы (с 1 мг до 2 мг) между Когортами 8 и 9 средние значения $t_{1/2}$, MRT_{inf} , V_z , V_{ss} , и CL были одинаковыми, в то время как средние значения C_{max} , AUC_{last} и AUC_{0-24} увеличились примерно в 2 раза (Таблица 8). Из субъектов, которым вводили дозу, в то время как уровни PRS-060/AZD1402 были BLOQ на День 7 и 30 после введения дозы в Когорте 8, в Когорте 9 у 1 субъекта отмечались уровни PRS-060/AZD1402 до 30 дней после введения дозы Этот субъект был включен в Фигуры 6 и 7, но считался статистическим выбросом для определения параметров ФК в терминальной фазе ($t_{1/2}$, AUC_{inf} , CL/F и V_z/F) и не был включен в Таблицу 8. Кроме того, уровень 2,23 нг/мл перед введением дозы в День 1 наблюдался у того же субъекта из Когорты 9, что может отражать влияние на количественное определение липокалина слезы человека, присутствующего в сыворотке. Однако не ожидалось, что этот уровень повлияет на ФК, поскольку он составляет 1,2% от C_{max} .

Таблица 8. Параметры РК в сыворотке после внутривенного введения для Когорт 8 и 9 (популяция для изучения ФК)

Параметр	Когорта 8	Когорта 9
	1,0 мг n=6	2,0 мг n=5
AUC_{0-24} (ч*нг/мл)	187,14 (32,385)	316,47 (23,993)
AUC_{0-last} (ч*нг/мл)	180,27 (32,236)	303,50 (22,321)
AUC_{inf} (ч*нг/мл)	187,28 (32,497)	311,60 (23,099)
AUC_{0-24}/D (ч*нг/мл/мг)	187,14 (32,385)	158,24 (11,997)
AUC_{0-last}/D (ч*нг/мл/мг)	180,27 (32,236)	151,75 (11,161)
AUC_{inf}/D (ч*нг/мл/мг)	187,28 (32,497)	155,80 (11,549)
C_{max} (нг/мл)	123,333 (13,0639)	201,500 (9,0277)

C_{\max}/D (нг/мл/мг)	123,333 (13,0639)	100,750 (4,5139)
MRT_{inf} (ч)	1,42 (0,247)	1,50 (0,120)
T_{\max} (ч) (min, max)	0,983 (0,97, 1,08)	0,967 (0,97, 1,00)
$t_{1/2}$ (ч)	2,227 (0,7503)	2,307 (0,1121)
CL (л/ч)	5,478 (0,9626)	6,446 (0,4580)
V_{ss} (л)	7,637 (0,6943)	9,661 (0,6971)
V_z (л)	17,032 (3,9625)	21,496 (2,4394)

Сокращения: D=доза, ч=час, min=минимум, max=максимум, ФК=фармакокинетика.

Примечание. Значения, указанные для T_{\max} , являются медианами (min, max).

Поскольку время абсорбции было обозначено более длительным $t_{1/2}$ после пероральной ингаляции однократной дозы, чем после внутривенной инфузии, среднее время абсорбции (mean absorption time, MAT) определяли на основе среднего объединенного MRT_{inf} у 11 субъектов из обеих когорт: Когорты 8 при инфузии 1 мг (6 субъектов) и Когорты 9 при инфузии 2 мг (5 субъектов) (Таблица 9). Среднее (СО) значение MRT_{inf} для обеих когорт с внутривенным введением составляло 1,45 (0,202) часа и составляло от 7,76 до 11,49 часов после ингаляции дозы PRS-060/AZD1402. Следовательно, значение MAT находилось в диапазоне от 7,45 до 10,04 часа при анализе когорт с более высокими дозами и наиболее полными данными (где n=5 или 6).

Кроме того, абсолютная биодоступность ингаляционных доз определялась путем сравнения среднего значения AUC_{inf} после ингаляции для Когорт 4-7 со средним значением AUC_{inf} для Когорты 9 с внутривенным введением (2 мг) в диапазоне приблизительно от 6,99% до 13,8% (Таблица 10).

Таблица 9 . Определение среднего времени абсорбции

Доставляем ая доза (мг)	Когорта	Среднее MRT_{inf} (ингаляция) (ч)	Объединенное MRT_{inf} (в/в) (ч)	MAT**(ч)
8	4 (n=2)	7,76	1,45	6,31
24	5 (n=5)	8,90	1,45	7,45
72	6 (n=6)	10,86	1,45	9,41
160	7 (n=6)	11,49	1,45	10,04

Сокращения: ч=час, в/в=внутривенно, MAT=среднее время абсорбции, MRT=среднее время удержания.

Примечание. ** MAT= MRT_{inf} ИН- MRT_{inf} в/в

Таблица 10 . Определение биодоступности, Когорта 9

Доставляемая доза (мг)	Когорта	Среднее AUC_{inf} (ингаляция)	Среднее AUC_{inf} (в/в) (ч*нг/мл)	Биодоступность	Абсолютная биодоступность (%)
------------------------	---------	--	--	----------------	-------------------------------

		(ч*нг/мл)			
8	4 (n=2)	87,17	311,60	0,0699	6,99
24	5 (n=5)	261,50	311,60	0,0699	6,99
72	6 (n=6)	1252,14	311,60	0,1116	11,2
160	7 (n=6)	3445,99	311,60	0,1382	13,8

Сокращения: AUC_{inf} = площадь под кривой от нуля до бесконечности, ч=час, в/в=внутривенно.

Также оценивали ФК-профили PRS-060/AZD1402 в моче. Образцы мочи для ингаляционной дозы собирали через 48 часов после введения дозы. Концентрации PRS-060/AZD1402 обнаруживали у 3 субъектов в этом исследовании. Уровней PRS-060/AZD1402 в моче не наблюдали в когортах с в/в введением (Когорты 8 и 9). Сводные данные о параметрах ФК в моче представлены в Таблице 11, что указывает на очень низкую фракцию дозы, выводимой в виде неизмененного PRS-060/AZD1402 с мочой. Таким образом, элиминацию с мочой неизмененного PRS-060/AZD1402 можно рассматривать как второстепенный путь элиминации.

Результаты ADA через 30 дней после введения дозы для всех когорт были подтверждены как отрицательные.

Таблица 11 . Концентрация PRS-060/AZD1402 в моче

Когорта (доза * мг)	Субъект	Интервал сбора	Ae (нг)	Фракция дозы, выделяемая с мочой (%)
6 (72,0 мг)	002126	42-48	486	0.0007
7 (160 мг)	002130	8-12	756,82	0.0013
		12-18	1278,80	
	002144	8-12	2032,18	0,0023
	42-48	1667,93		

Сокращения: Ae=общее количество препарата, выделяемого с мочой.

(iii) Поисковый критерий оценки (ингибирование pSTAT6):

Стимуляцию цельной крови ex-vivo посредством IL-4 проводили для субъектов в Когортах 2-7, и определяли соответствующие уровни pSTAT6. Среднее значение и стандартное отклонение % клеток pSTAT6+ CD3 у субъектов в динамике отбора образцов представлены на Фигуре 2. Ингибирование pSTAT6 наблюдали в Когорте 4 (доставляемая доза 8,00 мг). Результаты субъектов в Когортах 4 и 5 (доставляемые дозы 8,00 мг и 24,0 мг, соответственно) продемонстрировали самое высокое ингибирование % клеток pSTAT6+ CD3 в период от 4 до 8 часов после ингаляционного введения. Результаты для субъектов в Когортах 6 и 7 (доставляемые дозы 72,0 мг и 160 мг, соответственно) продемонстрировали сильное и продолжительное ингибирование % клеток pSTAT6+ CD3 в период от 1 до 24 часов после введения дозы.

ФК/ФД-анализ ингибирования активации цельной крови *ex vivo* (Фигура 3) продемонстрировал дозозависимое ингибирование последующего фосфорилирования STAT6 с небольшими вариациями между субъектами после ингаляционного введения PRS-060/AZD1402. Значение IC_{50} было рассчитано как 0,35 нМ.

F. Обсуждение и выводы

Системное воздействие ингаляционного PRS-060/AZD1402 наблюдали при доставляемой дозе 8,00 мг или выше. Медленное снижение ФК в сыворотке после ингаляции указывает на элиминацию, обусловленную абсорбцией. Высокая степень вариабельности сывороточных уровней PRS-060/AZD1402 при наивысшей ингаляционной доставляемой дозе (160 мг) препятствовала определению дозопропорциональной зависимости. При двукратном увеличении внутривенной дозы (с 1 мг до 2 мг) средние значения $t_{1/2}$, MRT_{inf} , V_z , V_{ss} , и CL были одинаковыми, в то время как средние значения C_{max} , AUC_{last} и AUC_{0-24} увеличивались примерно в 2 раза.

Белок с молекулярной массой (17 кДа) PRS-060/AZD1402 может выводиться почками и иметь низкое распределение в тканях. Значение V_{ss} , составляющее около 10 л, определенное в когортах с в/в введением для изучения ФК, подтвердило низкое распределение в тканях. Параметры ФК в моче не были подтверждены, поскольку экскреции неизмененного PRS-060/AZD1402 с мочой в большинстве субъектов не наблюдали совсем, или, в остальных случаях, указанная экскреция определялась на очень низких уровнях. Это указывало на то, что экскреция с мочой была второстепенным путем элиминации по меньшей мере для неизмененного PRS-060/AZD1402.

Ингибирование pSTAT6 в CD3+ клетках, присутствующих в крови, коррелировало с системным воздействием и наблюдалось, начиная с введенной дозы 8,00 мг и выше. Вариабельность процентного содержания клеток pSTAT6+ CD3 у субъектов для каждой когорты была обусловлена вариацией системного воздействия PRS-060/AZD1402. Эти результаты демонстрируют, что ингаляционное введение PRS-060/AZD1402 не влияет на стабильность и активность молекулы, которая достигает большого круга кровообращения и может сильно ингибировать последующий сигналинг IL-4R α .

Каких-либо положительных результатов ADA, указывающих на потенциальный риск при применении PRS-060/AZD1402 не было зарегистрировано ни у одного из субъектов из всех когорт с пероральными ингаляциями и внутривенными введениями. Кроме того, ни у одного из субъектов не было обнаружено ADA.

В целом, в этом исследовании не наблюдалось никаких проблем с безопасностью. Частота любого TEAE составила 34,7% (25 субъектов): 33,3% в группе плацебо (6 субъектов) и 35,2% в группе PRS-060/AZD1402 (19 субъектов). Частота, наблюдаемая у субъектов, получавших PRS-060/AZD1402, была аналогична таковой у субъектов, получавших плацебо. Частота возникновения любых TEAE не зависела от введенной дозы. Наиболее частым TEAE была головная боль у 6 субъектов (8,3%) (7 явлений), за которой следовала инфекция верхних дыхательных путей у 5 субъектов (6,9%) (5 явлений).

Ни об одном из ТЕАЕ не сообщалось как определенно связанным, вероятно связанным или определенно не связанным с исследуемым препаратом. Частота связанных с препаратом ТЕАЕ, о которых сообщалось как о возможно связанных, составила 13,9% (10 субъектов [9 субъектов в группе PRS-060/AZD1402 и 1 субъект в группе плацебо]). Связанные с препаратом ТЕАЕ включали головную боль, сонливость, сухость в горле, плевритическую боль, тошноту, инфекцию дыхательных путей и скелетно-мышечную боль в грудной клетке.

Большинство ТЕАЕ были легкими, и при этом все явления были обратимыми. О серьезных ТЕАЕ не сообщалось. Ни одно из ТЕАЕ не было серьезным и не привело к прекращению лечения. В этом исследовании летальных исходов не было.

При клинической лабораторной оценке не выявили клинически значимых отклонений или изменений по сравнению с исходным уровнем. В этом исследовании не было отмечено каких-либо индивидуальных клинически значимых отклонений.

Не наблюдалось заметных изменений в показателях жизненно важных функций, любых измерениях легочной функции, включая соотношение FEV₁/FVC, или в оценке ЭКГ.

Ответы отдельных субъектов на оценку вкусовых характеристик указывали на отсутствие неприятного вкуса или запаха, связанного с PRS-060/AZD1402 или плацебо. Исходя из этого, повторное применение исследуемого препарата (лекарственного препарата в небулайзере) считалось возможным.

В заключение, однократные ингаляционные дозы и однократные внутривенные дозы PRS-060/AZD1402 у здоровых взрослых субъектов мужского пола были безопасными и хорошо переносились. Дозозависимое системное воздействие PRS-060/AZD1402 после ингаляции характеризовалось профилем, указывающим на элиминацию, управляемую абсорбцией, и тесно коррелировало с эффектами ФД этой молекулы. Также существовала возможность выбора доз, при которых не наблюдается системного воздействия ингаляционного PRS-060/AZD1402.

Пример 3. Простое слепое исследование с эскалацией дозы для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики многократных доз PRS-060/AZD1402, вводимых перорально у субъектов с легкой степенью астмы.

В Примере 3 представлены данные этого исследования для когорт 1-3; данные для когорт 1-5 представлены в Примере 4. Поскольку клиническое исследование еще не завершено, данные для общей клинической оценки закрыты, и окончательные данные для отчета об исследовании еще не представлены.

А. Цели и обзор исследования

В этом примере описывается плацебо-контролируемое, простое слепое, рандомизированное исследование с эскалацией дозы, проведенное с применением пероральной ингаляции многократных доз PRS-060/AZD1402 для включенных субъектов с легкой степенью астмы. Основная цель исследования заключалась в оценке безопасности и переносимости многократных ингаляционных доз PRS-060/AZD1402 у

мужчин и небеременных, не кормящих грудью женщин с легкой степенью астмы. Вторичные цели исследования заключались в оценке фармакокинетики (ФК) PRS-060/AZD1402 в сыворотке и моче после многократных ингаляционных доз PRS-060/AZD1402 у мужчин с легкой степенью астмы и у небеременных, не кормящих грудью женщин легкой степенью астмы, чтобы оценить потенциальное формирование антител к лекарственному препарату (ADA) против PRS-060/AZD1402 и оценить изменение по сравнению с исходным уровнем концентрации фракционного оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) у субъектов с легкой степенью астмы, получающих многократные ингаляционные дозы PRS-060/AZD1402 или плацебо. Поисковые цели этого исследования включали изучение влияния PRS-060/AZD1402 на фармакодинамические биомаркеры, такие как ингибирование активации цельной крови посредством путей IL-4/IL-13 ex-vivo.

53 субъекта, которые соответствовали критериям включения и исключения (см. ниже), были распределены на 5 когорт: Когорта 1 и 2 - по 8 субъектов (в каждую входили 6 субъектов, получающих активный препарат, и 2 субъекта, получающих плацебо), Когорта 3-18 субъектов (12 субъектов, получающих активный препарат, и 6 субъектов, получающих плацебо), Когорта 4-8 субъектов (6 субъектов, получающих активный препарат, и 2 субъекта, получающих плацебо) и Когорта 5-11 субъектов (9 субъектов, получающих активный препарат, и 2 субъекта, получающих плацебо). В каждой когорте было 2 сентинельных субъекта, рандомизированных 1:1 для получения активного PRS-060/AZD1402 и плацебо, за исключением Когорты 5. Остальные субъекты на когорту были рандомизированы 5:1 для Когорт 1 и 2, 11:5 для Когорты 3 и 5:1 для Когорты 4 для получения PRS-060/AZD1402 или плацебо, соответственно.

