

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042261**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.27

(21) Номер заявки
201990930

(22) Дата подачи заявки
2017.10.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ, КОМПОЗИЦИИ И РЕЖИМЫ ДОЗИРОВАНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ СВЯЗАННЫХ С ИНТЕРФЕРОНОМ-ГАММА ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 62/411,783

(32) 2016.10.24

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/IB2017/001427

(87) WO 2018/078442 2018.05.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВИММУН СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Де Мин Кристина, Ферлин Вальтер,
Де Бенедетти Фабрицио (CH)**

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

(56) M. B. JORDAN ET AL.: "How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis", BLOOD, vol. 118, no. 15, 13 October 2011 (2011-10-13), pages 4041-4052, XP055288710, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-03-278127, the whole document

Anonymous: "NCT01818492 on 2015_03_08: ClinicalTrials.gov Archive", 8 March 2015 (2015-03-08), XP055288703, Retrieved from the Internet: URL: https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01818492/2015_03_08 [retrieved on 2016-07-14], the whole document

Anonymous: "Public summary of opinion on orphan designation Recombinant human anti-interferon gamma monoclonal antibody for the treatment of haemophagocytic lymphohistiocytosis", EMA/COMP/164768/2010, 10 June 2010 (2010-06-10), XP055288704, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2010/06/WC500094019.pdf [retrieved on 2016-07-14], the whole document

WO-A2-2006109191

WO-A1-2016177913

(57) Изобретение относится, главным образом, к способам, композициям и режимам дозирования для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с повышенными уровнями IFN γ .

B1**042261****042261****B1**

Связанные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 62/411783, поданной 24 октября 2016 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, главным образом, к способам и композициям для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с повышенными уровнями интерферона гамма (IFN γ , IFN-гамма), такого как, например, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), геморрагическая лихорадка, последствия CART-клеточной терапии, недостаточность трансплантата, отторжение трансплантата, реакция трансплантат против хозяина (GvHD) и/или воспалительное заболевание, связанное с отторжением трансплантата. Изобретение также относится к способам и композициям для продления срока жизнеспособности трансплантированного биологического материала.

Предпосылки изобретения

Человеческий интерферон-гамма (IFN γ , IFN-гамма) представляет собой лимфокин, продуцируемый активированными Т-лимфоцитами и клетками - естественными киллерами. Он проявляет антипролиферативную и иммуномодулирующую активности, связывается с IFN γ -R, гетеродимерным рецептором на большинстве первичных клеток иммунной системы, и запускает каскад событий, приводящих к воспалению. Известно, что иммуномодулирующая активность IFN γ оказывает благоприятное воздействие при многих клинических состояниях. Однако, как известно, есть множество клинических состояний, при которых активность IFN γ приводит к пагубным последствиям. Например, аутоиммунные заболевания ассоциированы с высокими уровнями IFN γ в крови и пораженных болезнью тканях у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Также была показана связь активности IFN γ с такими болезненными состояниями, как кахексия и септический шок.

IFN γ вовлечен в целый ряд заболеваний; и были разработаны лекарственные препараты на основе анти-IFN γ средств.

Сущность изобретения

Различные аспекты изобретения относятся к схеме лечения с использованием многократных изменяющихся доз для лечения заболеваний, нарушений или состояний, связанных с повышенными уровнями IFN γ .

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения первичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у человека путем внутривенного введения индивиду первой дозы и второй дозы антитела, которое связывает интерферон гамма (IFN γ). Индивид является взрослым индивидом или индивидом-ребенком. Первая доза составляет 1,0 или 3,0 мг/кг массы тела индивида и вторая доза составляет 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела индивида. Необязательно, вводят третью дозу, составляющую 1,0 мг/кг массы тела индивида.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у индивида-ребенка путем внутривенного введения индивиду первой дозы и второй дозы антитела, которое связывает интерферон гамма (IFN γ). Первая доза составляет 6,0 мг/кг массы тела индивида и вторая доза составляет 3,0 мг/кг массы тела индивида. Необязательно, вводят третью дозу, составляющую 6,0 мг/кг массы тела индивида.

В следующем аспекте изобретение относится к способу лечения вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у взрослого индивида-человека путем внутривенного введения индивиду первой дозы и второй дозы антитела, которое связывает интерферон гамма (IFN γ). Первая доза составляет 3,0 мг/кг или 6,0 мг/кг массы тела индивида и вторая доза составляет не более 10 мг/кг массы тела индивида. Например, вторая доза составляет 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг. Необязательно, вводят третью дозу, составляющую менее 10,0 мг/кг массы тела индивида. Например, третья доза составляет 1,0, 3,0 или 6,0 мг/кг массы тела индивида.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения патологического состояния у индивида-человека путем внутривенного введения индивиду первой дозы и второй дозы антитела, которое связывает интерферон гамма (IFN γ). Индивид является взрослым индивидом или индивидом-ребенком. Состояние представляет собой отторжение трансплантата, такое как отторжение трансплантата солидного органа или острое отторжение трансплантата костного мозга. Состояние представляет собой реакцию трансплантат против хозяина, паранеопластическую мозжечковую дегенерацию, геморрагическую лихорадку, саркоидоз или приобретенную болезнь Стилла. Альтернативно, способ применяют для индивида после получения им CART-клеточной терапии. Первая доза составляет от 1,0 до 10 мг/кг массы тела индивида и вторая доза составляет от 1,0 до 10 мг/кг массы тела индивида. Например, вторая доза составляет 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг. Предпочтительно, вторая доза является более высокой или более низкой, чем первая доза. Необязательно, вводят третью дозу, составляющую от 1,0 до 10 мг/кг массы тела индивида. Например, первая, вторая или третья доза составляет 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела индивида.

Антитело, которое связывает интерферон гамма (IFN γ), содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY-YADSVKG (SEQ ID NO: 2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность EDNQRPS (SEQ ID NO: 5) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6). Например, антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

Дозу антитела вводят в течение 1, 6 или 12 ч.

Вторую дозу вводят в течение первого периода лечения раз в три дня после первой дозы. Кроме того, вторую дозу вводят в течение второго периода лечения после завершения первого периода лечения. В течение второго периода лечения дозу вводят, например, два раза в неделю.

Дозу антитела вводят однократной инъекцией.

Антитело вводят в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии.

Необязательно, способы по изобретению также включают введение дексаметазона непосредственно перед введением дозы антитела. Дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 10 мг/м² или по меньшей мере 5 мг/м².

Индивид ранее не получал лечение HLH.

В различных аспектах способ дополнительно включает введение по меньшей мере второго средства индивиду. Второе средство представляет собой терапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство.

В объем изобретения также входит инъекционный фармацевтический состав, содержащий в мл: 5 мг или 2,5 мг полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона гамма (IFN γ); 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет от 5,8 до 6,2.

В следующем аспекте изобретение относится к однодозовой ампуле, содержащей 20 мл подходящего для инъекции раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона гамма (IFN γ), при этом концентрация антитела составляет 5 мг/мл или 25 мг/мл и значение pH раствора составляет от 5,8 до 6,2. Антитело солюбилизовано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок.

В другом аспекте изобретение относится к однодозовой ампуле, содержащей 10 мл или 20 мл подходящего для инъекции раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона гамма (IFN γ), при этом концентрация антитела составляет 25 мг/мл, и значение pH раствора составляет от 5,8 до 6,2. Антитело солюбилизовано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок.

В другом аспекте изобретение относится к однодозовой ампуле, содержащей 2 мл или 10 мл подходящего для инъекции раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона гамма (IFN γ), при этом концентрация антитела составляет 5 мг/мл и значение pH раствора составляет от 5,8 до 6,2. Антитело солюбилизовано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок.