Включенные субъекты получали многократные дозы PRS-060/AZD1402 или соответствующее плацебо в форме небулизированного раствора посредством пероральной ингаляции два раза в день (каждые 12 часов в течение 9 дней) со Дня 1 по День 9 и один раз утром в День 10 для когорт от 1 до 5. Субъекты, включенные в когорту 1, получали PRS-060/AZD1402 в номинальной дозе 5,0 мг; что эквивалентно доставляемой дозе 2,0 мг, вводимой дважды в день, за исключением Дня 10, когда вводили только первую утреннюю дозу. Субъекты, включенные в Когорту 2, 3, 4 и 5, получали дозы, указанные в Таблице 12. Дозы были выбраны после обзора данных, полученных в фазе 1 исследования однократной возрастающей дозы, как описано в Примере 2, и предварительно определенных пределов воздействия, установленных с помощью доклинических токсикологических исследований. Период между завершением введения доз в предыдущей когорте и началом введения доз в следующей когорте, за исключением когорты 5, составлял минимум 7 дней. В каждой когорте сентинельные субъекты получали дозу по меньшей мере за 48 часов до остальных субъектов в когорте, за исключением когорты 5. После анализа данных сентинельных субъектов, чтобы подтвердить, что результаты были благоприятными, остальным подходящим субъектам в когорте вводили тот же уровень дозы. Остальным субъектам вводили дозу по меньшей мере за 30 минут до начала ингаляции. Все данные по безопасности и данные ФК были

проанализированы, чтобы определить, следует ли переходить к следующей когорте или задерживать, останавливать или изменять эскалацию дозы в сторону уменьшения.

Таблица 12. Дозы PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо

Когорта	Множественные номинальные дозы (доставляемые дозы) PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо (мг)
1	5 (2,0)
2	15 (6,0)
3	50 (20)
4	150 (60)
5	0,5 (0,2)

Субъектов включали в исследование на основании следующих критериев: (1) индекс массы тела (ИМТ) от 18 до 35; (2) некурящие или бывшие курильщики, которые курили не более двух раз за 3 месяца до скрининга (что определяли по котинину в моче < 500 нг/мл во время скринингового визита); (3) мужчины и небеременные, не кормящие женщины; (4) мужчины, которые ведут половую жизнь с женщинами детородного возраста и соглашаются использовать высокоэффективный метод контрацепции в течение всего периода лечения исследуемым препаратом, а также в течение дополнительных 90 дней после последней дозы исследуемого препарата. Женщины детородного возраста, ведущие половую жизнь с фертильным мужчиной, соглашаются следовать инструкциям относительно двойных методов контрацепции в течение всего периода их участия в исследовании и в течение 90 дней после приема последней дозы исследуемого препарата; (5) документально подтвержденный диагноз астмы легкой степени; (6) возраст от 18 до 55 лет; (7) функция легких $\geq 70\%$ от прогнозируемой для отношения FEV₁ и FEV₁/форсированная жизненная емкость (FVC) ≥ 0.7 ; (8) FeNO ≥ 35 ppb при скрининге и в ходе предварительной квалификации для исследования.

Кроме того, не включались субъекты, которые соответствовали любому из следующих критериев: (1) наличие в анамнезе или клинические проявления любого клинически значимого заболевания, которое, по мнению исследователя, могло подвергнуть субъекта риску из-за участия в исследовании; повлиять на результаты исследования или повлиять на способность субъекта участвовать в исследовании. Злоупотребление наркотиками или алкоголем в анамнезе; (2) наличие в анамнезе или известная значимая инфекция, включая гепатит А, В или С, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), туберкулез (т.е. положительный результат анализа высвобождения интерферона [IFN]- γ [IGRA], QuantiFERON[®] TB-Gold), что могло подвергнуть субъекта риску при участии в исследовании; (3) наличие в анамнезе рака в течение последних 10 лет (20 лет для рака молочной железы), за исключением базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи или рака шейки матки *in situ*, подвергнувшегося лечению и считающегося излеченным. Любая лимфома в анамнезе не допускалась; (4) любое клинически значимое заболевание, инфекция, медицинская/хирургическая процедура или

травма в пределах 4 недель от Дня 1 или запланированная стационарная хирургическая операция или госпитализация в течение периода исследования; (5) любые клинически значимые отклонения в клинической биохимии, гематологии или результатах анализа мочи, по мнению главного исследователя; (6) наличие в анамнезе рецидивирующего или продолжающегося «синдрома сухого глаза» любой причины, который мог быть хроническим или острым, что могло повлиять на интерпретацию данных безопасности, ассоциированных с потенциалом ADA, нацеленных на PRS-060/AZD1402 (структурно связанные с липокалином слезы); (7) субъекты, получившие живую или ослабленную вакцину за 4 недели до Дня 1; (8) субъекты с анамнезом болезни, предполагающей нарушение иммунной функции; (9) анафилаксия в анамнезе после любой биологической терапии и известный анамнез аллергии или реакции на любой компонент состава исследуемого продукта; (10) неспособность надлежащим образом контактировать с исследователем (т.е. языковая проблема, плохое умственное развитие или нарушение церебральной функции); (11) участие в любом клиническом исследовании нового химического вещества в течение предыдущих 16 недель или клиническом исследовании доступного на рынке лекарственного средства в течение предыдущих 12 недель или в течение 5 периодов полураспада, в зависимости от того, какой период был дольше, до первой дозы исследуемого лекарственного средства; (12) сдача 450 мл или более крови в течение предыдущих 12 недель; (13) женщины, которые были беременны или кормили грудью, или планировали забеременеть в период исследования или через 90 дней после последней дозы исследуемого препарата; и (14) мужчины, ведущие половую жизнь с партнершей-женщиной, способной к деторождению, не подвергавшиеся вазэктомии и не согласившиеся на применение двойных методов контрацепции со Дня 1 в течение 90 дней после приема последней дозы исследуемого препарата. Женщины детородного возраста, ведущие половую жизнь с фертильным партнером-мужчиной и не согласившиеся на использование двойных методов контрацепции, по меньшей мере, с одним барьером со Дня 1 и в течение 90 дней после последней дозы исследуемого препарата; (15) опасный для жизни астматический эпизод в прошлом; (16) применение любого из следующих лекарственных средств в течение указанного времени перед скринингом: агонисты β_2 длительного действия (не принимали за 4 недели до скрининга), терапия анти-IgE или анти-IL-5 (за 6 месяцев до скрининга), ингаляционные кортикостероиды (> 500 мкг дипропионата беклометазона (BDP) или его эквивалента в день) в течение 16 недель до скрининга, любые ингаляционные кортикостероиды при скрининге или в течение 4 недель до скрининга или при рандомизации, пероральные или инъекционные стероиды для лечения астмы или инфекции дыхательных путей в течение 5 лет до скрининга, интраназальные стероиды в течение 4 недель до скрининга, местные стероиды в течение 4 недель до скрининга антагонисты лейкотриенов в течение 2 недель до скрининга или ксантины (за исключением кофеина), холинолитики или кромогликаты в течение 1 недели до скрининга.

В. Процедуры исследования

Исследование включало предварительную оценку во время скрининга (День -21, за 21 день до введения исследуемого лекарственного средства, до Дня -2). FeNO оценивали на скрининге на соответствие критериям отбора и в День -1 (предварительный) для подтверждения соответствия критериям отбора. Субъекты с FeNO \geq 35 ppb в обоих случаях были рандомизированы в исследование для получения PRS-060/AZD1402 или плацебо. В День -1 (предварительный), за день до того, как субъекты получили первую дозу PRS-060/AZD1402 или соответствующего плацебо, они госпитализировались в больницу/исследовательский центр; субъекты выписывались через 48 часов (День 12) после введения последней дозы (День 10). Утром в День 1 вводили исследуемый препарат PRS-060/AZD1402 или плацебо с помощью небулайзера InnoSpire Go (Philips). Оценку безопасности и ФК проводили в заранее определенные моменты времени в течение периода исследования. Полный профиль ФК анализировали в Дни 1 и 10 после введения утренней дозы. Затем субъекты выписывались из клиники утром Дня 12 и возвращались на визит последующего наблюдения для оценки безопасности, оценки ФК и ФД в День 17 (\pm 1 день) и День 40 (\pm 3 дня) после того, как они получили последнюю дозу исследуемого препарата в День 10

С. Критерии конечного результата и оценки

Основным критерием оценки в исследовании является безопасность/переносимость, оцениваемые по нежелательным явлениям (АЕ), показателям жизненно важных функций, объему форсированного выдоха в 1 секунд (FEV₁), электрокардиограмме (ЭКГ) и лабораторным показателям безопасности на постоянной основе во время исследования. Субъектов наблюдали на предмет нежелательных явлений (АЕ) во время участия в исследовании (начиная с момента первого введения исследуемого препарата) и до 30 дней после введения последней дозы исследуемого препарата. За любыми продолжающимися серьезными АЕ (SAE) наблюдали до их разрешения или стабилизации. Оценка жизненно важных функций включала измерение температуры тела, показателей систолического и диастолического кровяного давления (мм рт.ст.), пульса (ударов в минуту (BPM)), и частоты дыхания (дыхательных движений в минуту (BRPM)). Образцы крови и мочи собирали для лабораторных исследований, включая гематологию, биохимию сыворотки и анализ мочи и тест на беременность. Трехкратные ЭКГ в 12 отведениях выполняли в заранее определенные моменты времени до сбора крови, если сбор крови следовало проводить в то же время.

Что касается основного критерия оценки, все субъекты, получившие 1 дозу PRS-060/AZD1402, были включены в анализ безопасности. Безопасность оценивали на основе АЕ, показателей жизненно важных функций, тестов функции легких (PFT), ЭКГ и лабораторных данных. Описывали все АЕ, данные физикального обследования, показатели жизненно важных функций, PFT и оценки ЭКГ, а также отклонения лабораторных показателей безопасности, представляющие потенциальную клиническую значимость. Данные по безопасности представлены в табличном и/или графическом формате и описательно обобщены по когортам доз и времени исходя из конкретных

условий. Данные об абсолютных значениях и изменения по сравнению с исходными данными обобщены исходя из конкретных условий.

АЕ были закодированы согласно Классам по поражению органов и систем органов из Медицинского словаря для нормативно-правовой деятельности (Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA) и предпочтительным терминам. Все АЕ были охарактеризованы как АЕ, возникшие до начала лечения и АЕ, возникшие в ходе лечения (ТЕАЕ) в соответствии с датой начала лечения до или после первого введения дозы. Таблицы с частотой АЕ у субъектов представлены для всех АЕ по максимальной степени тяжести, SAE, АЕ, оцененных как связанных с исследуемым препаратом, и АЕ, приводящих к прекращению приема исследуемого препарата.

Для оценки ЭКГ, выполняли трехкратную регистрацию ЭКГ до введения дозы и однократную регистрацию через 20, 30 и 60 минут после введения дозы и в трех повторностях для каждой последующей регистрации. Среднее значение трех регистраций ЭКГ, выполненных до введения дозы в День 1, служило в качестве скорректированного до исходного уровня значения интервала QT (QTc) субъекта для всех сравнений после введения дозы. Обобщали изменения ЭКГ и лабораторные данные.

Вторичными критериям оценки в исследовании являются параметры ФК, наличие антител к лекарственному средству (ADA) против PRS-060/AZD1402 в сыворотке и изменения уровней FeNO по сравнению с исходным уровнем. Образцы венозной крови и мочи для ФК-анализа и оценки ADA собирали в заранее определенные моменты времени. Определяли следующие параметры ФК: C_{max} , C_{ave} , T_{max} , площадь под кривой от времени "нуль" до 12 часов после введения дозы (AUC_{0-12}), AUC_{0-24} , AUC_{0-last} , AUC_{inf} , коэффициент накопления для AUC от времени "нуль" до конца периода введения дозы ($Rac AUC_{0-t}$), $Rac C_{max}$, параметр временного изменения (TCP), нормализованные по дозе параметры экспозиции ($AUC_{0-24}/доза$, $AUC_{0-last}/доза$, $AUC_{inf}/доза$), $t_{1/2}$, кажущийся клиренс для ингаляционного введения (CL/F) и объем распределения на основе терминальной фазы (V_z/F), A_e , f_e для PRS-060/AZD1402 и CL_T . A_e и f_e определяли кумулятивно ($A_e[t_x-t_{x+1}]$, $A_e[0-t_x]$, $f_e[t_x-t_{x+1}]$ и $f_e[0-t_x]$) для каждого интервала сбора мочи. Изменение уровней FeNO от исходного уровня по сравнению с плацебо оценивали как показатель фармакологической активности. Воспаление дыхательных путей оценивали с помощью стандартизированного теста на FeNO с однократным вдохом, который проводили во время скрининга и любого визита последующего наблюдения, а также 5 раз в день в течение периода введения доз (один раз перед приемом дозы и два раза после каждой дозы 2 р/д [2 раза в день]). Тест на FeNO проводили аналогичным образом во время каждого визита. Субъекты вдыхали до полной емкости легких с подключенным устройством NIOX VERO® Airway Inflammation Monitor, а затем выдыхали в течение 10 секунд со скоростью 50 мл/сек (руководствуясь визуальными и слуховыми сигналами). Полученное значение регистрировали, и процесс повторяли в общей сложности для 2 измерений (до 2-х повторений).

Поисковые критерии оценки в исследовании включали влияние PRS-060/AZD1402

на биомаркеры ФД, такие как ингибирование активации цельной крови ex-vivo и поисковые системные биомаркеры, относящиеся к путям IL-4/IL-13, а также анализ растворимых биомаркеров из образцов плазмы и сыворотки до, во время и после периода введения дозы. Для поискового анализа собирали плазму, сыворотку, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и цельную кровь. Плазму и сыворотку использовали для оценки потенциальных растворимых биомаркеров, ассоциированных с путем IL-4R α . Стимуляцию цельной крови ex-vivo применяли для оценки системного связывания с мишенью. Ингибирование активации цельной крови оценивали путем стимуляции ex-vivo цельной крови, взятой у субъектов, посредством IL-4 и последующего измерения фосфорилированного STAT6 (pSTAT6) в субпопуляциях CD3+ Т-клеток после ингаляции в заранее определенные моменты времени. ДНК применяли с целью идентифицировать генотипы, связанные с заболеванием. Анализ мРНК выполняли с целью идентифицировать пациентов с сигнатурами генов, которые были ассоциированы с путем IL-4R α и которые с наибольшей вероятностью имели пользу от вмешательства.

D. Анализ данных

(i) ФК

Что касается вторичных критериев оценки, ФК-профили PRS-060/AZD1402 в День 1 и День 10 для первых 3 когорт анализировали в ходе исследования, а ФК-популяцию использовали в анализе данных. ФК-параметры воздействия получали в соответствии со стандартными некоммерческими аналитическими процедурами. Применяемое программное обеспечение - PhoenixTM WinNonlin[®] v 8.0 (Pharsight Corporation, США). Описательная статистика ФК-параметров воздействия включала среднее арифметическое и стандартное отклонение (СО) в соответствии с Таблицей 19, и генерировали описательные средние значения концентрации в сыворотке в зависимости от времени.

(ii) Образование антител против лекарственного средства

В ходе исследования изучали иммуногенность PRS-060/AZD1402 (образование антител анти—PRS-060/AZD1402).