Антитело, которое связывает интерферон гамма (IFN γ), содержит: определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY-YADSVKG (SEQ ID NO: 2); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность EDNQRPS (SEQ ID NO: 5); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6). Например, антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, соответствующую

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

Любой из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления можно комбинировать с любым другим аспектом или вариантом осуществления.

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы при осуществлении на практике настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие литературные источники, упомянутые в настоящем документе, специально включены посредством ссылки в полном объеме. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры, описанные в настоящем документе, являются лишь иллюстративными и не должны быть ограничивающими.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из, и входят в объем, следующего далее подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведен график, демонстрирующий корреляцию между сывороточными уровнями CXCL9 до введения доз и общими уровнями IFN γ через 24 ч после инфузии антитела NI-0501 в текущем пилотном исследовании фазы 2 с участием пациентов, страдающих первичным HLH.

На фиг. 2 приведен график, демонстрирующий корреляцию между сывороточными уровнями CXCL9 и общими уровнями IFN γ до введения доз через 24 ч после инфузии антитела NI-0501 в текущем пилотном исследовании фазы 2 с участием пациентов, страдающих первичным HLH.

На фиг. 3А и 3В приведена серия графиков, демонстрирующих корреляцию между сывороточными уровнями CXCL9 и уровнями IFN γ у пациентов, страдающих синдромом активации макрофагов (MAS), вторичным по отношению к системному ювенильному идиопатическому артриту (sJIA), и у пациентов с активным sJIA.

На фиг. 4А-1, 4А-2, 4В-1, 4В-2, 4С-1, 4С-2, 4D-1 и 4D-2 приведена серия графиков, демонстрирующих корреляцию между уровнями IFN γ , а также сывороточными уровнями CXCL9, и клиническими показателями у пациентов с активным sJIA и MAS, вторичным по отношению к sJIA.

На фиг. 5 приведен график, демонстрирующий полную нейтрализацию IFN γ , о чем можно судить по не поддающимся обнаружению уровням индуцируемых IFN γ хемокинов.

На фиг. 6 приведен график, демонстрирующий ослабление активности HLH в процессе лечения NI-0501 (2 недели и окончание лечения): процентная доля пациентов с количеством тромбоцитов $>100 \times 10^9/\text{л}$, количеством нейтрофилов $>1 \times 10^9/\text{л}$, уровнем фибриногена $>1,5 \text{ г/л}$ и снижением уровня ферритина по меньшей мере на 25%.

На фиг. 7А и 7В приведена серия графиков, демонстрирующих корреляцию между уровнями CXCL9 до введения доз и общими уровнями IFN γ через 24 ч после инфузии NI-0501. На врезке, приведенной на фиг. 7В, показан пример индивидуального профиля IFN γ и CXCL9 в процессе лечения с использованием NI-0501.

На фиг. 8А, 8В, 8С и 8D приведена серия графиков, демонстрирующих сывороточные уровни IFN γ , а также CXCL9, CXCL10 и CXCL11 у отдельных пациентов, от которых были получены парные образцы во время активного MAS и во время активного sJIA без MAS в момент сбора образцов (акт. sJIA). Уровни значимости (p) определяли с использованием рангового критерия Уилкоксона для парных образцов.

На фиг. 9А и 9В приведена серия графиков, демонстрирующих изменения в количестве белых клеток крови (WBC) и тромбоцитов (PLT), а также уровнях ферритина (фиг. 9А), и изменения в сывороточных уровнях IFN γ , CXCL9, CXCL10 и CXCL11 (фиг. 9В) у одного пациента, перенесшего в ходе его sJIA 3 эпизода MAS.

На фиг. 10А, 10В, 10С, 10D, 10Е, 10F, 10G, 10H, 10I и 10J приведена серия графиков, демонстрирующих корреляцию уровней IFN γ и CXCL9 с уровнями ферритина, количеством нейтрофилов и тромбоцитов, а также с уровнями LDH и ALT у пациентов с активным MAS в момент сбора образцов (красные кружки) и у пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов (черные треугольники). Коэффициент корреляции Спирмена (Rs) и уровень значимости (p) для каждой корреляции приведены в табл. 3.

На фиг. 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е и 11F приведена серия графиков, демонстрирующих связь IFN γ с продуцированием CXCL9 и CXCL10 при MAS. Панель А: корреляция уровней IFN γ с уровнями CXCL9 и CXCL10 у пациентов с MAS в момент сбора образцов. Коэффициент корреляции Спирмена (Rs) и уровень значимости (p) для каждой корреляции приведены в табл. 3.

На фиг. 12 приведено схематическое изображение этапов скрининга, лечения и последующего наблюдения в исследованиях, описанных в примере 7.

На фиг. 13А и 13В приведены графики, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на температуру тела у двух пациентов, имеющих температуру тела $>37,5^\circ\text{C}$ в момент начала лечения с использованием NI-0501.

На фиг. 14 приведена серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество нейтрофилов у пациентов.

На фиг. 15 приведена серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество тромбоцитов у пациентов.

На фиг. 16 приведена серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на сывороточные уровни ферритина у пациентов.

На фиг. 17 приведена серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на постепенное снижение дозы глюкокортикоидов у пациентов.

На фиг. 18 приведен график, демонстрирующий, что введение NI-0510 обеспечивает нейтрализацию IFN γ до момента проведения ТГСК. Ответ HLH на введение NI-0501 также сохранялся до трансплантации.

На фиг. 19 приведено схематическое изображение этапов скрининга, лечения и последующего наблюдения в исследованиях, описанных в примере 8.

Подробное описание изобретения

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, используют полностью человеческое моноклональное антитело (мАт) IgG1 против интерферона-гамма (IFN γ), называемое в настоящем документе NI-0501, которое связывает и нейтрализует IFN γ . NI-0501 связывает растворимую и связанную с рецептором (IFN γ R1) формы IFN γ . Поскольку NI-0501 представляет собой IgG1 человека, оно сохраняет характеристики этого изотипа иммуноглобулинов, включая способность к связыванию Fc γ рецепторов и связыванию комплемента. IFN γ является одним из наиболее мощных и плеiotропных цитокинов иммунной системы. Он чрезвычайно важен для врожденного и приобретенного иммунитета против вирусных и внутриклеточных бактериальных инфекций. После связывания с его рецептором IFN γ действует, вызывая различные физиологические и клеточные ответы. Многочисленные исследования на протяжении последних 20 лет продемонстрировали связь IFN γ с патогенезом и поддержанием воспалительных заболеваний (см., например, Billiau A. "Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis", *Adv. Immunol.* 1996; 62:61-130; Schoenborn JR, Wilson CB. "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses", *Adv. Immunol.* 2007; 96:41-101; и Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chapgier A et al. "Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense", *Immunol. Rev.* 2008; 226:29-40. IFN γ продуцируется преимущественно клетками - естественными киллерами (NK) и Т-клетками - естественными киллерами (NKT) в виде части врожденного иммунного ответа, а также эффекторными CD4 Th1 клетками и CD8 цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) в процессе развития антиген-специфического иммунитета.

Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для лечения заболеваний, нарушений и состояний, связанных с повышенными уровнями IFN γ . Заболевания, нарушения и состояния, которые можно лечить или предотвращать с использованием композиций и способов по изобретению, включают например, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), реакцию трансплантат против хозяина, паранеопластическую мозжечковую дегенерацию, геморрагическую лихорадку, саркоидоз, приобретенную болезнь Стилла, недостаточность трансплантата, отторжение трансплантата и/или воспалительное заболевание, связанное с отторжением трансплантата. Отторжение трансплантата включает отторжение трансплантата солидного органа или острое отторжение трансплантата костного мозга. Кроме того, композиции и способы также полезны для лечения или облегчения побочного эффекта CART-клеточной терапии.

HLH представляет собой синдром, характеризующийся сильным нарушением или отсутствием цитотоксической функции NK и CD8⁺ Т-клеток с резкой активацией иммунной системы. HLH включает первичный (генетический/семейный) HLH и вторичный HLH, оба клинически характеризуются нарушением регуляции иммунной системы, приводящим к сильно выраженной гиперцитокинемии с пагубными последствиями для различных тканей и органов (Henter JJ, Elinder G, Soder O et al. "Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis", *Blood* 1991; 78: 2918-2922). HLH развивается как у взрослых, так и у детей.

Таблица 9. Классификация HLH

Первичный HLH	Семейный HLH (СЛГ)		
	Ген	Белок	Функция
	FLH-1	Неизвестен	Неизвестен
	FLH-2	PRF1	Перфорин
	FLH-3	UNC13D	Munc13-4
	FLH-4	STX11	Синтаксин 11
	FLH-5	STXBP2 (UNC18B)	Munc18-2
	Синдромы иммунодефицита		
	Ген	Белок	Функция
	CHS	LYST	Lyst
Вторичный HLH	GS-2	RAB27A	Rab27a
	XLP-1, XLP-2	SH2DIA, BIRC4	SAP, XIAP
	Инфекции		
	Ревматические заболевания (синдром активации макрофагов)		
	Метаболические заболевания		
	Злокачественные новообразования		

Первичный HLH представляет собой гетерогенное аутосомно-рецессивное заболевание. Первичный HLH в основном развивается в младенчестве и раннем детстве, с предполагаемой распространенностью в Европе 1/50000 живорожденных детей (Henter JI, Elinder G., Soder O., Ost A. Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Acta Paediatr. Scand. 1991; 80: 428-435). Заболевание является заведомо смертельным со средним сроком выживания менее 2 месяцев после появления симптомов, если не применять лечение (Janka GE. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Eur. J. Pediatr. 1983; 140: 221-230; и Arico M., Janka G, Fischer A, Henter JI, Blanche S., Elinder G., Martinetti M., Rusca MP Hemophagocytic lymphohistiocytosis Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. Leukemia. 1996 Feb; 10(2):197-203).

Нарушение цитотоксической функции, имеющее место при HLH, приводит к гиперцитокинемии и гемофагоцитозу. Это, в свою очередь, вызывает все типичные симптомы HLH (Dhote R., Simon J., Papo T. et al. Reactive hemophagocytic syndrome in adult systemic disease: report of twenty-six cases and literature review.

Arthritis Rheum. 2003; 49: 633-639; Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. Cancer 1979; 44: 993-1002; и Risdall RJ, Brunning RD, Hernandez JI, Gordon DH. Bacteria-associated hemophagocytic syndrome. Cancer 1984; 54: 2968-2972). Типичные симптомы HLH включают, например, длительную лихорадку, спленомегалию, гепатомегалию, цитопению, гиперферритинемию, гипертриглицеридемию, гипофибриногенемию, гемофагоцитоз, гиперцитокинемия и/или лимфогистиоцитарную инфильтрацию, гипоплазию костного мозга, менингеальную инфильтрацию.

Цитокины, уровень которых повышен у пациентов с HLH, включают: IFN γ , интерлейкин 6 (IL-6), IL-10, фактор некроза опухолей (TNF) α , IL-8, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

HLH также может иметь место в ходе инфекции, ревматического или неопластического заболевания, и в этом случае его называют вторичным HLH. Вторичный HLH имеет те же признаки и симптомы, что и первичная форма, и может быть в равной степени тяжелым. Современные методы лечения вторичного HLH направлены на устранение причины лежащего в основе заболевания. Это, безусловно, имеет место в случае HLH, вызванного такими инфекциями, как лейшманиоз. Следует отметить, что наличие некоторых инфекций, в частности, вирусных инфекций, таких как инфекции CMV или EBV, очень часто инициирует проявление первичных форм HLH. В пользу данного наблюдения также свидетельствует тот факт, что в животных моделях первичного HLH инфицирование вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) необходимо для развития заболевания (Jordan MB, Hildeman D., Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8⁺ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. Blood 2004; 104: 735-743; Pachlopnik SJ, Ho CH, Chretien F et al. Neutralization of IFN γ defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. EMBO Mol.Med. 2009; 1: 112-124; Kögl T., Müller J, Jessen B. et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. Blood. 2013; 121: 604-613 и Sepulveda FE, Debeume F., Menasché G. et al. Distinct severity of HLH in both human and murine mutants with complete loss of cytotoxic effector PRF1, RAB27A, and STX11 Blood. 2013; 121: 595-603).

Если HLH проявляется в процессе неопластического заболевания, в частности, гематологического злокачественного новообразования, часто тяжесть состояния пациента требует неотложного лечения HLH до того, как будет начато лечение, направленное на первопричинное заболевание.

Наличие признаков и симптомов HLH у пациентов, страдающих ревматическим заболеванием, таким как системный ювенильный идиопатический артрит (sJIA) и системная красная волчанка (СКВ),

ревматологи часто называют синдромом активации макрофагов (MAS), который может предшествовать проявлению самого ревматического заболевания. У большинства пациентов с MAS тесты показывают нарушение функции NK и перфорина, и у значительного числа пациентов наблюдаются полиморфизмы или гетерозиготные мутации в PRF1 и UNC13D. Хотя это чрезвычайно тяжелое и опасное для жизни состояние, как правило, оно разрешается, если начать адекватное лечение, состоящее в большинстве случаев из введения кортикостероидов и циклоспорина. Однако у примерно 15% пациентов с развившимся MAS заболевание может быть трудно контролируемым и может рассматриваться применение этопозиды (Minoia F., Davi S., Home AC et al. Clinical Features, Treatment, and Outcome of Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A Multinational, Multicenter Study of 362 Patients. *Arthritis & Rheumatism* 2014; 66: 3160-3169).

Хотя первичный HLH считается преимущественно детским заболеванием, HLH является состоянием, которое встречается и у взрослых, и новая поступающая информация указывает на то, что это может происходить чаще, чем считалось в прошлом. У большинства взрослых пациентов заболевание развивается при злокачественных новообразованиях (в основном в случае неходжкинских лимфом), инфекциях, аутовоспалительных или аутоиммунных заболеваниях и ятрогенных иммунодефицитах.

В настоящее время не существует одобренных терапевтических средств для лечения HLH. Однако эксперты в данной области разработали руководство для оказания медицинской помощи пациентам с HLH (Henter JI, Home AC, Arico M., Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S. Ladisch S., McClain K., Webb D., Winiarski J, and Janka Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Blood Cancer 2007; 48: 124-13.1; Henter JI, Samuelsson-Horne A, Arico M et al. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 2367-2373 и Jordan MB, Allen CE, Weitzman S., Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011; 118: 4041-4052).

Оказание медицинской помощи пациентам с первичным HLH в настоящее время включает следующие этапы (Henter et al., Blood Cancer 2007): (i) индукционная терапия в течение 8 недель сочетанием кортикостероидов и иммуносупрессивных лекарственных средств (например, этопозиды, CsA, алемтузумаба, глобулина против тимоцитов); (ii) поддерживающая терапия до проведения трансплантации и (iii) трансплантация для всех пациентов с выявленным генетическим дефицитом и, со временем, в очень тяжелых случаях HLH без связанных с заболеванием мутаций.

Основная цель индукционной терапии заключается в подавлении опасного для жизни воспалительного процесса, который характерен для HLH, позволяющем проводить трансплантацию для тех пациентов, которым она необходима (Home A, Janka G, Maarten ER et al. Haematopoietic stem cell transplantation in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 2005; 129: 622-630). Трансплантация является единственным методом лечения HLH, ассоциированного с высокopenетрантными генетическими мутациями (Henter et al., Blood 2002).