(iii) ФД - FeNO

FeNO был определен как маркер ФД для PRS-060/AZD1402. Приведены доступные данные ФД для любых субъектов, исключенных из анализа ФД, и при этом только субъекты в наборе анализа ФД были включены в описательные сводные таблицы и графические материалы со сводными/средними значениями. Инференциальную статистическую обработку выполняли на наборе анализа ФД для оценки изменения FeNO по сравнению с исходным уровнем для всех дозовых групп индивидуально и для дозовых групп PRS-060/AZD1402 по сравнению с плацебо. FeNO является логарифмически нормально распределенным критерием оценки, что означает, что анализ проводился в логарифмическом масштабе. При представлении результатов, расчетные средние различия между активным препаратом и плацебо были преобразованы в линейную шкалу и выражены как процентное снижение от исходного уровня в группе активного препарата по сравнению с группой плацебо. По завершении сбора данных для когорты 3 была

выполнена моментальная фиксация данных с целью промежуточного анализа (см. Раздел (v) ниже), чтобы оценить изменчивость измерения FeNO для обеспечения надлежащей мощности когорт и анализа предварительных оценок изменения от исходного уровня для каждой из первых трех доз по сравнению с плацебо.

(iv) Анализ FeNO

Субъекты, получающие плацебо, были объединены из всех трех когорт в одну группу, состоящую из 10 пациентов. Когорты 1 и 2 включали по 6 пациентов, получавших активное лечение, а когорты 3 состояла из 12 пациентов. От каждого пациента получали 20 измерений FeNO: исходное значение, измерение через 2 часа после утренней дозы и через 2 часа после вечерней дозы со Дня 1 по День 9 и через 2 часа после утренней дозы в День 10.

Оценки средней разницы в \log FeNO между каждой активной группой и группой плацебо получали из нелинейной модели смешанных эффектов, в которой нелинейная часть представляла собой сигмоидальную емас-модель формы

$$\frac{A \cdot t^q}{t_{mid}^q + t^q}$$

Параметр асимптоты A моделировался фиксированным эффектом группы лечения и случайным эффектом, специфичным для конкретного субъекта:

$$A_{ik} = \beta_k + b_i$$

для группы лечения k (k =плацебо, номинальная доза 5 мг, 15 мг и 50 мг) и субъекта i (i =от 1 до 34). Случайный эффект учитывал корреляцию в пределах данных пациента и учитывал специфические асимптоты. Чтобы учесть различный временной эффект в группе плацебо, t_{mid} -параметр включал два фиксированных уровня эффекта:

$$t_{mid} = \beta_{\text{Активное лечение}} + \beta_{\text{Плацебо}}$$

Для графической визуализации данных, наблюдаемые снижения уровня FeNO наносили на график за период лечения (со Дня 1 по День 10) и Дни 11 и 12. Измерения FeNO, начиная со Дня 11 и 12 были включены в графики, чтобы проиллюстрировать возвращение уровня FeNO к исходному.

Е. Результаты

(1) Результаты FeNO

Исходное среднее значение FeNO (CO) для всех когорт ($n=34$) составило 75,9 (41,0) ppb, медиана - 62 ppb. Расчетное процентное снижение в группе плацебо после 10 дней лечения составило 25,2%. Таблица 13 демонстрирует процентное снижение в каждой из дозовых групп по сравнению с группой плацебо.

Таблица 13. Результаты FeNO: Среднее процентное снижение от исходного уровня по сравнению с плацебо. Расчетные эффекты лечения представляют собой снижение в конце лечения (День 10).

Доставляемые дозы PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо (мг)	Процент снижения по сравнению с плацебо (95% ДИ)	P-значение*
20 мг	40,3%, (21%, 55%)	0,3%, (21%, < 0,001
6 мг	24,8%, (-5,5%, 46%)	0,099
2 мг	30,9%, (3,0%, 51%)	0,03

* Двусторонний тест нулевой гипотезы «нет разницы между активным лечением и плацебо»

(2) Результаты ФК

Ограниченное воздействие в сыворотке наблюдалось после того, как субъекты получили доставляемую дозу 2 мг в Когорте 1, что было недостаточно для расчета параметра ФК. Более полные данные о воздействии можно было определить после того, как субъекты получили доставляемые дозы 6 мг в Когорте 2 и 20 мг в Когорте 3, что позволило проанализировать ФК-параметры (Фиг. 9). Основные результаты в когортах 1-3 были следующими:

Показатели AUC и C_{max} увеличивались с дозой (Таблица 14).

Образцы перед введением дозы отбирали в течение 10-дневного периода дозирования, и наблюдаемые уровни в сыворотке продемонстрировали, что равновесное состояние было достигнуто к концу 2-го дня дозирования (Фиг. 9).

Концентрации после введения дозы в День 10 после 9-дневного введения дважды в день были выше, чем после 1-й дозы в День 1. Наблюдаемое увеличение в целом соответствовало интервалу дозирования 12 ч и фармакокинетическим характеристикам, полученным в исследовании с однократной возрастающей дозой (пример 2).

ФК анализ мочи не проводили.

В Когорте 1, 2 субъекта продемонстрировали низкие положительные результаты на ADA в День 17, при этом последующие ответы в День 40 были отрицательными. В когорте 2, ADA обнаружены не были.

Таблица 14. Данные анализа воздействия в День 10 введения дозы

Доставляемая доза PRS-060/AZD1402 (мг)	Среднее значение параметра ФК (CO)			
	C _{max} (нг/мл)		AUC ₀₋₁₂ (ч*нг/мл)	
	День 1	День 10	День 1	День 10
2	Не определено*	Не определено*	Не определено*	Не определено*
6	5,00 (3,39)	6,33 (1,63)	38,5 (21,4)	54,0 (13,9)
20	15,2 (7,39)	27,8 (13,0)	122 (65,0)	210 (97,6)

*Не определено из-за отсутствия субъектов с измеримыми концентрациями

(3) Поиск критерий оценки - Оценка связывания с мишенью путем

мониторинга ингибирования pSTAT6 в клетках CD3+. Результаты:

Ингибирование фосфорилирования STAT6 оценивали для оценки связывания с мишенью PRS-060/AZD1402.

Стимуляцию цельной крови ex-vivo посредством IL-4 проводили в крови субъектов, включенных в один из когорт из Когорт 1-3, и определяли соответствующие уровни pSTAT6. Цельную кровь собирали у пациентов, зарегистрированных в клиническом центре Nucleus Network, в назначенные моменты времени. Кровь стимулировали посредством 10 нг/мл IL-4 человека в течение 15 минут, затем, после лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов, проводили окрашивание на маркеры pSTAT6 и CD3, после чего подвергали анализу FACS. Среднее значение и стандартное отклонение % клеток pSTAT6+ CD3 у субъектов в динамике отбора образцов представлены на Фигуре 10. Ингибирование pSTAT6 наблюдали в Когорте 2 (доставляемая доза 6,00 мг) и далее. Результаты субъектов в Когорте 2 и 3 (доставляемые дозы 6,00 мг и 20,0 мг) продемонстрировали самое высокое ингибирование % клеток pSTAT6+ CD3 в период от 1 до 8 часов после ингаляционного введения в День 10.

ФК/ФД-анализ ингибирования активации цельной крови ex vivo (Фигура 11) продемонстрировал дозозависимое ингибирование последующего фосфорилирования STAT6 с небольшими вариациями между субъектами после ингаляционного введения PRS-060/AZD1402. Значение IC₅₀ было рассчитано как 0,306 нМ.

(4) Результаты безопасности

В Когорте 1 (доставляемая доза 2,0 мг) не наблюдалось клинически значимых изменений показателей жизненно важных функций, электрокардиограммы, лабораторных данных (биохимия, гематология, анализ мочи). В Когорте 2 (доставляемая доза 6,0 мг) был 1 субъект, у которого количество нейтрофилов и лейкоцитов увеличилось по сравнению с исходным уровнем до Дня 10, при этом в этой когорте не было изменений показателей жизненно важных функций или электрокардиограмм. В Когорте 3, у 1 субъекта было повышенное количество лейкоцитов, которое расценено как не имеющее клинического значения и нормализовалось при повторном тесте, у другого субъекта было снижение уровня гемоглобина, которое могло быть связано с повторным забором крови, при этом в этой когорте не было никаких изменений показателей жизненно важных функций или электрокардиограмм.

Нежелательные явления от легкой до умеренной степени тяжести наблюдались во всех трех когортах. В Когорте 1 (доставляемая доза 2,0 мг) они включали признаки легкой сыпи у 2 субъектов и сухость во рту после приема дозы у 1 субъекта. У одного субъекта отмечался кашель после приема дозы, но он исчез до приема следующей дозы. В Когорте 2 (доставляемая доза 6,0 мг) у 1 субъекта была дисгевзия, у 1 субъекта - легкая боль в суставах и у 1 субъекта - легкий кашель. В Когорте 3 (доставляемая доза 20,0 мг) головная боль и сухость во рту были расценены как возможно связанные с исследуемым препаратом; также наблюдались два эпизода бронхоспазма, но они не были связаны с введением препарата; еще у 2 субъектов отмечалось кратковременное свистящее дыхание,

которое было расценено как возможно и вероятно связанное с введением препарата.

В целом исследуемый препарат хорошо переносился, и при оценке безопасности не возникло опасений, которые повлияли бы на решение об увеличении дозы для всех трех когорт.

G. Обсуждение и выводы

В этом исследовании многократных возрастающих доз PRS-060/AZD1402 у пациентов с легкой формой астмы в когортах 1, 2 и 3 наблюдали дозозависимое системное связывание с мишенью в сравнении с плацебо, что выражается в ингибировании фосфорилирования STAT6.

В целом снижение содержания FeNO указывает на локальное связывание с мишенью PRS-060/AZD1402 в легких после ингаляционного введения. Однако ключевым наблюдением было значительное снижение FeNO у субъектов, которые получили доставляемую дозу 2 мг (Когорта 1), что не отражалось в системном связывании с мишенью pSTAT6, и при этой доставляемой дважды в день дозе было ограниченное воздействие в сыворотке, недостаточное для расчета параметров ФК. Это указывало на несоответствие между способностью PRS-060/AZD1402 воздействовать на местное воспаление легких, определяемой снижением содержания FeNO без значительного системного воздействия и связывания с мишенью. Это подтверждает концепцию о том, что доставляемый в легкие мутеин липокалина, нацеленный на IL-4R α , может опосредовать противовоспалительные эффекты без системного воздействия.

Пример 4. Простое слепое исследование с эскалацией дозы для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики многократных доз PRS-060/AZD1402, вводимых перорально у субъектов с легкой степенью астмы.

В примере 4 представлены данные для когорт 1-5. Данные для когорт 1-3 представлены в Примере 3. Поскольку клиническое исследование еще не завершено, данные для общей клинической оценки закрыты, и окончательные данные для отчета об исследовании еще не представлены.

A. Цели и обзор исследования

Цели исследования были такими, как описано в Примере 3 выше.

Исходные характеристики пациентов из когорт 1-4 приведены в Таблице 15 ниже.

Таблица 15 - исходные характеристики

Параметр	Плацебо (N=12)	AZD1402/PRS- 060 (N=30)	Всего (N=42)
Возраст, лет, среднее значение (диапазон)	28,8 (19-52)	28,4 (19-51)	28,4 (19-52)
Пол, мужской, n	11	26	37
Раса, n			
Европеоидная	8	25	33

Азиатская/уроженец Тихоокеанского региона Уроженец острова	2	3	5
Другие	2	2	4
ИМТ, кг/м ² , среднее (диапазон)	27,7 (22,5-34,8)	25,0 (20,5-33,4)	25,7 (20,5-34,8)
FeNO, ppb до введения дозы день 1, среднее (диапазон)	61,2 (28-122)	81,7 (32-178)	75,9 (28-178)
FEV1, мл, в день 1 до введения дозы среднее (диапазон)	3730,8 (2560-4770)	3901,7 (2580-5070)	3852,9 (2560-5070)
Соотношение FEV1/FVC,%, до введения дозы день 1, среднее (диапазон)	74,1 (63-85)	74,9 (62-87)	74,7 (62-87)

Пациенты из когорт 1-4.

ИМТ - индекс массы тела; FeNO - фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе; FEV1 - объем форсированного выдоха за первую секунду; FVC - форсированная жизненная емкость легких; ppb, частей на миллиард.

Схема исследования для когорт с 1 по 4 приведена на Фиг. 16.

В. Процедуры исследования

Процедуры исследования были такими, как описано в Примере 3 выше.

С. Критерии конечного результата и оценки

Критерии оценки в исследовании были такими, как описано в Примере 3 выше.

Д. Анализ данных

(i) ФК

Что касается вторичных критериев оценки, ФК-профили PRS-060/AZD1402 в День 1 и День 10 для первых 5 когорт анализировали в ходе исследования, а ФК-популяцию использовали в анализе данных. ФК-параметры воздействия получали в соответствии со стандартными некоммерческими аналитическими процедурами. Применяемое программное обеспечение - Phoenix™ WinNonlin® v 8.0 (Pharsight Corporation, США). Описательная статистика ФК-параметров воздействия включала среднее арифметическое и стандартное отклонение (СО) в соответствии с Таблицей 19, и генерировали описательные средние значения концентрации в сыворотке в зависимости от времени.

(ii) Образование антител против лекарственного средства

В ходе исследования изучали иммуногенность PRS-060/AZD1402 (которую оценивали по образованию антител анти—PRS-060/AZD1402).

(iii) ФД - FeNO

Оценка ФД-маркера FeNO описана в Примере 3, часть (iii).

(iv) Анализ FeNO

Нелинейная модель смешанных эффектов, описанная в Примере 3 (iv), была обновлена путем добавления значения FeNO на исходном уровне в качестве ковариаты в модель параметра асимптоты A.

Е. Результаты

(1) Результаты ФК

Ограниченное воздействие в сыворотке наблюдалось после того, как субъекты получили доставляемую дозу 2 мг в Когорте 1, что было недостаточным для расчета параметра ФК. Более полные данные о воздействии можно было определить после того, как субъекты получили доставляемые дозы 6 мг в Когорте 2, 20 мг в Когорте 3 и 60 мг в Когорте 4, что позволило проанализировать ФК-параметры (Фиг. 13). Основные результаты в когортах 1-5 были следующими:

Показатели AUC и C_{max} увеличивались с дозой (Таблица 16).

Образцы перед введением дозы отбирали в течение 10-дневного периода дозирования, и наблюдаемые уровни в сыворотке продемонстрировали, что равновесное состояние было достигнуто к концу 2-го дня дозирования (Фиг. 13).

Концентрации после введения дозы в День 10 после 9-дневного введения дважды в день были выше, чем после 1-й дозы в День 1. Наблюдаемое увеличение в целом соответствовало интервалу дозирования 12 ч и фармакокинетическим характеристикам, полученным в исследовании с однократной возрастающей дозой (Пример 2).

ФК анализ мочи не проводили.

Таблица 16. Данные анализа воздействия в День 1 и День 10 введения дозы

Доставляемые дозы PRS-060/AZD1402 (мг)	Среднее значение параметра ФК (CO)			
	C _{max} (нг/мл)		AUC ₀₋₁₂ (ч*нг/мл)	
	День 1	День 10	День 1	День 10
0,2	Не определено*	Не определено*	Не определено*	Не определено*
2	Не определено*	Не определено*	Не определено*	Не определено*
6	5,00 (3,39)	6,33 (1,63)	38,5 (21,4)	54,0 (13,9)
20	15,2 (7,39)	27,8 (13,0)	122 (65,0)	210 (97,6)
60	69,6 (38,6)	103 (31,1)	713 (395)	780 (340)

*Не определено из-за отсутствия субъектов с измеримыми концентрациями

(3) Антитела к лекарственному препарату

В Когорте 1, из 6 субъектов 2 субъекта продемонстрировали низкие положительные результаты на ADA в День 17, при этом последующие ответы в День 40 были отрицательными.