Несмотря на применение таких руководств, общий показатель смертности в случаях первичного HLH остается на уровне 40-50% (Henter et al., Blood 2002; Trottestam H, Home A, Arico M et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood* 2011; 118: 4577-4584).

Необходимость применения во время индукционного периода лекарственных средств, с которыми связаны тяжелые краткосрочные и долгосрочные осложнения, вносит дополнительный вклад в и без того высокую смертность. Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, разработаны в качестве направленной терапии с гарантированной эффективностью и меньшей токсичностью.

В последние годы было получено все возрастающее число доказательств ключевой роли IFN γ в развитии HLH (Henter JI, Elinder G, Soder O et al. Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1991; 78: 2918-2922; Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8 $^{+}$ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004; 104: 735-743; Pachlopnik SJ, Ho CH, Chretien F et al. Neutralization of IFN γ defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. *EMBO Mol. Med.* 2009; 1: 112-124; Behrens EM, Canna SW, Slade K et al. Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J. Clin. Invest* 2011; 121: 2264-2277; Xu XJ, Tang YM, Song H, MD, Yang SL, Xu WQ, Zhao N, Shi SW, Shen HP, Mao JQ, Zhang LY, and Pan BH, Diagnostic Accuracy of a Specific Cytokine Pattern in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children *J Pediatr* 2011 и Risma K., Jordan MB. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: updates and evolving concepts. *Curr. Opin. Pediatr.* 2012; 24: 9-15).

Все мутации генов, характерные для первичных форм HLH, затрагивают белки, вовлеченные в один и тот же процесс, в конечном итоге приводящий к нарушению цитотоксической активности. У пациентов с HLH первыми были обнаружены мутации перфорина.

Мыши с нокаутом гена перфорина (KO) считаются релевантной моделью заболевания человека. Действительно, у этих мышей после инфицирования LCMV развиваются все диагностические и многие из клинических и лабораторных характеристик человеческого заболевания, и без лечения эти животные погибают. Вследствие этого, KO мышей с дефицитом перфорина стали использовать для изучения патофизиологии HLH. HLH-подобная патология, которая развивается у этих животных, зависит от CD8 $^{+}$ T-

клеток и IFN γ , продуцируемого в ответ на стимуляцию антигеном.

Было показано, что при нейтрализации высоких циркулирующих уровней IFN γ за счет введения анти-IFN γ антител не только возвращались к прежнему состоянию аномальные клинические и лабораторные показатели, но и резко возрастали показатели выживаемости. Напротив, абляция любого другого цитокина никак не влияла на выживаемость (Jordan et al., Blood 2004; Pachlopnik et al., EMBO Mol. Med. 2009).

Две модели вторичного HLH были исследованы в контексте программы разработки NI-0501. В одной модели было использовано неоднократное введение CpG (вызывающее стимуляцию TLR9) для имитации хронической тяжелой гиперстимуляции у здоровых мышей (то есть, с нормальной генетикой цитотоксического пути) в качестве модели HLH, вторичного по отношению к инфекции. Хотя эти мыши не обязательно погибали, у них развивались типичные клинические и лабораторные признаки HLH. При нейтрализации IFN γ за счет введения анти-IFN γ антитела клинические и лабораторные показатели возвращались к норме. Интересно, что в данной модели было показано, что введение анти-IFN γ антитела приводит к полной нейтрализации эффектов IFN γ также и в соответствующих тканях-мишенях, таких как печень и селезенка (статья готовится к печати).

Для исследования патофизиологии вторичного HLH, имеющего место в контексте ревматических заболеваний, была создана животная модель с использованием трансгенных по гену IL-6 мышей, у которых IL-6 экспрессируется на высоком уровне, аналогично тому, что происходит у пациентов с sJIA, ревматическим заболеванием, наиболее часто ассоциированным со вторичными формами HLH. При стимуляции лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR) эти мыши погибают, проявляя многие из признаков человеческого заболевания (Strippoli R., Carvallo F., Scianaro R, et al. Amplification of the response to Toll-like receptor ligands by prolonged exposure to interleukin-6 in mice: Implication for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. Arthritis & Rheumatism 2012; 64: 1680-1688). У этих мышей при нейтрализации IFN γ за счет введения анти-IFN γ антитела показатели выживаемости резко улучшаются и лабораторные показатели возвращаются к норме (Prencipe G. et al., статья готовится к печати).

Дополнительными доказательствами важности IFN γ при HLH являются высокие концентрации циркулирующего IFN γ у пациентов с первичным HLH (Henter et al., Blood 1991; Xu et al., J Pediatr 2011). В группе из 71 пациента, которых контролировали от момента диагностирования HLH до лечения и последующего наблюдения, уровни IFN γ превышали верхнюю границу нормальных значений (17,3 пг/мл) у всех пациентов и, в частности, 53,5% пациентов имели уровни, превышающие 1000 пг/мл. Также сообщалось, что уровни IFN γ повышаются сразу и быстро, и могут снижаться от >5000 пг/мл до нормальных значений в течение 48 ч при эффективном лечении HLH.

Совсем недавно при обсервационном исследовании пациентов со вторичными формами HLH высокие уровни IFN γ были обнаружены как у пациентов с HLH, возникающим вследствие инфекций, так и у пациентов с HLH, возникающим в контексте sJIA. Уровни CXCL9, CXCL10 и CXCL11, трех хемокинов, которые, как известно, индуцируются IFN γ , также были значительно повышены. Следует отметить, что уровни IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов, как установлено, значительно коррелировали с лабораторными показателями тяжести заболевания, такими как уровень ферритина, количество тромбоцитов и уровень трансаминаз (Bragaglia et al., статья представлена для опубликования).

Поскольку гиперцитокинемия и инфильтрация органов активированными лимфоцитами и гистиоцитами несут ответственность за все симптомы HLH и зависят от гиперактивности CD8⁺ Т-клеток и высоких уровней IFN γ , нейтрализация IFN γ является рациональным терапевтическим подходом. Действительно, в настоящее время не существует средств, специфически нацеленных на CD8⁺ Т-клетки, и нацеливание средств на отдельные цитокины, зависимые от IFN γ , возможно, будет неосуществимым.

Таким образом, на основании данных, полученных с использованием животных моделей первичного и вторичного HLH, а также на основании результатов наблюдения пациентов как с первичным, так и со вторичным HLH, подтверждающих важную роль IFN γ в патогенезе данного заболевания, нейтрализация IFN γ представляется надежным основанием для разработки направленной терапии для HLH, которая должна быть эффективной и не сопровождаться, или сопровождаться ограниченной, токсичностью.

Настоящее изобретение также относится к композициям и способам, которые полезны для идентификации или уточнения популяции пациентов, страдающих заболеванием, при этом пациенты имеют повышенный уровень CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более дополнительными связанными с интерфероном γ (IFN γ) биомаркерами. В частности, по изобретению предложены композиции и способы для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ при гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе (HLH), при вторичном HLH и/или при синдроме активации макрофагов (MAS).

Множество доказательств, полученных в моделях на животных, указывают на ключевую патогенную роль IFN γ в первичном гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе (HLH). Высокие уровни IFN γ также обнаружены у людей, страдающих HLH. Ранее сообщалось о том, что высокие уровни IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов, CXCL9, CXCL10 и CXCL11, наблюдались у пациентов с активным MAS,

формой вторичного HLH, которая развивается в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (sJIA) (смотри, например, Bracaglia C., Caiello I, De Graaf K., et al. *Pediatric Rheumatology* 2014, 12 (Suppl 1): 03). Результаты, полученные на мышах, косвенно указывают на то, что IFN γ преимущественно продуцируется в периферических тканях, и концентрации в крови могут быть относительно низкими.