В Когорте 2, ADA обнаружены не были.

В Когорте 3, из 12 субъектов 4 субъекта продемонстрировали низкие положительные результаты на ADA в День 40, и 1 субъект в День 17, при этом последующие ответы в День 40 были отрицательными.

В Когорте 4, из 6 субъектов 3 субъекта продемонстрировали положительные результаты на ADA. Из них только 2 субъекта в День 40 имели низкие положительные значения ADA. 1 субъект продемонстрировал более высокий положительный ответ на ADA как в День 17, так и в День 40.

В Когорте 5 был один субъект с подтвержденным положительным результатом на ADA в Дни 12, 17 и 40, и 1 субъект с подтвержденным положительным результатом на ADA в День 40.

Ни в одном из образцов перед лечением не наблюдалось каких-либо ADA, как и в образцах тех пациентов, которые получали PRS-060/AZD1402.

(4) Поисковый критерий оценки - Оценка связывания с мишенью путем мониторинга ингибирования pSTAT6 в клетках CD3+:

Ингибирование фосфорилирования STAT6 оценивали для оценки связывания с мишенью PRS-060/AZD1402.

Стимуляцию цельной крови ex-vivo посредством IL-4 проводили в крови субъектов, включенных в один из центров из Когорт с 1 по 4, но не из Когорты 5, и определяли соответствующие уровни pSTAT6. Цельную кровь собирали у пациентов, зарегистрированных в клиническом центре Nucleus Network, в назначенные моменты времени. Кровь стимулировали посредством 10 нг/мл IL-4 человека в течение 15 минут, затем, после лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов, проводили окрашивание на маркеры pSTAT6 и CD3, после чего подвергали анализу FACS. Среднее значение и стандартное отклонение % клеток pSTAT6+ CD3 у субъектов в динамике отбора образцов представлены на Фигуре 14. Ингибирование pSTAT6 наблюдали в Когорте 2 (доставляемая доза 6,00 мг) и далее. Результаты субъектов в Когорте 3 и 4 (доставляемые дозы 20,00 мг и 60,0 мг) продемонстрировали самое высокое ингибирование % клеток pSTAT6+ CD3 в период от 1 до 8 часов после ингаляционного введения в День 10.

ФК/ФД-анализ ингибирования активации цельной крови ex vivo (Фигура 15) продемонстрировал дозозависимое ингибирование последующего фосфорилирования STAT6 с небольшими вариациями между субъектами после ингаляционного введения PRS-060/AZD1402. Значение IC₅₀ было рассчитано как 0,30 нМ.

(5) Результаты оценки безопасности: Когорты 1-5

Нежелательные явления. Нежелательные явления от легкой до умеренной степени тяжести, связанные с приемом препарата, наблюдались во всех 5 когортах и обобщены следующим образом:

В Когорте 1 (доставляемая доза 2,0 мг два раза в день) нежелательные явления включали признаки легкой сыпи у 2 субъектов и сухость во рту после приема дозы у 1 субъекта. У одного субъекта отмечался кашель после приема дозы, но он исчез до приема

следующей дозы

В Когорте 2 (доставляемая доза 6,0 мг два раза в день) нежелательные явления включали: у 1 пациента возникла дисгевзия, у 1 - умеренная боль в суставах, у 1 - легкий кашель и последующее короткое и легкое обострение астмы через 2 дня после окончания введения препарата.

В Когорте 3 (доставляемая доза 20,0 мг два раза в день) были отмечены нежелательные явления, которые включали головную боль и сухость во рту, которые возможно были связаны с исследуемым препаратом. У одного субъекта наблюдались два явления бронхоспазма, но они не были связаны с введением препарата. Краткосрочное свистящее дыхание наблюдалось еще у 2 субъектов и было расценено как возможно и вероятно связанное с введением препарата соответственно.

В Когорте 4 (доставляемая доза 60,0 мг два раза в день) были отмечены нежелательные явления, включающие головную боль, которая возможно была связанной с исследуемым препаратом. Также было отмечено, что два эпизода кашля и ассоциированных с ними симптомов были определено связаны с исследуемым препаратом. В День 9 у одного субъекта с диагнозом «инфекция верхних дыхательных путей» случился кратковременный бронхоспазм. Один субъект был исключен из исследования в День 9 из-за кашля и высокой температуры, что было расценено как инфекция верхних дыхательных путей, вероятно связанная с препаратом. У этого участника также были многократные эпизоды синкопе, которые, вероятно, были связаны с вирусным заболеванием. У того же участника также было одно нежелательное явление в виде герпетической лихорадки на губах (продолжающейся) и стеснения в груди после периода введения препарата, вероятно, связанное с вирусным заболеванием. Кроме того, у этой пациентки по возвращении на визит для последующего наблюдения после приема препарата была подтверждена не связанная с препаратом беременность. Наступившим результатом беременности был выкидыш, не связанный с исследуемым препаратом и, вероятно, связанный с возрастом участницы (47 лет).

Дополнительные данные относительно безопасности обобщены следующим образом:

В Когорте 1 (доставляемая доза 2,0 мг два раза в день) не наблюдалось клинически значимых изменений основных показателей жизненно важных функций, электрокардиограммы, лабораторных данных (биохимия, гематология, анализ мочи).

В Когорте 2 (доставляемая доза 6,0 мг два раза в день) был 1 субъект, у которого количество нейтрофилов и лейкоцитов увеличилось по сравнению с исходным уровнем до Дня 10. В этой когорте не было изменений показателей жизнедеятельности или электрокардиограммы.

В Когорте 3 (доставляемая доза 20,0 мг два раза в день), у 1 субъекта было повышенное количество лейкоцитов, которое расценено как не имеющее клинического значения и нормализовалось при повторном тесте, у другого субъекта было снижение уровня гемоглобина, которое могло быть связано с повторным забором крови. В этой

когорте не было изменений показателей жизнедеятельности или электрокардиограммы.

В Когорте 4 (доставляемая доза 60,0 мг два раза в день) у одного участника отмечалось низкое количество нейтрофилов до введения дозы и не было связано с исследуемым препаратом. Также был случай легкой преходящей лимфопении и нейтропении, которые не были расценены как значимые. Один субъект продемонстрировал колебания гематологических показателей с падением уровня гемоглобина, при этом результат анализа после лечения соответствовал результату в День 1. У одного субъекта наблюдался повышенный уровень билирубина перед введением дозы (при нормальном уровне на скрининге), который продолжал повышаться во время исследования, но снизился на незапланированном визите. Однако он все еще остается высоким, и нежелательное явление продолжается.

В Когорте 5 (доставляемая доза 0,2 мг два раза в день) 26 нежелательных эффектов от легкой до умеренной степени тяжести наблюдались у 9 из 11 включенных в исследование субъектов. Ни одно из нежелательных явлений не было расценено серьезным или тяжелым. 20 из 26 АЕ были расценены «легкими», 5 из которых были расценены «возможно связанными» с приемом исследуемого препарата. 6 нежелательных явлений были расценены умеренными по своей тяжести, 3 из которых были расценены «возможно связанными», которые наблюдались у одного субъекта, получавшего плацебо. Остальные 3 АЕ средней степени тяжести были расценены как «не связанные». Все АЕ, наблюдавшиеся в Когорте 5, разрешились. Клинические исследователи сочли все измененные данные спирометрии, лабораторных исследований, ЭКГ и показателей жизненно важных функций клинически не значимыми. Комитет по рассмотрению вопросов безопасности единогласно решил, что уровень дозы хорошо переносится.

В целом исследуемый препарат хорошо переносился в этом исследовании, и при оценке безопасности не возникло опасений, которые повлияли бы на решение об увеличении дозы и/или переходе к следующей когорте для всех 5 когорт.

В таблице 17 обобщены нежелательные явления в когортах 1-4, которые произошли у $\geq 5\%$ пациентов в целом.^a

Класс по поражению органов и систем органов АЕ Предпочтительные термины^b	Плацебо (N=12) n (%) m	AZD1402/PRS-060^c (N=30) n (%) m	Всего (N=42) n (%) m
Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта	4 (33,3) 4	13 (43,4) 14	17 (40,5) 18
	1 (8,3) 1	2 (6,7) 2	3 (7,1) 3
Сухость во рту	1 (8,3) 1	3 (10,0) 3	4 (9,5) 4

Тошнота			
Инфекционные и паразитарные заболевания	1 (8,3) 1	7 (23,3) 8	8 (19,0) 9
Инфекция верхних дыхательных путей	1 (8,3) 1	3 (10,0) 4	4 (9,5) 5
Нарушения со стороны нервной системы	5 (41,7) 9	13 (43,4) 18	18 (42,9) 27
Головная боль	3 (25,0) 6	5 (16,7) 7	8 (19,0) 13
Пресинкопе	0	4 (13,3) 6	4 (9,5) 6
Нарушения со стороны органов дыхания, грудной клетки и средостения	6 (50,0) 6	14 (46,7) 15	20 (47,6) 21
Кашель	1 (8,3) 1	4 (13,3) 4	5 (11,9) 5
Ринорея	2 (16,7) 2	1 (3,3) 1	3 (7,1) 3
Свистящее дыхание	2 (16,7) 2	4 (13,3) 5	6 (14,3) 7

^aПроцент основан на предпочтительном термине, т.е. на частоте АЕ, которые возникали у $\geq 5\%$ от общего числа пациентов по предпочтительному термину

^bАЕ относятся к когортам 1-4 и возникали у $\geq 5\%$ от общего числа пациентов.

^cДоставляемые дозы AZD1402/PRS-060 составляли 2 мг, 6 мг, 20 мг и 60 мг

Наблюдалась одна беременность, которая привела к серьезному АЕ, представляющему собой выкидыш. Исследователь решил, что это связано с возрастом пациентки и не связано с исследуемым препаратом.

АЕ - нежелательное явление; m -- количество явлений; n - количество пациентов с конкретными АЕ; N - общее количество пациентов в каждой группе лечения

(6) Когорта 1-5: Результаты FeNO

Исходное среднее значение FeNO (CO) для когорт 1-4 (n=42) составило 75,8 (41,2) ppb, медиана - 62 ppb, и диапазон - 28-178 ppb. Обновленную нелинейную модель смешанных эффектов, включая исходный уровень FeNO в качестве ковариаты, применяли для оценки среднего процентного снижения. Расчетное процентное снижение в группе плацебо (n=12) после 10 дней лечения составило 26,2%.

Таблица 18. Среднее процентное снижение FeNO от исходного уровня по сравнению с плацебо. Расчетные эффекты лечения представляют собой снижение в конце лечения (День 10).

Доставляемые дозы PRS-060/AZD1402 и соответствующего плацебо (мг)	Число пациентов	Среднее снижение LS по сравнению с исходным уровнем, % (95% ДИ)	Процент снижения по сравнению с плацебо (95% ДИ)	P-значение*
60 мг	6	48,7 (37-58)	30,5%, (10%, 46%)	0,005
20 мг	12	53,1 (46-59)	36,4%, (22%, 48%)	< 0,0001
6 мг	6	44,1 (31-54)	24,3%, (2,7%, 41%)	0,03
2 мг	6	43,9 (31-54)	24,0%, (1,8%, 41%)	0,04
Плацебо	12	26,2 (14-36)		

* Двусторонний тест нулевой гипотезы «нет разницы между активным лечением и плацебо»

Анализ данных FeNO для Когорты 5, доставляемая доза 0,2 мг, не продемонстрировал снижения FeNO от исходного уровня по сравнению с плацебо.

Г. Обсуждение и выводы

В этом исследовании многократных возрастающих доз PRS-060/AZD1402 у пациентов с легкой формой астмы в когортах 1-5 (т.е. доставляемые дозы 2 мг, 6 мг, 20 мг, 60 мг и 0,2 мг) наблюдали дозозависимое системное связывание с мишенью по сравнению с плацебо, что выражается в ингибировании фосфорилирования STAT6.

В целом снижение содержания FeNO указывает на локальное связывание с мишенью PRS-060/AZD1402 в легких после ингаляционного введения. Однако ключевым наблюдением было значительное снижение FeNO у субъектов, которые получили доставляемую дозу 2 мг (Когорта 1), что не отражалось значительным ингибирующим эффектом в анализе системного связывания с мишенью pSTAT6, поскольку при этой доставляемой дважды в день дозе наблюдаемое ограниченное системное воздействие было недостаточным для ингибирования этого ответа, индуцированного ИЛ-4. Это указывало на несоответствие между продемонстрированной способностью PRS-060/AZD1402 воздействовать на местное воспаление легких, определяемой снижением содержания FeNO, но без значительного системного воздействия и ассоциированного с ним связывания с мишенью. Это подтверждает концепцию о том, что доставляемый в легкие мутеин липокалина, нацеленный на ИЛ-4R α , может опосредовать противовоспалительные эффекты без обнаруживаемого системного воздействия.

Таблица 19 Фармакокинетические параметры

Параметр	Объяснение
AUC _{0-τ}	Площадь под кривой от нуля до конца периода дозирования
AUC ₀₋₁₂	AUC сыворотки от времени "нуль" до 12 часов после введения дозы

AUC_{0-24}	AUC сыворотки от времени "нуль" до 24 часов после введения дозы
AUC_{0-last}	AUC сыворотки от времени "нуль" до времени отбора образца с последней измеряемой концентрацией (t_{last}) (масса \times время \times объем-1)
AUC_{inf}	AUC сыворотки от времени "нуль" до бесконечности (масса \times время \times объем-1)
$AUC_{0-24}/\text{доза}$	Нормализованная по дозе AUC сыворотки от времени "нуль" до 24 часов после введения дозы
$AUC_{0-last}/\text{доза}$	Нормализованная по дозе AUC сыворотки от времени "нуль" до времени отбора образца с последней измеряемой концентрацией (t_{last}) (масса \times время \times объем-1)
$AUC_{inf}/\text{доза}$	Нормализованная по дозе AUC сыворотки от времени "нуль" до бесконечности (масса \times время \times объем-1)
Rac $AUC_{0-\tau}$	Коэффициент накопления для $AUC_{0-\tau}$ оцененный как $AUC_{(0-\tau)}$ День 10/ AUC_{0-12} в последний(10 ^й) день введения дозы, если экстраполированная часть меньше 20%
Rac C_{max}	Коэффициент накопления для C_{max} , оцененный как C_{max} День 10/ C_{max} День 1
TCP	Параметр временного изменения
C_{ave}	Средняя концентрация в сыворотке во время интервала дозирования, оцененная как $AUC_{0-\tau}/12$
C_{max}	Максимальная (пиковая) наблюдаемая концентрация лекарственного средства в крови, сыворотке или другой жидкости организма (масса \times объем -1)
$C_{max}/\text{Доза}$	Нормализованная по дозе (пиковая) наблюдаемая концентрация лекарственного средства в крови, сыворотке или другой жидкости организма (масса \times объем -1)
T_{max}	Время до достижения максимальной (пиковой) концентрации лекарственного препарата в крови, сыворотке или другой жидкости организма после введения дозы (время)
$t_{1/2}$	Период полувыведения, связанный с конечным наклоном (λ_z) полулогарифмической кривой концентрация-время (время). Использование квалификатора для других периодов полужизни
CL/F	Кажущийся полный клиренс лекарственного средства из сыворотки после ингаляции (объем \times время -1).

V_z/F	Кажущийся объем распределения на основе терминальной фазы.
A_e	Общее количество препарата, выведенного с мочой за весь интервал сбора (т.е. от 0 до 48 часов после введения дозы).
$A_e(t_x-t_{x+1})$	Количество препарата, выводимого с мочой в неизменном виде за интервал времени от t_x до t_{x+1} Рассчитывается для каждого интервала сбора
$A_e(0-t_x)$	Кумулятивное количество препарата, выводимого с мочой за интервал времени от 0 до t_x . Рассчитывается для каждого интервала сбора
f_e	Фракция дозы, экскретируемая с мочой за весь интервал сбора (т.е. от 0 до 48 часов после введения дозы).
$f_e(t_x-t_{x+1})$	Фракция дозы, экскретируемая с мочой в неизменном виде за интервал времени от t_x до t_{x+1} Рассчитывается для каждого интервала сбора
$f_e(0-t_x)$	Суммарная фракция дозы, экскретируемая с мочой в неизменном виде за интервал времени от 0 до t_x Рассчитывается для каждого интервала сбора
CL_r	Почечный клиренс
T_{last}	Время отбора образца с последней измеряемой концентрацией
MRT	Среднее время удержания
MRT_{inf}	Среднее время удержания экстраполировано на бесконечность
V_z	Объем распределения в терминальной фазе
V_{ss}	Объем распределения в равновесной фазе
CL	Системный клиренс препарата из плазмы/сыворотки
$F_{ингаляция, всего}$	Абсолютная системная биодоступность после ингаляции
MAT	Среднее время абсорбции
FEV_1	Объем форсированного выдоха за 1 секунду
FEV_6	Объем форсированного выдоха за 6 секунд
FVC	Форсированная жизненная емкость легких
$PEFR$	Пиковая скорость выдоха
Соотношение FEV_1/FVC	Количество воздуха, выдыхаемого с силой за одну секунду (FEV_1), по сравнению с полным количеством воздуха, которое может быть выдохнуто за один полный вдох.
интервал RR	Расстояние между двумя последовательными зубцами R
Интервал PR	Период, измеряемый в миллисекундах, который длится от начала зубца

	Р (начало деполяризации предсердий) до начала комплекса QRS (начало деполяризации желудочков).
Интервал QT	Мера продолжительности реполяризации желудочков
QTc	Скорректированный QT
Интервал QTcB	QTc, скорректированный по формуле Базетта
Интервал QTcF	QTc, скорректированный по формуле Фридерисии

Ссылки

Выше цитируется ряд публикаций для более полного описания и характеристики настоящего изобретения и уровня техники, к которому настоящее изобретение относится. Полные ссылки на эти литературные источники приведены ниже: Каждая из этих заявок включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

- Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214
 Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14
 Flower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24
 Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350
 You, J., et al. (2010) *Electrophoresis* 31, 1853-1861
 Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 257-275
 Schlehuber, S., and Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* 96, 213-228
 Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482; 241-248
 Glasgow, B.J. et al. (1995) *Curr. Eye Res.* 14, 363-372
 Gasymov, O.K. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 307-320
 Breustedt, D.A. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 1, 484-493
 Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402
 Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410
 Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197
 Nelms et al., *Annu Rev Immunol*, 1999, 17:701-738
 Chen et al., 2003. *J Immunol*, 171:3627-3635
 Wirnsberger et al., *Eur J Immunol.*, 2006, 36(7):1882-1891
 Rahal et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 100(4): 1034-1043
 Hoeck and Woisettschläger, *J Immunol*, 2001, 167(6):3216-3222
 Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85(8):2444-2448

Последовательности

Таблица 20

SEQ ID NO:	Описание	Белок/ ДНК	Последовательность
1	Аминокислотная	Белок	ASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAV

	последовательность мутеина липокалина слезы человека PRS-060/AZD1402		YNSVTPMTLTTLEGGNLEAKFTAQRKGR WQKYKLVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYI IRSHVKDHYIFHSEGLCPGQPVPGVWLVG RDPKNNLEALEDFEKAAGARGLSTESILIP RQSETSSPGSD
2	Липокалин слезы человека	Белок	MKPLLLAVSLGLIAALQAHLLASDEEIQ DVSGTWYLKAMTVDREFPEMNLESVTPM TLTTLEGGNLEAKVTMLISGRCQEVKAVL EKTDEPGKYTADGGKHVAYIIRSHVKDH YIFYCEGELHGKPVGRGVKLVGRDPKNNL EALEDFEKAAGARGLSTESILIPRQSETCSP GSD
3	Зрелая форма липокалина слезы человека	Белок	HLLASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDREF PEMNLESVTPMTLTTLEGGNLEAKVTMLI SGRCQEVKAVLEKTDEPGKYTADGGKHV AYIIRSHVKDHYIFYCEGELHGKPVGRGVK LVGRDPKNNLEALEDFEKAAGARGLSTES ILIPRQSETCSPGSD
4	Аминокислотная последовательность альфа-цепи рецептора интерлейкина-4 человека	Белок	MKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNGPTN CSTELRLLYQLVFLLEAHTCIPENNGGA GCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQL LWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSD TLL LTWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNIWSEND PADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKSGISYR AR VRAWAQCYNNTWSEWSPSTKWHNSYRE PFEQHLLLGVSVCIVILAVCLLCYVSITKI KKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQW EKRSRGQEPKCPHWKNCLTKLLPCFLEH NMKRDEDPHKAAKEMPFQSGGKSAWCP VEISKTVLWPESISVVRVELFEAPVECEE EEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIV ARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCL LPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGK

			<p>EQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIA GNPAYRSFSNSLSQSPCPRELGPDP LLARH LEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWE QILRRNVLQHGAAPVSAPTSAGYQEFVH AVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSS LLASSAVSPEKCGFGASSGEEGYKPFQDLI PGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSS HLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQ ATDPLVDSLGSIVYSALTCCHLCGHLKQC HGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPP TTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGIS EKSKSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVS VGPTYMRVS</p>
5	<p>Аминокислотная последовательность внеклеточного домена альфа-цепи рецептора интерлейкина-4 человека</p>	Белок	<p>MKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNGPTN CSTELRLLYQLVFLLEAHTCIPENNGGA GCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQL LWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSD TLL LTWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNIWSEND PADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKSGISYR AR VRAWAQCYNNTWSEWSPSTKWHNSYRE PFEQH</p>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения астмы у субъекта-человека, который включает введение путем ингаляции терапевтически эффективного количества мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, указанному субъекту по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

2. Способ по п. 1, где доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 8 мг.

3. Способ по п. 2, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

4. Способ по любому из пп. 2 или 3, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ T-клетках у указанного субъекта.

5. Способ по п. 4, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ T-клетках у субъекта.

6. Способ по п. 2 или 3, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ T-клетках со значением IC₅₀ около 10 нМ или ниже.

7. Способ по п. 1, где доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет менее чем около 2 мг.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

9. Способ по п. 8, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.

11. Способ по п. 1, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,2 мг до около 60 мг.

12. Способ по п. 1 или 11, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг.

13. Способ по п. 12, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 6 мг и вводится два раза в день.

14. Способ по п. 12 или 13, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

15. Способ по любому из пп. 12-14, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта.

16. Способ по п. 15, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

17. Способ по пп. 12-14, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC₅₀ около 10 нМ или ниже.

18. Способ по п. 1 или 11, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше.

19. Способ по п. 18, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше и вводится два раза в день.

20. Способ по п. 11 или 18 или 19, где доставляемая доза приводит к местному воздействию в легких указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

21. Способ по любому из пп. 11-20, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

22. Способ по п. 21, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

23. Способ по любому из пп. 11-22, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.

24. Мутеин липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его вариант или фрагмент, для применения в способе лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанный способ включает этап введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту путем ингаляции по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

25. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 24, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 8 мг.

26. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 25, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

27. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по любому из пп. 25 или 26, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта.

28. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 27, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

29. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 25 или 26, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC₅₀ около 10 нм или ниже.

30. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 24, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет менее чем около 2 мг.

31. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по пп. 24-30, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

32. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 31, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

33. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по любому из пп. 24-32, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.

34. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 24, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,2 мг до около 60 мг.

35. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 24 или 34, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг.

36. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 35, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг и вводится два раза в день.

37. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 35 или 36, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

38. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по любому из пп. 35-37, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта.

39. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 38, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

40. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 35-37, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC₅₀ около 10 нм или ниже.

41. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 24 или 34, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше.

42. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 41, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше и вводится два раза в день.

43. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 34 или 41 или 42, где доставляемая доза приводит к местному воздействию в легких указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

44. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по любому из пп. 34-43, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

45. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по п. 44, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей

мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

46. Мутеин липокалина IL-4R α или его вариант или фрагмент для применения по любому из пп. 34-45, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.

47. Применение мутеина липокалина против рецептора IL-4 альфа (IL-4R α), содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или его варианта или фрагмента, для изготовления лекарственного средства для лечения астмы у субъекта-человека, при этом указанное лечение включает введение указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента, указанному субъекту путем ингаляции по меньшей мере один раз в день, при этом доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,1 мг до около 160 мг.

48. Применение по п. 47, где доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 8 мг.

49. Применение по п. 48, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

50. Применение по любому из пп. 48 или 49, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта.

51. Применение по п. 50, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

52. Применение по п. 48 или 49, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4-стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC₅₀ около 10 нМ или ниже.

53. Применение по п. 47, где доставляемая доза мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет менее чем около 2 мг.

54. Применение по любому из пп. 47-53, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

55. Применение по п. 54, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

56. Применение по любому из пп. 47-55, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.

57. Применение по п. 47, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 0,2 мг до около 60 мг.

58. Применение по п. 47 или 57, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет по меньшей мере около 6 мг.

59. Применение по п. 58, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет от около 6 мг и вводится два раза в день.

60. Применение по п. 58 или 59, где доставляемая доза приводит к системному воздействию указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

61. Применение по любому из пп. 58-60, где введение указанного мутеина липокалина указанному субъекту приводит к ингибированию IL-4 -стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у указанного субъекта.

62. Применение по п. 61, где введение указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента приводит к по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию IL-4 -стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках у субъекта.

63. Применение по п. 58-60, где введение указанного мутеина липокалина приводит к ингибированию IL-4 -стимулированного фосфорилирования STAT6 в CD3+ Т-клетках со значением IC_{50} около 10 нМ или ниже.

64. Применение по п. 47 или 57, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше.

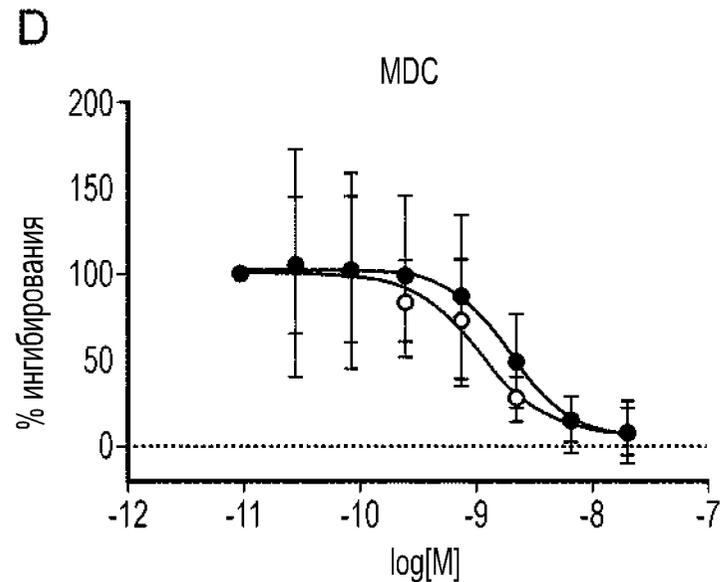
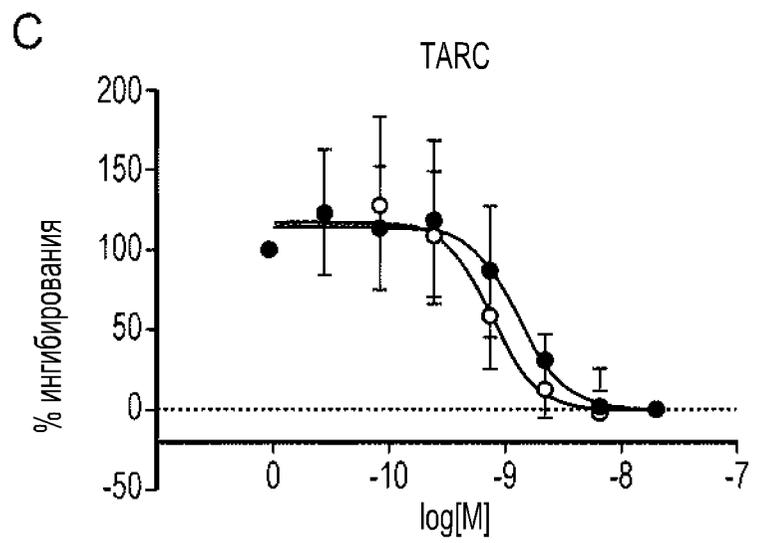
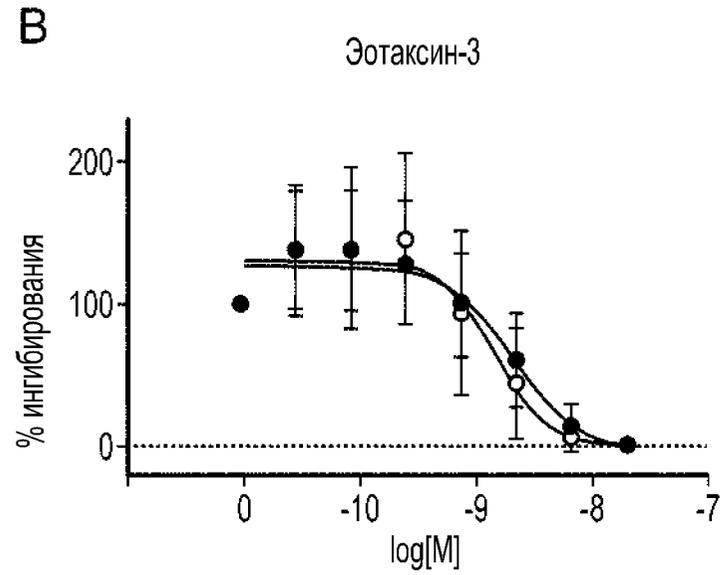
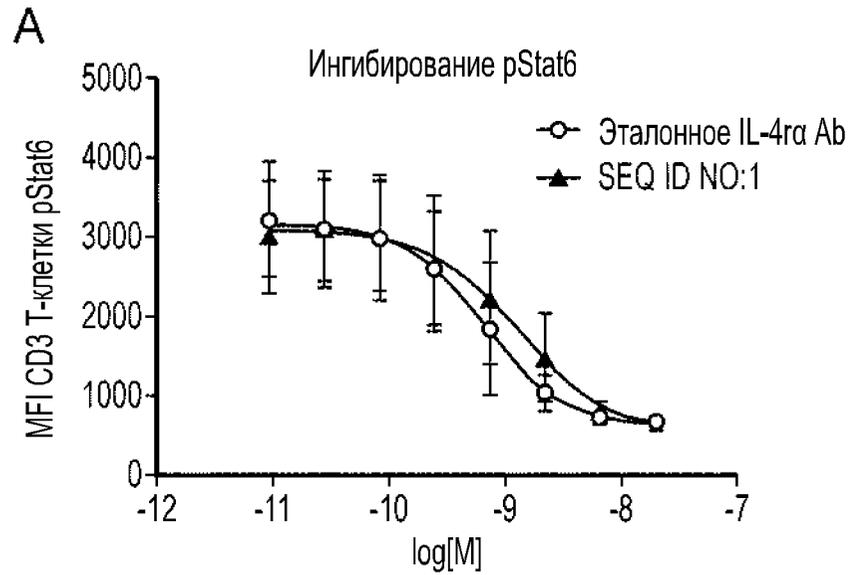
65. Применение по п. 64, где доставляемая доза указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента составляет около 2 мг или меньше и вводится два раза в день.