Термин "синдром активации макрофагов (MAS)" означает тяжелое потенциально смертельное осложнение хронических воспалительных ревматических заболеваний. Как правило, он возникает в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (sJIA), у 10-20% пациентов развивается данный синдром в ходе заболевания. Он также может иметь место, хотя более редко, при системной красной волчанке, болезни Кавасаки, а также при других аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях. При sJIA MAS, как правило, возникает во время активных стадий заболевания, включая начало заболевания. Инфекционный триггер можно идентифицировать у большей части пациентов. Типичные признаки MAS включают лихорадку, спленомегалию, кровотечения и признаки нарушения работы печени, центральной нервной системы и почек, что может приводить к полиорганной недостаточности. Аномалии лабораторных показателей включают уменьшение количества белых клеток крови, тромбоцитов и гемоглобина, гипертрансаминаземию, заметное повышение уровня ферритина и свидетельства внутрисосудистой активации системы свертывания крови (Ravelli, A., et al., *Macrophage activation syndrome as part of systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, genetics, pathophysiology and treatment. Genes Immun.* 13(4): p. 289-98). MAS приводит к серьезным осложнениям и смерти, являясь причиной существенной части смертных случаев вследствие sJIA (Minoia, F., et al., *Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients. Arthritis Rheumatol.* 2014. 66(11): p. 3160-9; Hashkes, P.J., et al., *Mortality outcomes in pediatric rheumatology in the US. Arthritis Rheum.* 2010. 62(2): p. 599-608). Лучшее понимание патогенеза заболевания, с последующей идентификацией новых терапевтических мишеней, и возможная разработка методов направленной терапии может привести к существенному улучшению контроля заболевания и исхода MAS.

Большинство клинических признаков и аномалий лабораторных показателей при MAS являются такими же, как в случае гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) и, действительно, его в настоящее время относят к категории вторичного или реактивного HLH (втор-HLH) (Jordan, M.B., et al., *How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood.* 2011. 118(15): p. 4041-52). Первичные формы HLH (п-HLH) вызваны мутациями генов, кодирующих белки, вовлеченные в экзоцитоз гранул, включая PRF1, UNC13D, STXBP2, STX11, RAB27A и XIAP, что, как правило, приводит к дефектной цитотоксической активности CD8 $^{+}$ лимфоцитов и NK-клеток. В соответствии с современной классификацией, в отсутствие поддающейся определению генетической причины и/или семейной наследственности, HLH классифицируют как вторичный или реактивный. Втор-HLH может возникать в отсутствие очевидного триггера или в контексте инфекции, злокачественных новообразований или ревматических заболеваний, в последнем случае его обычно называют MAS. Генетическая основа для развития MAS постепенно становится более понятной, при этом результаты целого ряда исследований указывают на связь MAS и, в целом, втор-HLH, с гетерозиготностью для низкопенетрантных вариантов или мутациями тех же генов, что и в случае развития п-HLH (Kaufman K.M., et al., *Whole-exome sequencing reveals overlap between macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis and familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Arthritis Rheumatol.* 2014, 66(12): p. 3486-95; Vastert, S.J., et al., *Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. Rheumatology (Oxford).* 2010. 49(3): p. 441-9; Zhang K., et al., *Macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis is associated with MUNC13-4 polymorphisms. Arthritis Rheum.* 2008. 58(9): p. 2892-6; и Zhang M., et al., *Genetic defects in cytotoxicity in macrophage activation syndrome. Curr Rheumatol Rep.* 2014. 16(9): p. 439; и Bracaglia C., Sieni E., Da Ros M, et al. *Mutations of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) related genes and abnormalities of cytotoxicity function tests in patients with macrophage activation syndrome (MAS) occurring in systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA). Pediatric Rheumatology* 2014, 12 (Suppl 1): P53). Это сходство генетической основы в случае п-HLH и MAS дополнительно свидетельствует в пользу общего патогенного механизма.

Результаты исследований пациентов, страдающих п-HLH, а также мышиных моделей п-HLH подтверждают гипотезу о том, что дефектная цитотоксическая активность и аномалии взаимодействия антигенпредставляющих клеток (АПК)-CD8 $^{+}$ Т-клеток приводят к дефектам затухания иммунного ответа и аномальной активации Т-клеток. Результатом этого является неконтролируемая иммунная активация и продуцирование провоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами и макрофагами, приводящее к повреждению органов. Результаты исследований на животных моделях п-HLH, проводимых с использованием мышей с дефицитом перфорины и Rab27, указывают на важную роль интерферона-гамма (IFN γ), продуцируемого активированными CD8 $^{+}$ Т-клетками. У мышей с дефицитом перфорины нейтрализация IFN γ позволяет животным выживать при этом, как правило, летальном синдроме, с возвращением к норме аномальных биохимических и гематологических показателей (Jordan, M.B., et al., *An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8 $^{+}$ T cells and interferon gamma are essential for the disorder.*

Blood, 2004. 104(3): p. 735-43; Pachlopnik Schmid, J., et al., Neutralization of IFN γ defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. *EMBO Mol Med*, 2009. 1(2): p. 112-24). У мышей с дефицитом Rab27, у которых заболевание не приводит к гибели, нейтрализация IFN γ вызывает заметное улучшение состояния периферических органов, включая центральную нервную систему (Pachlopnik 2009). Высокие уровни циркулирующего IFN γ также обнаружены у пациентов с HLH, диагностированном в соответствии с руководством по диагностике HLH 2004 г. (My, L.T., et al., Comprehensive analyses and characterization of haemophagocytic lymphohistiocytosis in Vietnamese children. *Br J Haematol*, 2010. 148(2): p. 301-10; Takada H., et al., Increased serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and monokine induced by gamma interferon in patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Exp Immunol*, 2003. 133(3): p. 448-53; Tang Y., et al., Early diagnostic and prognostic significance of a specific Th1/Th2 cytokine pattern in children with haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol*, 2008. 143(1): p. 84-91; Xu X.J., et al., Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J Pediatr*, 2012. 160(6): p. 984-90 e1) и, следовательно, не обязательно на основании наличия генетической мутации. Следует отметить, что эти исследования включали значительную, хотя и вариабельную, часть пациентов без очевидной генетической причины заболевания (там же).

Исследования, описанные в настоящем документе, были разработаны для оценки корреляции сыровоточных уровней IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов между собой и с лабораторными показателями активности заболевания у пациентов с активным MAS в поисках биомаркера *in vivo* продуцирования IFN γ . В частности, циркулирующие уровни IFN γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 были измерены у пациентов с sJIA, при этом примерно 37% (20 из 54) пациентов имели MAS в момент сбора образцов. Также оценивали связь циркулирующих уровней с показателями активности заболевания и, кроме того, корреляции уровней IFN γ с уровнями CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В некоторых вариантах осуществления биомаркером является общий уровень IFN γ , который полезен в качестве фармакодинамического биомаркера.

Как описано в настоящем документе, уровни IFN γ и 3 связанных с IFN γ хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 были значительно повышены при активном MAS по сравнению с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов. При активном MAS лабораторные показатели тяжести заболевания, такие как уровни ферритина, нейтрофилов, тромбоцитов, аланинаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы, существенно коррелировали с уровнями IFN γ и CXCL9, и в меньшей степени с уровнями CXCL10 и CXCL11; не была обнаружена корреляция с уровнями IL-6. У пациентов с активным sJIA без MAS существенная корреляция между лабораторными показателями и уровнями цитокинов отсутствовала. При активном MAS уровни IFN γ существенно коррелировали с уровнями CXCL9, в меньшей степени с уровнями CXCL10, но не с уровнями CXCL11.