66. Применение по п. 57 или 64 или 65, где доставляемая доза приводит к местному воздействию в легких указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента.

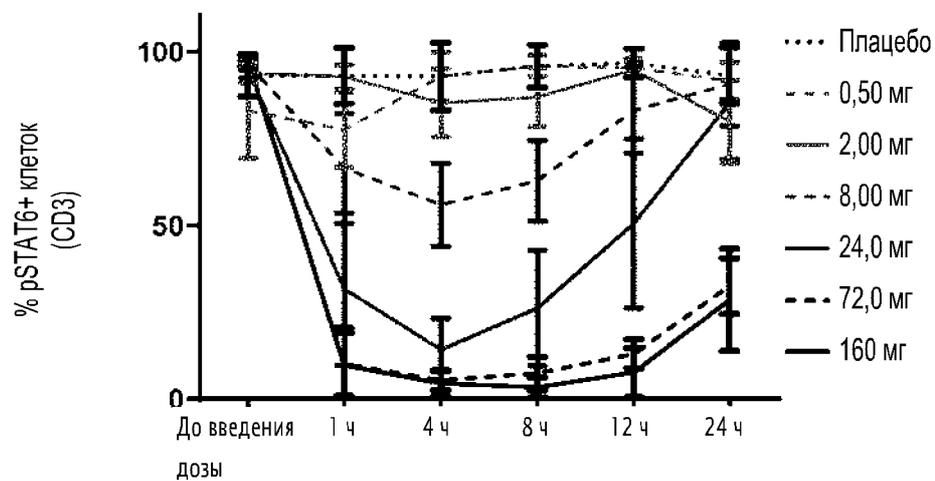
67. Применение по любому из пп. 57-66, где фракционная концентрация оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) снижается после введения указанного мутеина липокалина, его варианта или фрагмента указанному субъекту.

68. Применение по п. 67, где содержание FeNO снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% после введения указанного мутеина липокалина или его варианта или фрагмента указанному субъекту.

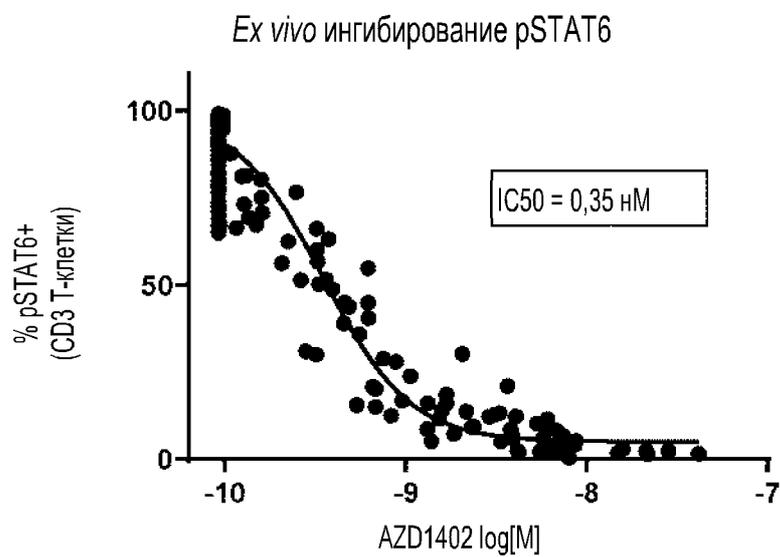
69. Применение по любому из пп. 57-68, где указанный мутеин липокалина или его вариант или фрагмент вводят субъекту путем распыления.



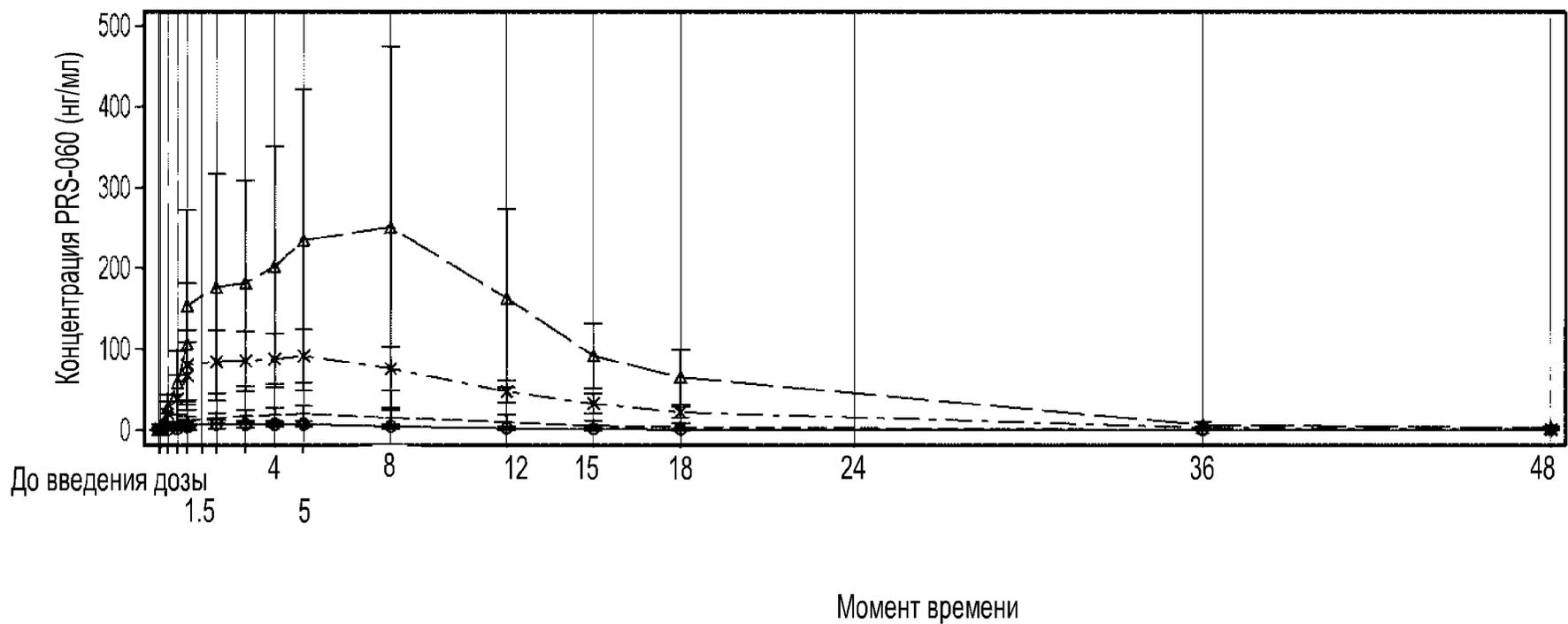
Фиг. 1



Фиг. 2



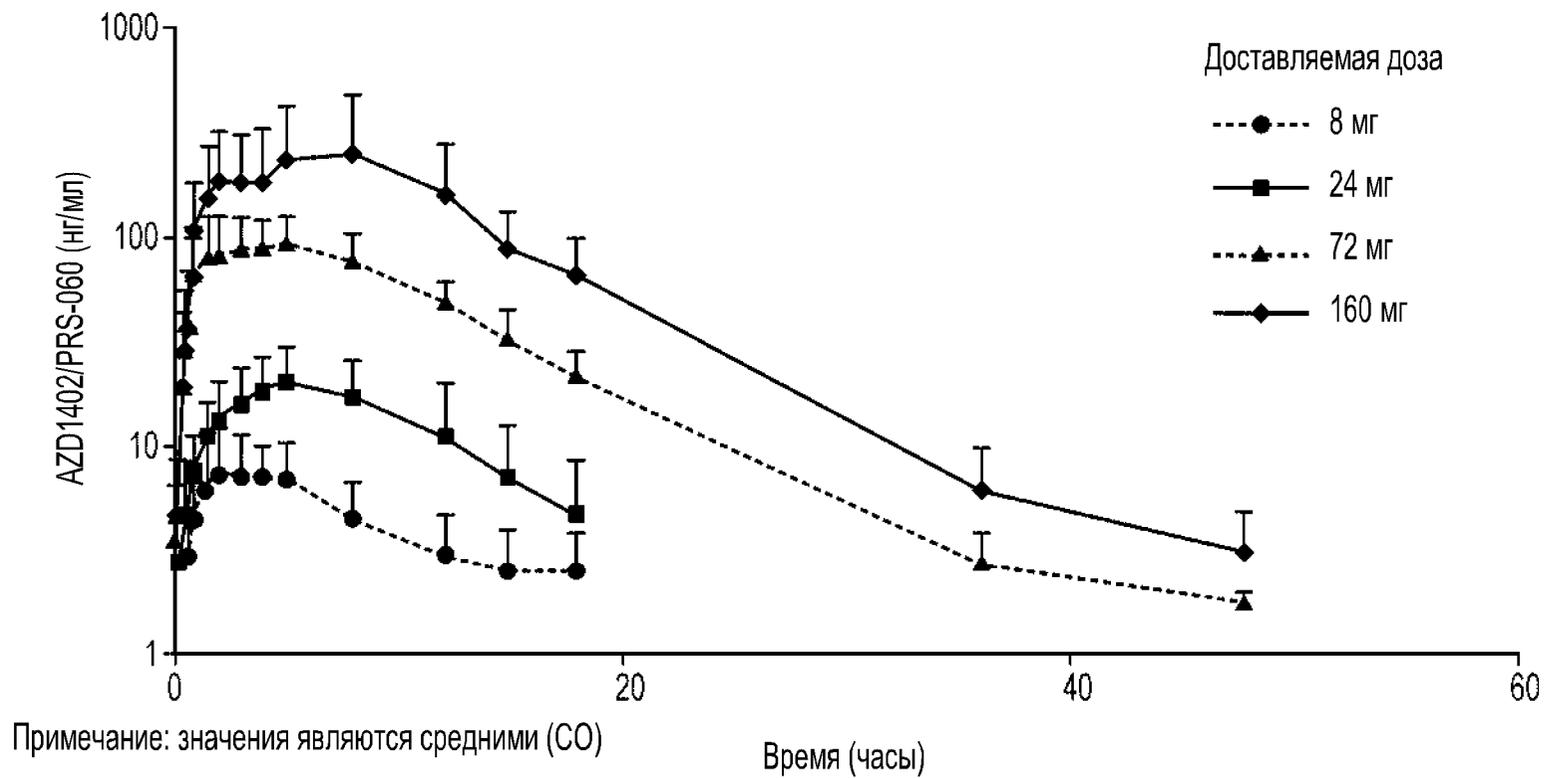
Фиг. 3



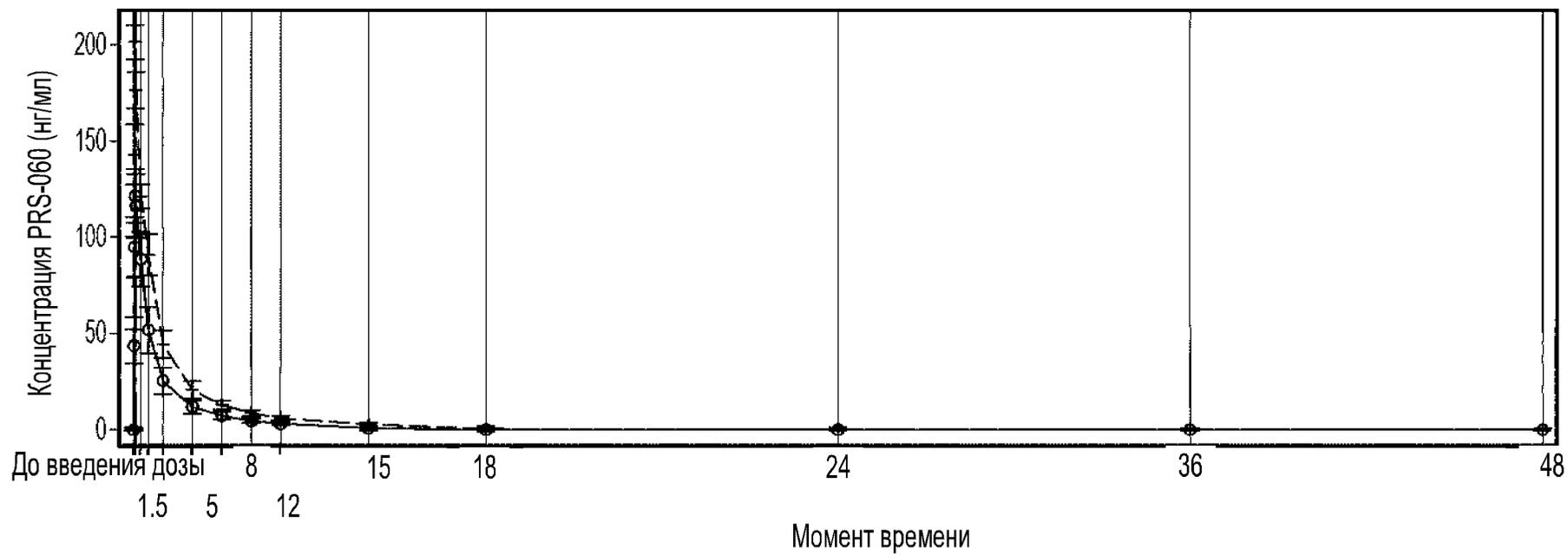
Когорта/доставляемая доза:

- Когорта 4/ 8,00 мг PRS-060
- ×— Когорта 6/ 72,0 мг PRS-060
- +— Когорта 5/ 24,0 мг PRS-060
- ▲— Когорта 7/ 160 мг PRS-060

Фиг. 4

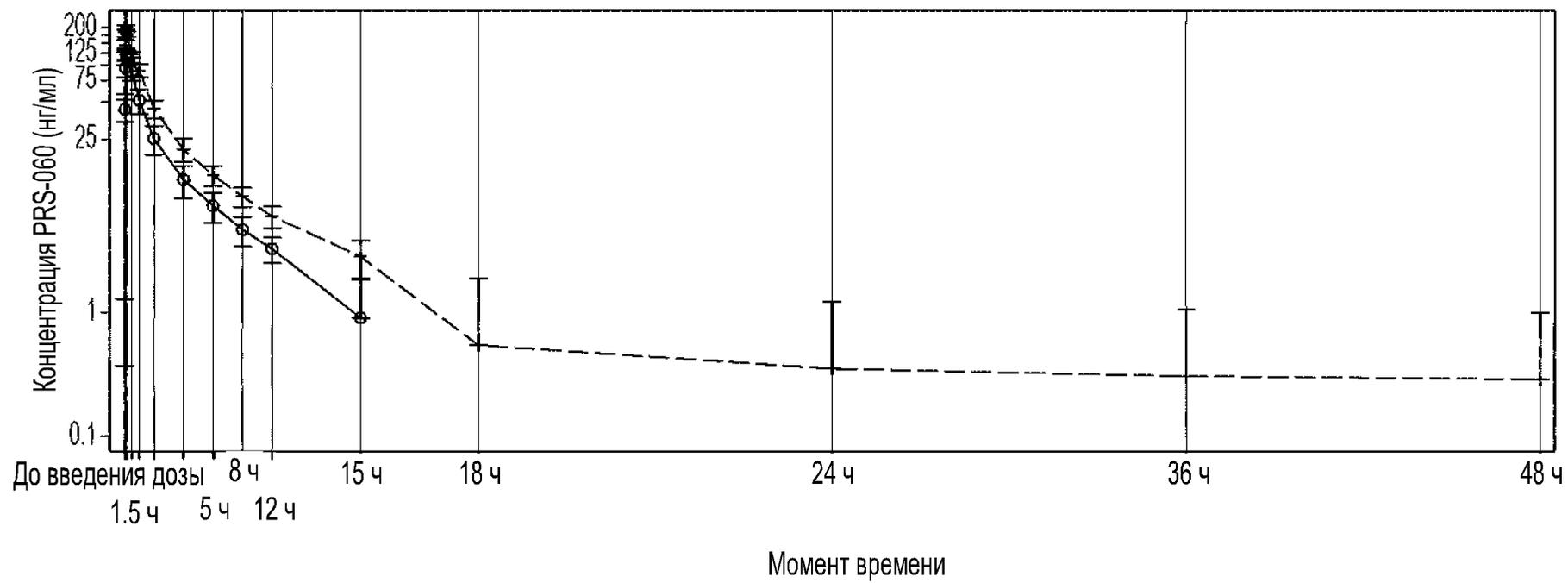


Фиг. 5



Когорта/доставляемая доза:
—○— Когорта 8/ 1 мг PRS-060
—+— Когорта 9/ 2 мг PRS-060