Высокие уровни IFN γ и CXCL9, наблюдаемые у пациентов с активным MAS, существенно коррелировали с лабораторными показателями тяжести заболевания. У пациентов с активным MAS уровни IFN γ и CXCL9 сильно коррелировали. Поскольку было показано, что CXCL9 индуцируется только IFN γ , но не другими интерферонами (см., например, Groom J.R. and Luster A.D. *Immunol Cell Biol* 2011, Feb; 89(2):207-15), результаты, раскрытые в настоящем документе, показывают, что CXCL9 является биомаркером продуцирования IFN γ при MAS.

Исследования, описанные в настоящем документе, также показали, что уровни IFN γ и хемокина (мотив C-X-C) лиганда 9 (CXCL9), CXCL10 и CXCL11, трех хемокинов, которые, как известно, индуцируются IFN γ , повышены у пациентов с MAS, осложнением sJIA, но не у пациентов с активным sJIA без MAS. Кроме того, у этих пациентов уровни IFN γ , CXCL9, CXCL10 и CXCL11 коррелировали с лабораторными показателями тяжести заболевания.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, в которых используют нейтрализующее анти-IFN γ антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с недостаточностью трансплантата, отторжением трансплантата, и/или воспалительного заболевания, связанного с отторжением трансплантата, таким как отторжение трансплантата солидного органа или острое отторжение трансплантата костного мозга. Изобретение относится к композициям и способам, в которых используют нейтрализующее анти-IFN γ антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, для лечения, подавления, отсрочки прогрессирования или иного облегчения симптома реакции трансплантат против хозяина (GvHD) у индивида, который получил или получает трансплантат, содержащий биологический материал, или серию трансплантатов, содержащих биологический материал.

Изобретение относится к композициям и способам, в которых используют нейтрализующее анти-IFN γ антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, для продления срока жизнеспособности трансплантированного биологического материала. Изобретение относится к композициям и способам, в которых используют нейтрализующее анти-IFN γ антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с паранеопластической мозжечковой дегенерацией, геморрагической лихорадкой, саркоидозом, приобре-

тенной болезнью Стилла или CART-клеточной терапией.

Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны в случае трансплантации какого-либо биологического материала, включая, например, клетки, ткань(и), костный мозг и/или орган(ы), в том числе, в качестве неограничивающего примера, сердце, почку, поджелудочную железу, печень и/или кишечник. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой аллогенный биологический материал. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой костный мозг. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой популяцию гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой, или получен из одного или более гепатоцитов.

При использовании композиций и способов, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с недостаточностью трансплантата, отторжением трансплантата, и/или воспалительного заболевания, связанного с отторжением трансплантата. В некоторых вариантах осуществления отторжение трансплантата, также называемое в настоящем документе недостаточностью трансплантата, является острым. В некоторых вариантах осуществления отторжение трансплантата является сверхострым.

Нейтрализующие анти-IFN γ антитела по изобретению содержат, например, определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи, приведенные ниже в табл. 1A, CDR легкой цепи, приведенные в табл. 1B, и их сочетания. Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR), определенные в соответствии с Chothia et al. 1989, E.A. Rabat et al., 1991, выделены подчеркиванием и курсивом ниже (См. Chothia C, et al., Nature 342: 877-883 (1989); Rabat, EA, et al., Sequences of Protein of immunological interest, пятое издание, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

Таблица 1A. Последовательности VH CDR из клонов антител, которые связывают и нейтрализуют IFN γ

Название клона	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
NI-0501	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:3)
AC1.2R3P2_A6	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:3)
AC1R3P2_B4	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DHSSGWYVISGMDV (SEQ ID NO:9)
AD14R4P1_B9	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DLTVGGPWYFYDY (SEQ ID NO:11)
AD14R4P2_C9	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO:14)
AC1.4R4P2_C10	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:3)
AC1.2R3P7_D3	SNAMS (SEQ ID NO:20)	TLTGSGGTAYYADSVKG (SEQ ID NO:21)	GTELVGGLDN (SEQ ID NO:22)
AD1R2P2_D6	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO:14)
AC1.2R3P2_D8	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:3)
AD1.3R3P6_E1	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	RSFDSGGSFEY (SEQ ID NO:28)
AD1.3R3P5_F8	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	VGSWYLEDFDI (SEQ ID NO:31)
AD1.3R3P6_F9	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	GGNYGDYFDYFDY (SEQ ID NO:34)
AD14R4P2_G7	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO:14)
AD1.1R3P3_G9	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DFWVITSGNDY (SEQ ID NO:39)
AD1.3R3P6_G10	SYAMS (SEQ ID NO:1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO:14)

Таблица 1В. Последовательности VL CDR из клонов антител, которые связывают и нейтрализуют IFN γ

Название клона	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
NI-0501	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:4)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:6)
AD1.2R3P2_A6	TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:7)	EDNRRPS (SEQ ID NO:8)	QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:6)
AD1R3P2_B4	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:4)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSNDSNVV (SEQ ID NO:10)
AD14R4F1_B9	TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:7)	DDQRP (SEQ ID NO: 12)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO:13)
AD14R4P2_C9	TRSGSIGSYVQ (SEQ ID NO:15)	DDKRP (SEQ ID NO:16)	QSYDSNNLVV (SEQ ID NO:17)
AD1.4R4P2_C10	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:18)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO:19)
AD1.2R3P7_D3	TGSGGSIATNYVQ (SEQ ID NO:23)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO:24)
AD1R2P2_D6	TGSGGSIASNYVQ (SEQ ID NO:25)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26)
AD1.2R3P2_D8	TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:7)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO:27)
AD1.3R3P6_E1	TRSSGYIASSYVQ (SEQ ID NO:105)	EDDRPS (SEQ ID NO:29)	QSYDTPVW (SEQ ID NO:30)
AD1.3R3P5_F8	TRSSGSIASNYVH (SEQ ID NO:32)	EDNRRPS (SEQ ID NO:8)	QSDTTYHGGV (SEQ ID NO:33)
AD1.3R3P6_F9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:4)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYEGF (SEQ ID NO:35)
AD14R4P2_G7	TGRNGIASNYVQ (SEQ ID NO:36)	EDTQRP (SEQ ID NO: 37)	QSDSNRVL (SEQ ID NO:38)
AD1.1R3P3_G9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:4)	EDNRRPS (SEQ ID NO:8)	QSFDTNLV (SEQ ID NO:40)
AD1.3R3P6_G10	AGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:41)	EDNQRPS (SEQ ID NO:5)	QSYSYNNQV (SEQ ID NO:42)

Иллюстративные антитела по изобретению включают, например, анти-IFN γ антитела, описанные в РСТ публикации № WO 2006/109191, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Иллюстративные антитела по изобретению включают, например, антитело, называемое в настоящем документе NI-0501, которое связывает человеческий IFN γ . Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) антитела NI-0501 приведены ниже, при этом последовательности CDR подчеркнуты в аминокислотных последовательностях VH и VL:

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NI-0501:

GAGGTGACAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTACGTACACACTGGTTCGACCC
CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCT
ACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCT
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT
CTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTGCA

CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAATAG (SEQ ID NO:43)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NI-0501:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPPWGQGLTVTVSS
ASTKGSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи NI-0501:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT
CTCCTGCATCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAACAGCGCCCG
GGCAGTTCCCCACCACTGTCTATGAGGATAACAGAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAATTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGAAGACTGA
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATGGCAGCAATCGTTGGATGTTCCGCGGAGGG
ACCAAGCTGACCGTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT
CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC
CGTGACAGTGGCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAACACACC
TCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGGA
AGTCCACAGAAGCTACAGTGCAGGTACGCATGAAGGAGCACCCTGGAGAAGACAGTGGC
CCCTACAGAATGTTCTATAG (SEQ ID NO:45)

Аминокислотная последовательность легкой цепи NI-0501:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDGSNRWTFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTP
EQWKSHRSYSCQVTNEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:46)

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи NI-0501:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPPWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:47)

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи NI-0501:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDGSNRWTFGGGKLTVL (SEQ ID
NO:48)

Соответствующие анти-IFN γ антитела включают антитела, описанные в патенте США 7700098, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Некоторые иллюстративные антитела включают антитела, названные в указанном документе ARC1.2R3P2_A6 ("A6"), ARC1.2R3P2_B4 ("B4"), ARC1.2R3P2_B9 ("B9"), ARC1.2R3P2_C9 ("C9"), ARC1.2R3P2_C10 ("C10"), ARC1.2R3P2_D3 ("D3"), ARC1.2R3P2_D6 ("D6"), ARC1.2R3P2_D8 ("D8"), ARC1.2R3P2_E1 ("E1"), ARC1.2R3P2_F8 ("F8"), ARC1.2R3P2_F9 ("F9"), ARC1.2R3P2_G7 ("G7"), ARC1.2R3P2_G9 ("G9") и ARC1.2R3P2_G10 ("G10").