Фиг. 6

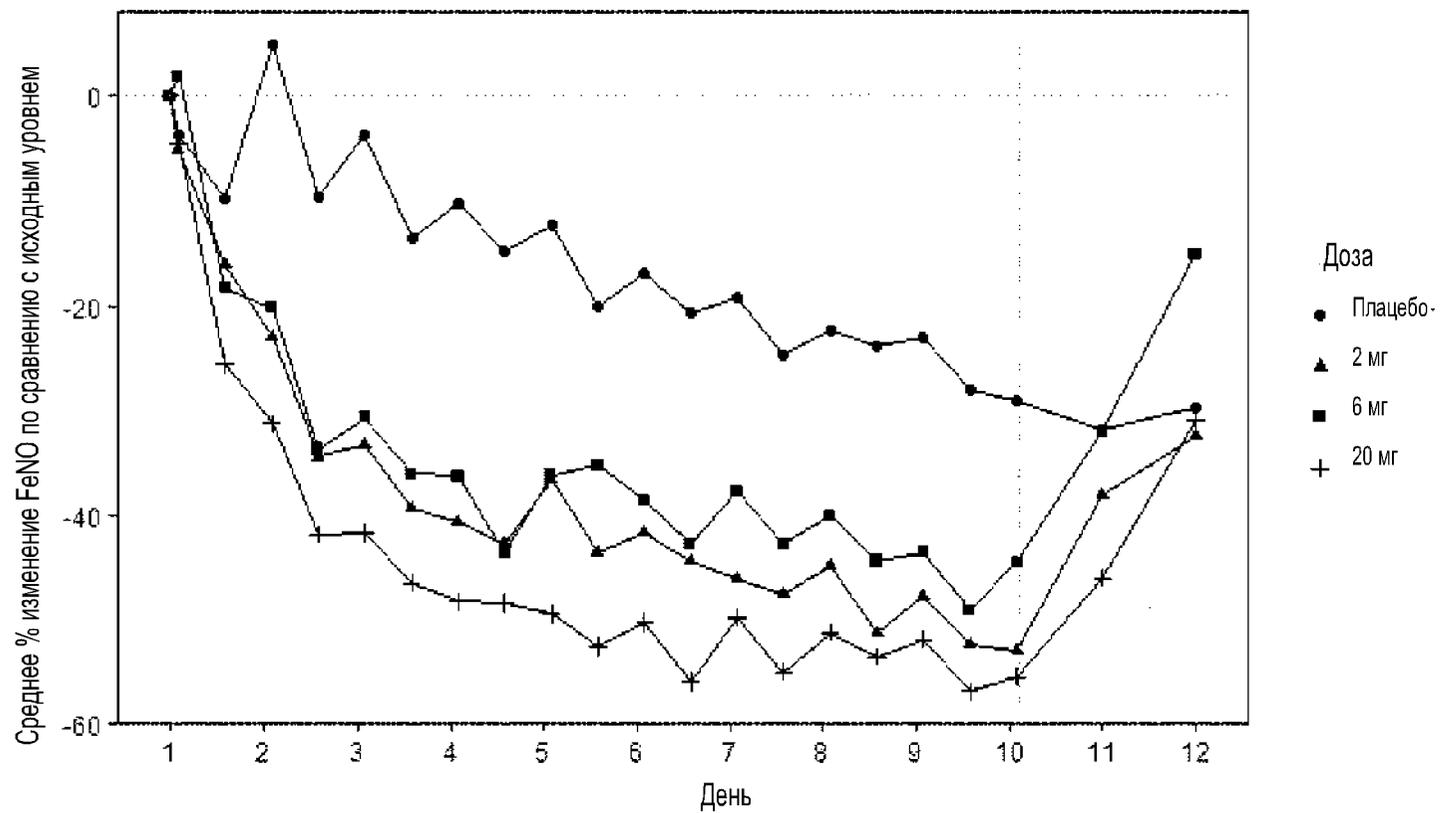


Когорта/доставляемая доза:

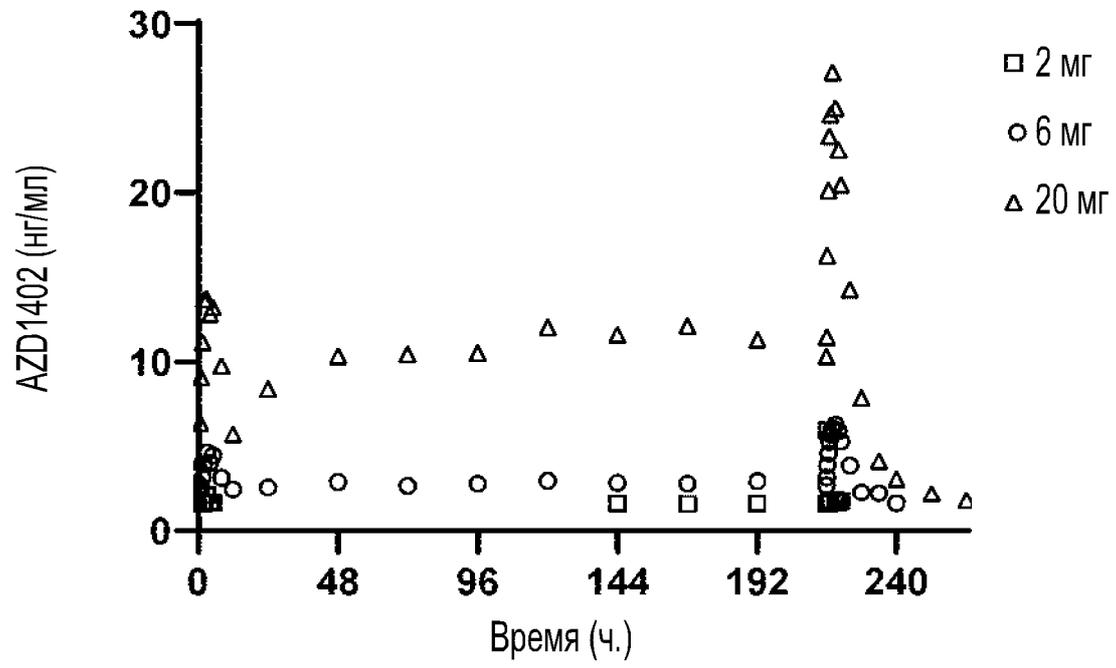
—○— Когорта 8/ 1 мг PRS-060

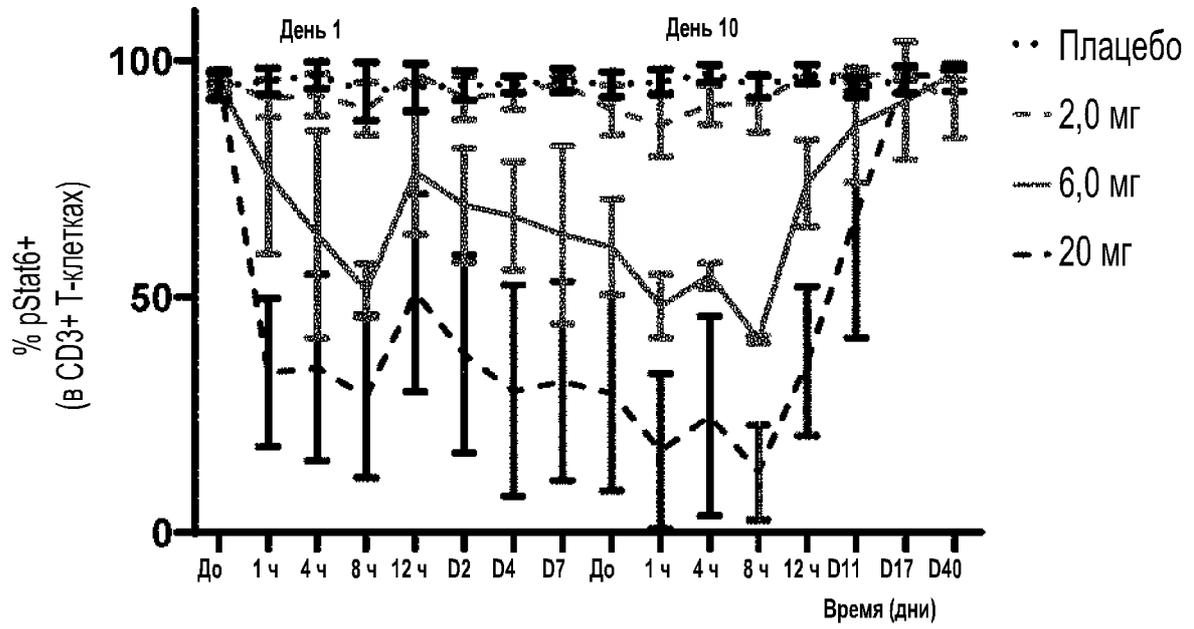
—+— Когорта 9/ 2 мг PRS-060

Фиг. 7

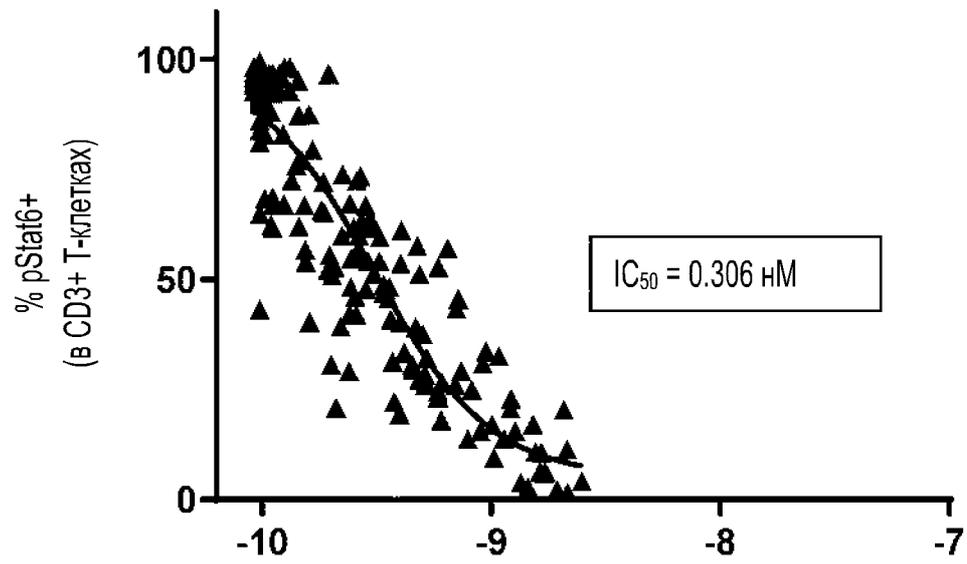


Фиг. 8

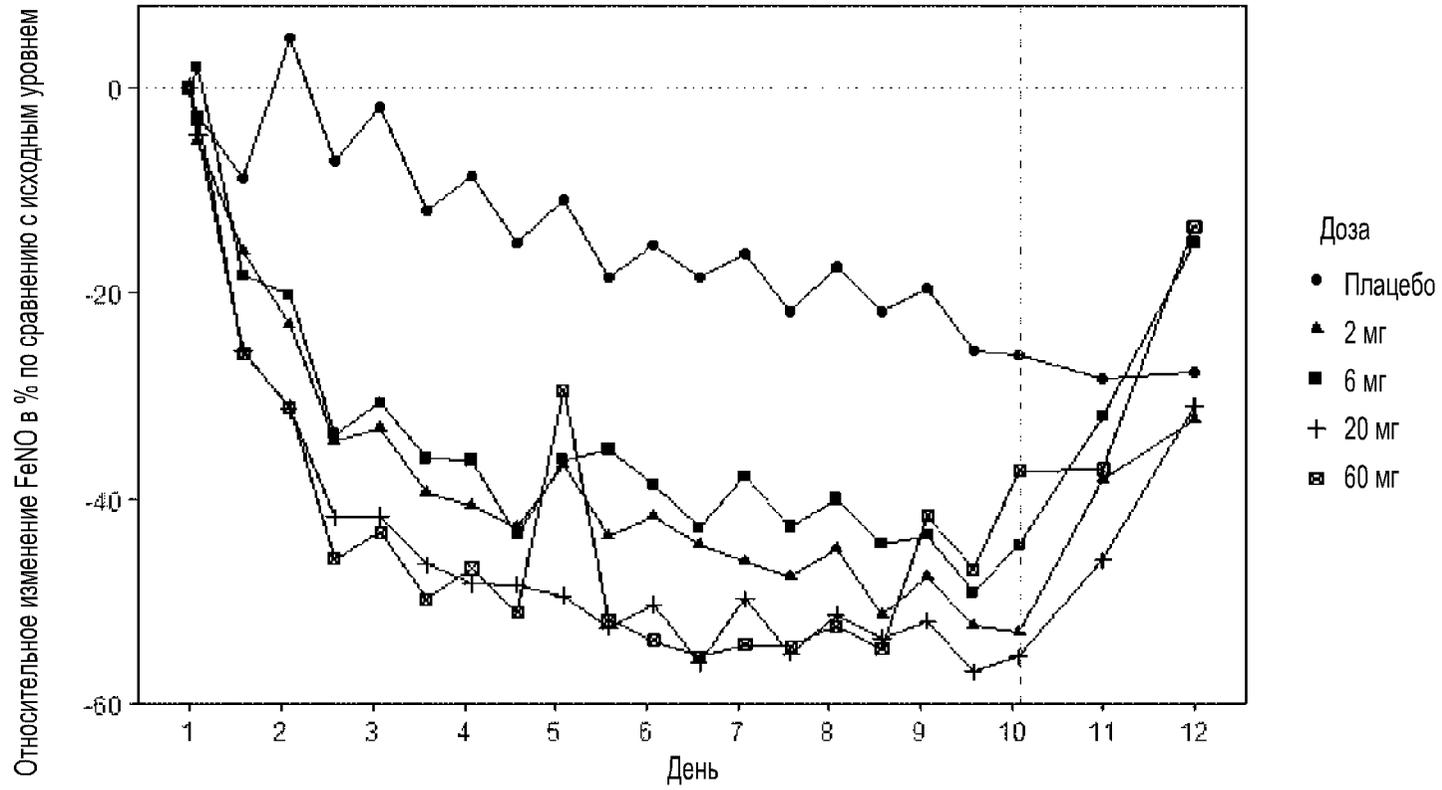




Фиг. 10

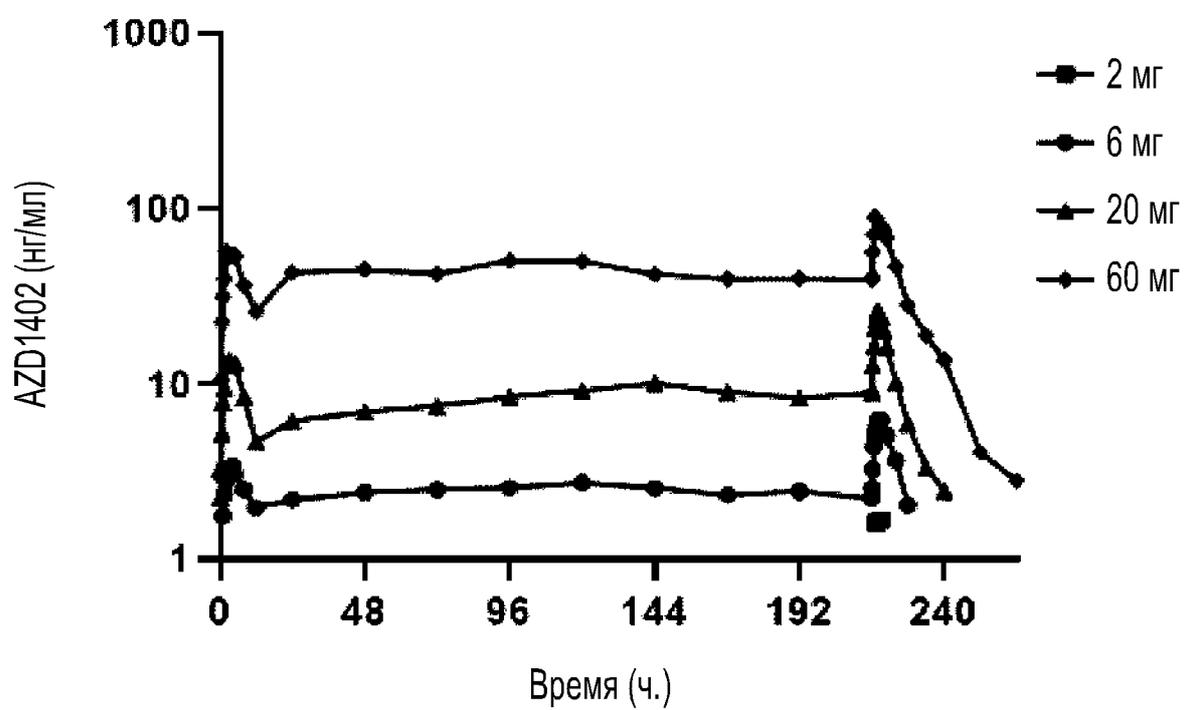
Ex vivo ингибирование pStat6

Фиг. 11

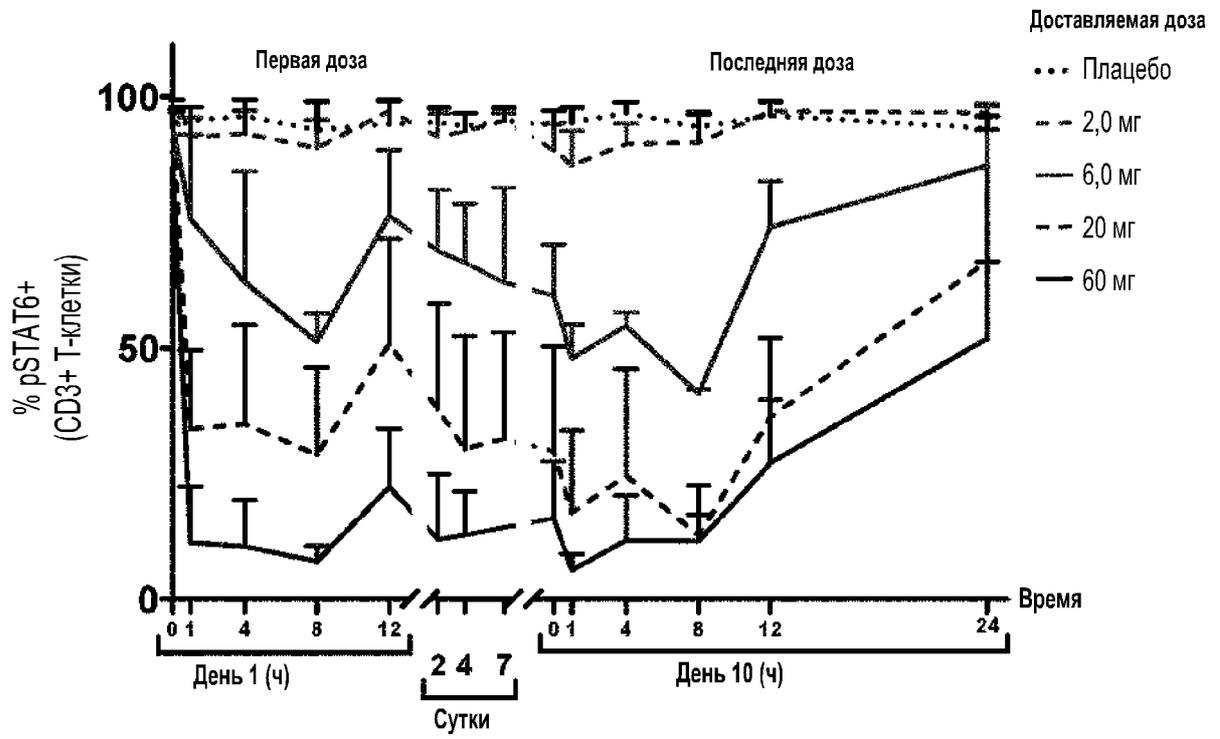


Фиг. 12

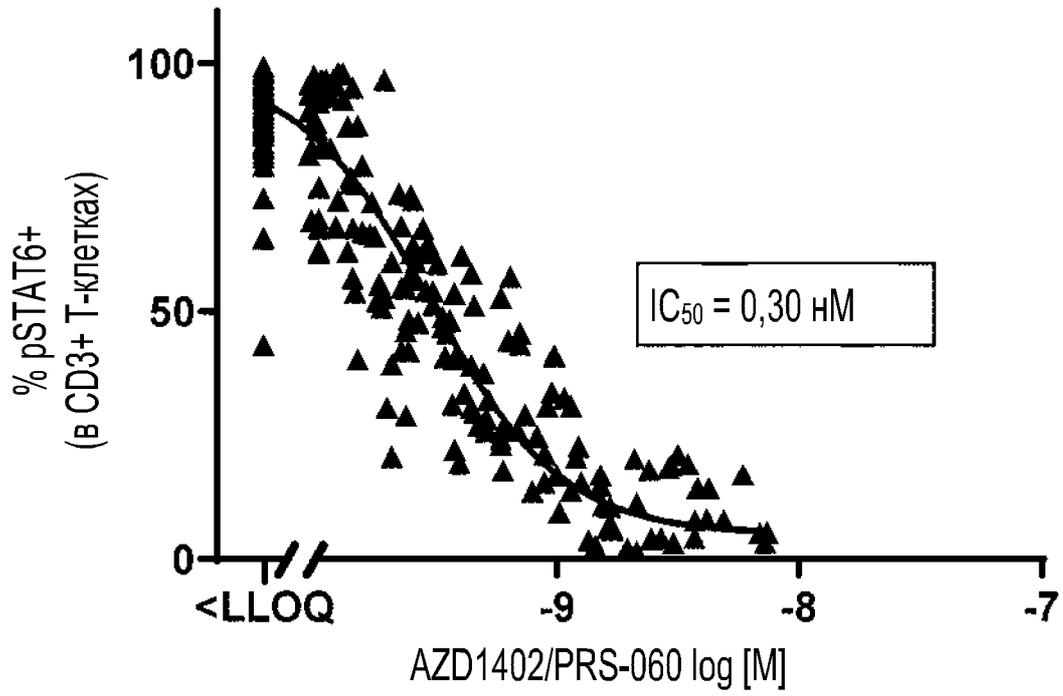
12/16



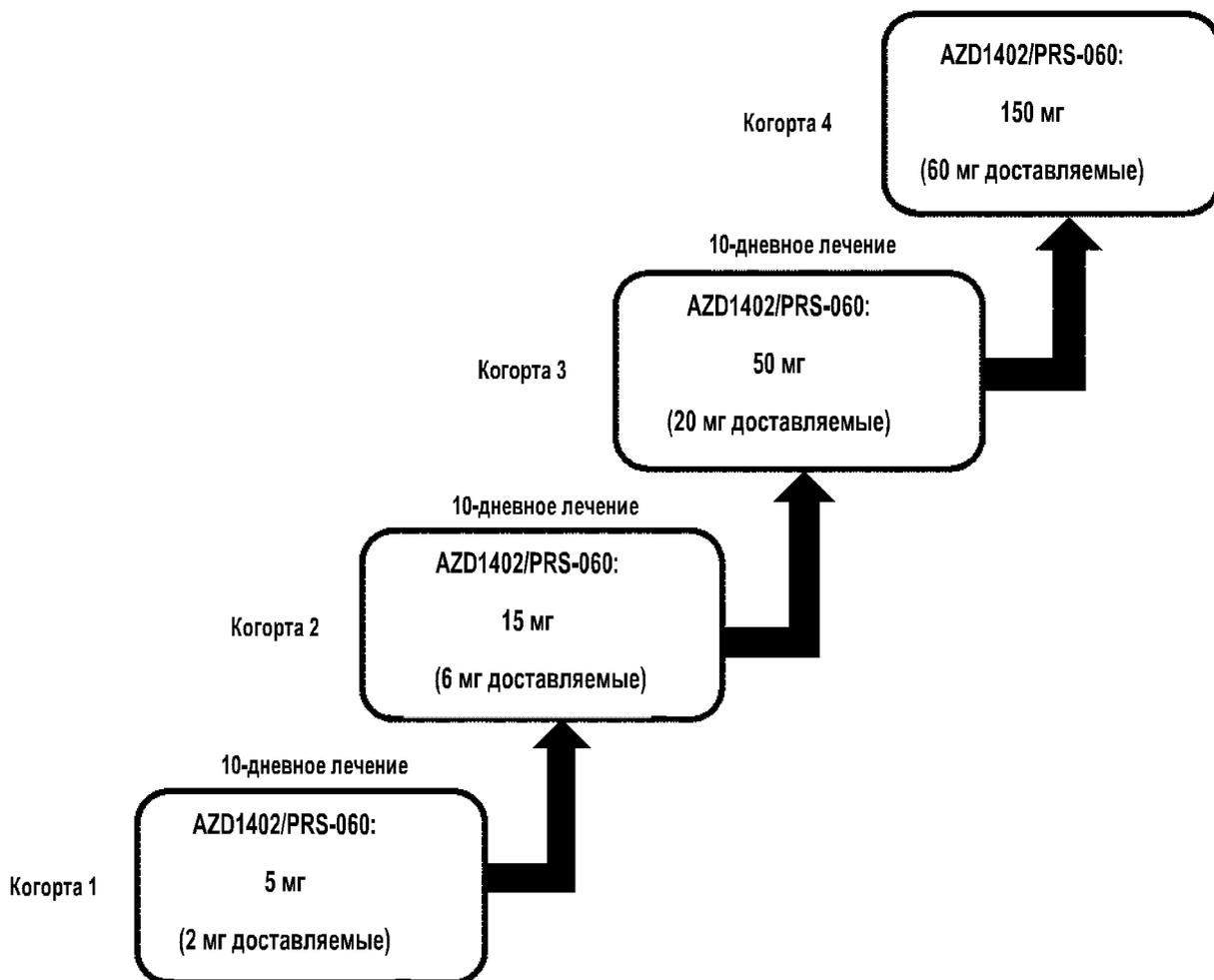
Фиг. 13



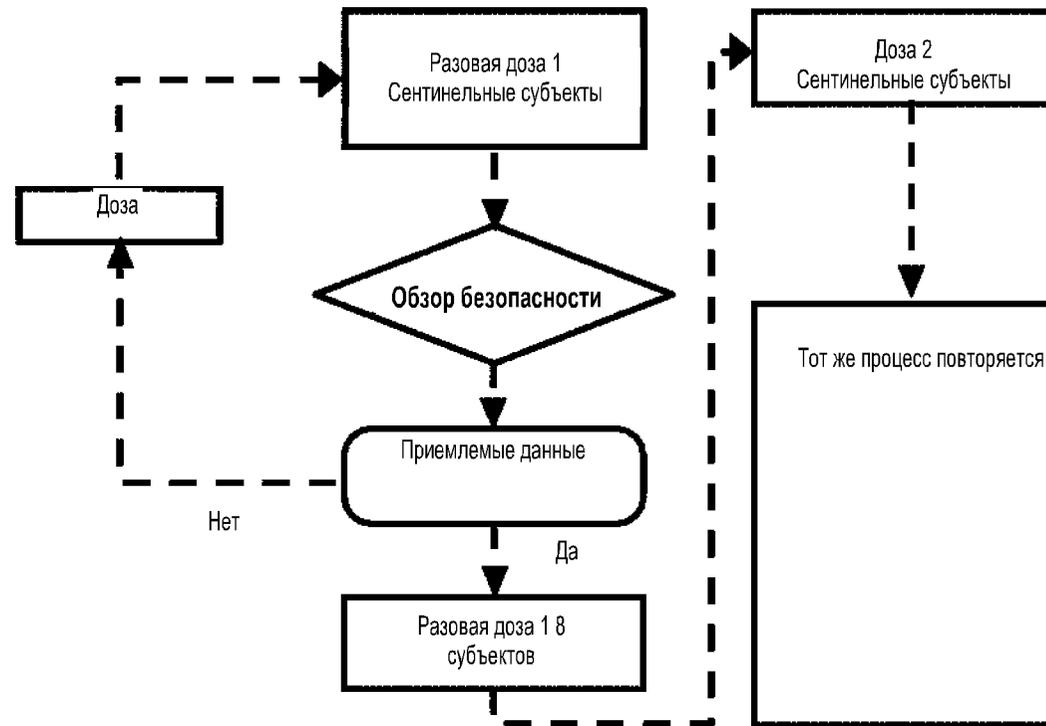
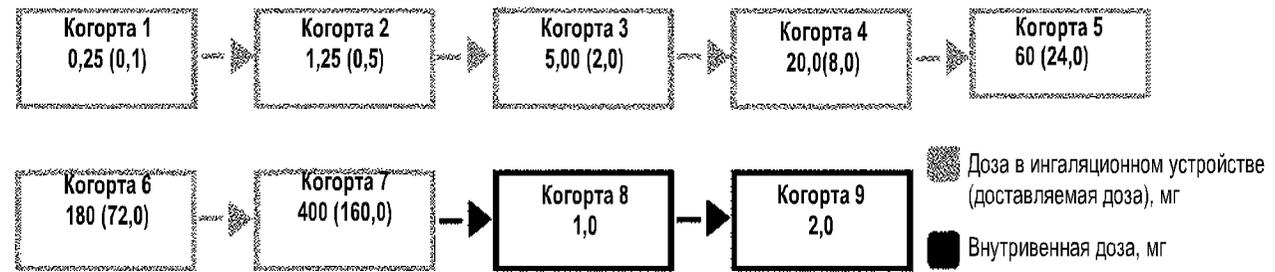
ФИГ. 14

Ex vivo ингибирование pSTAT6

Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17