Последовательности этих антител приведены ниже.

Нуклеотидная последовательность A6 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC
 GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCGGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID
 NO:49)

Аминокислотная последовательность A6 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGKLEWVS~~AIISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPWGRGTLTVSS
 (SEQ ID NO:50)

Нуклеотидная последовательность A6 VL:

ААТТТТATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
 CTCCTGCACTCGCAGCAGTGGCAGCATTGTGAGCAACTATGTGAGTGGTACCAACAGCGCCCCG
 GGCAGTGCCCCCACCACTGTCTATCTATGAGGATAACCGGAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAATACTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGGAGGCTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATGGCAGCAATCGTTGGATGTTTCGGCGGAGGG
 ACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO:51)

Аминокислотная последовательность A6 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSI~~VSNYVQWYQQRPGSAPT~~VIYEDNRRPSCV
 PDRFSGSIDSSNTASLTISGLEAEDEADYYCQSYDGSNR~~WM~~FGGGTKLTVLG (SEQ ID
 NO:52)

Нуклеотидная последовательность B4 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCATAGCAGTGGCTGGTAC
 GTAATCTCCGGTATGGACGTCTGGGGCCGAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID
 NO:53)

Аминокислотная последовательность B4 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGKLEWVS~~AIISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHSSGWYVISGMDVWGRGTMVTVSS
 (SEQ ID NO:54)

Нуклеотидная последовательность B4 VL:

ААТТТТATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
 CTCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCCG
 GGCAGTTCCCCACCACTGTGATCTCTGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TCTCTGGCTCCGTCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATTCTGGACTGAGGACTGA
 GGACGAGGCTGACTATTACTGTCTAGTCTAATGATCCGACAATGTGGTTTTCGGCGGAGGGACC
 AAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO:55)

Аминокислотная последовательность B4 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSI~~ASNYVQWYQQRPGSPPT~~VIS~~EDNQ~~RPSGV
 PDRFSGSDSSSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSN~~SD~~NVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
 NO:56)

Нуклеотидная последовательность B9 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAAGGACCTAACAGTGGGTGGTCCC
 TGTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID

NO:57)

Аминокислотная последовательность B9 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
 YADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLTVGGPWFYFDYWGQGTlVTVSS
 (SEQ ID NO:58)

Нуклеотидная последовательность B9 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
 CTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGTCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
 GGCAGTGCACCCACCACTGTGATCTTTGACGATGACCAAGACCCTCTGGGGTCCCTGGTCGGT
 TCTCTGGCTCCCTCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGCAGACTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATAGCAGCAATGTGGTATTCCGGCGGGGGACC
 AAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:59)

Аминокислотная последовательность B9 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSGSIVSNYVQWYQQRFGSAPTIVIFDDQRPESGV
 PGRFSGSLDSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVLG (SEQ ID
 NO:60)

Нуклеотидная последовательность C9 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA
 TGGCTTGAATCCTGGGGCCGGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:61)

Аминокислотная последовательность C9 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
 YADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGWNAIGWLESWGRGTLTVSS
 (SEQ ID NO:62)

Нуклеотидная последовательность C9 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAGGACGATAACCAT
 CTCCTGCACCCGCAGTGGTGGCAGCATTGGCAGCTACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
 GGCAGTGCACCCACCACTGTGATCTATGACGATAAAAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
 GGACGAGGCTGACTACTATTGTCAGTCTTATGATAGCAACAATCTTGTGGTTTTCCGGCGGAGGG
 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:63)

Аминокислотная последовательность C9 VL:

NFMLTQPHSVSESPGRITITISCTRSGSIGSYVQWYQQRFGTAPTIVYDDKKRPESGV

PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSNNLVVFVGGGTVKTVLG (SEQ ID NO: 64)

Нуклеотидная последовательность C10 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC
GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCAGGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 65)

Аминокислотная последовательность C10 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWWYVPHWFDPPWGRGTMVTVSS
(SEQ ID NO: 66)

Нуклеотидная последовательность C10 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT
CTCCTGCACCCGACAGTGGCACCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GGCAGTTCCCCACCACTGTGATCTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
TCTCTGGCTCCATCAGAGCTCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTTATGATAACAGCAATCATTGGGTGTTCCGGCGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 67)

Аминокислотная последовательность C10 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGTIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPESGV
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDNSNHWVFVGGGTVKTVLG (SEQ ID NO: 68)

Нуклеотидная последовательность D3 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGAAACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCAATGCCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTCTTACTGGTAGTGGTGGTACCGCATACTACGCAGACT
CCGTGGAGGGCCGGTTCAGCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGGCACGGAACCTCGTGGGAGGA
GGACTTGACAACCTGGGGCCAAGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 69)

Аминокислотная последовательность D3 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSNAMSWVRQAPGKLEWVSTLTGSGGTAY
YADSVVEGRFISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTELVGGLDNWGQGTTLVTVSS
(SEQ ID NO: 70)

Нуклеотидная последовательность D3 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTGACGAT
 CTCCTGCACCGGCAGCGAGGCAGCATTGCCACCAACTATGTGCAGTGGTATCAGCAGCGCCCG
 GGCAGTGCCCCCACTGTGATCCATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TCTCTGGCTCCATCGACGGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGCAGCCTGA
 GGACGAGGCTGATTACTACTGTCACTTATGATAGTGACAATCATCATGTGGTATTTCGGCGGA
 GGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:71)

Аминокислотная последовательность D3 VL:

NFMLTQPHSLSESPGKTVTISCTGSGGSIATNYVQWYQQRPGSAPTTVIHEDNQRP~~SGV~~
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLQPEDEADYYCQSYDSDNHHVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
 NO:72)

Нуклеотидная последовательность D6 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGATGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA
 TGGCTTGAATCCTGGGGCAAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность D6 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGWNA~~L~~GWLESWGKGTMTVSS
 (SEQ ID NO:74)

Нуклеотидная последовательность D6 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
 CTCCTGCACCGGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
 GGCAGTGCCCCCACTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCACTTATGATAGCAGCAATCAAGAGGTGGTATTTCGGCGGA
 GGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:75)

Аминокислотная последовательность D6 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRP~~SGV~~
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQEVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
 NO:76)

Нуклеотидная последовательность D8 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA

GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC
GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID
NO:77)

Аминокислотная последовательность D8 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:78)

Нуклеотидная последовательность D8 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTTACCAT
CTCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGCATTTGTAGCAACTATGTACAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GGCAGTTCCCCACCACTGTGATCTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
TCTCTGGTCCATCGACAGTCTCCTCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATAGCAACAATTTTGGGTGTTCGGCGGAGGG
ACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность D8 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIVSNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPESGV
PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNFWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
NO:80)

Нуклеотидная последовательность E1 VH:

GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTACTGTGTGAAAAGGTCCTTTGATAGTGGTGGG
TCCTTTGAGTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность E1 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKRSFDSGGSFEYWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO:82)

Нуклеотидная последовательность E1 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTCACCAT
CTCCTGCACCCGAGCAGTGGCTACATTGCCAGCTCCTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GGCAGTTCCCCACCACTGTAATCTTTGAGGATGACCGGAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
TCTCTGGTCCATCGACGGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAGGACTGA

GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATGACACCACTCCCTGGGTGTTCCGGCGGAGGG
ACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:83)

Аминокислотная последовательность E1 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGYIASSYVQWYQQRPGSSPTTVIFEDDRRPSGV
PDRFSGSIDGSSNSASLTISGLRTEADYYCQSYDDTTPWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
NO:84)

Нуклеотидная последовательность F8 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCGGCAGCTGGTACCTGGAA
GATTTTGATATCTGGGGCCGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность F8 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGSWYLEDFDIWGRGTMVTVSS
(SEQ ID NO:86)

Нуклеотидная последовательность F8 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTTACCAT
CTCCTGCACCCGACAGTGGCAGCATGCCAGCACTATGTCACTGGTATCAGCAGCGCCCG
GGCAGTTCACCCACCACTGTGATCTATGAGGATAACCGAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGCTCGGT
TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGGAGACTGA
CGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTCTGATACCACCTATCATGGAGGTGTGGTATTCCGGC
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность F8 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVHWYQQRPGSSPTTVIYEDNRRPSGV
PARFSGSIDSSNSASLTISGLETDDEADYYCQSSDTTYHGGVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID
NO:88)

Нуклеотидная последовательность F9 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGCGGTAACCTACGGTGATTAC
TTCGACTACTTTGACTACTGGGGCAGAGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID
NO:89)

Аминокислотная последовательность F9 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGNYGDFYFDYWGRTMTVTVSS
(SEQ ID NO:90)

Нуклеотидная последовательность F9 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
CTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAATTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GGCAGTGCCCCCACCATTGTGATCTATGAAGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTCATCGGT
TCTCTGGCTCCATCGACAGTCCCTCCAACCTCTGCCTCCCTACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGAGGGGTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTAGGT (SEQ ID NO:91)

Аминокислотная последовательность F9 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQRPQSAPTIVIEDNQRPSCV
PHRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYEGFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:92)

Нуклеотидная последовательность G7 VH:

GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCATATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA
TGGCTTGAATCCTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:93)

Аминокислотная последовательность G7 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGNALGWLESWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO:94)

Нуклеотидная последовательность G7 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACGCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTGACCAT
TTCCTGCACCCGCAGAAATGGCAACATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GACAGTGCCCCCACCCTTATAATCTTTGAAGATACCCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTACTCGGC
TCTCAGGCTCCATCGACACCTCCTCCAATTCTGCCTCCCTCATCATCTCTTATTGAGGACTGA
GGACGAGGCTGATTACTACTGTCAATCTTCTGATTCCAACAGGGTGCTGTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO:95)

Аминокислотная последовательность G7 VL:

NFMLTQPHAVSESPGKTVTISCTGRNGNIASNYVQWYQRPDSAPTLIIIFEDTORPSCV
PTRLSGIDTSSNSASLIISLRTEDADYYCQSSDSNRVLFGGGTVTVLG (SEQ ID
NO:96)

Нуклеотидная последовательность G9 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATTTTGGGTATTACGAGT
 GGAATGACTACTGGGGGCGGGGACACGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:97)

Аминокислотная последовательность G9 VH:

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFWVITSGNDYWGRTTITVSS
 (SEQ ID NO:98)

Нуклеотидная последовательность G9 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTGACCAT
 CTCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGATTGCTAGCAATTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCG
 GGCAGTTCACCCACCACTGTGATCTTTGAAGATAACCGAAGACCTCTGGGGTCCCTGATCGGT
 TTTCTGGTCCATCGACACCTCCTCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTTGATAGACCAATCTTGTGGTGTTCGGCGGAGGG
 ACCAAGCTGACCGTCTAGGT (SEQ ID NO:99)

Аминокислотная последовательность G9 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQRPSSPTTVIFEDNRRPSGV
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSFDSNLVVFVGGGKLTVLG (SEQ ID
 NO:100)

Нуклеотидная последовательность G10 VH:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA
 TGGCTTGAATCCTGGGGGAAGGGGACACGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:101)

Аминокислотная последовательность G10 VH:

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGWNLGWLESWGKGTITVSS
 (SEQ ID NO:102)

Нуклеотидная последовательность G10 VL:

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCAT
 CTCCTGCGCGGCAGCAGTGGCAGATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCG
 GGCAGTGCACCCACCGCTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCTCTGGGGTCCCTGATCGAT
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCAATCTTACTCTTACAACAATCAGGTCGTGTCGGCGGAGGG
 ACCAAGGTCACCGTCTAGGT (SEQ ID NO:103)

Аминокислотная последовательность G10 VL:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCAAGSSGSIASNYVQWYQRPGSAPTAVIYEDNQRPSGV
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYSYNNQVVFVGGGKVTVLG (SEQ ID
 NO:104)

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитела имеют изотип IgG. В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитела имеют изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитела по изобретению специфически связывают IFN γ человека и/или яванского макака, при этом антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело NI-0501, антитело A6, антитело B4, антитело B9, антитело C9, антитело CЮ, антитело D3, антитело D6, антитело D8, антитело E1, антитело F8, антитело F9, антитело G7, антитело G9 и/или антитело G10.

Способы лечения

Композиции и способы полезны для лечения любого из различных заболеваний, ассоциированных с экспрессией и/или активностью интерферона-гамма (IFN γ), включая aberrантную экспрессию и/или активность IFN γ . Композиции и способы по изобретению полезны для лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH). HLH представляет собой редкое, серьезное и опасное для жизни заболевание патологической иммунной активации, характеризующееся клиническими признаками и симптомами экстремального воспаления (лихорадка, спленомегалия, цитопении, коагулопатия), приводящего к развитию опосредованных иммунной системой патологий, которые за счет повреждения тканей в конечном итоге могут вызывать полиорганную недостаточность и смерть (Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, et al.: Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood 1991, 78: 2918-2922). HLH включает первичный (генетический/семейный) HLH и вторичный HLH.

Первичный HLH представляет собой гетерогенное аутосомно-рецессивное заболевание, от которого

в основном страдают младенцы и дети раннего возраста, с предполагаемой распространенностью в Европе 1/50000 живорожденных детей (Janka GE: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur. J. Pediatr.* 1983, 140: 221-230). Заболевание является заведомо смертельным со средним сроком выживания менее 2 месяцев после появления симптомов, если не применять лечение (Filipovich AH: Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 127-131).

Все генетические дефекты при первичном HLH затрагивают гены, вовлеченные в цитотоксический путь NK-клеток и/или цитотоксических лимфоцитов, необходимых для элиминации активированных макрофагов, кодирующие белки пути синтеза перфорины, созревания цитолитических гранул, экзоцитоза гранул и функции высвобождения содержимого гранул при экзоцитозе (Filipovich, A., K. McClain, and A. Grom. 2010. Histiocytic disorders: recent insights into pathophysiology and practical guidelines. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16(1 Suppl): S82-S89). У примерно 20-40% пациентов, страдающих первичным HLH, нарушение цитотоксической функции, характерное для синдрома HLH, происходит в результате мутаций в гене, кодирующем перфорин (PRF1), цитолитический белок цитотоксических гранул, который является ключевым регулятором опосредованного Т-клетками и клетками - естественными киллерами цитолиза. У примерно 10% пациентов заболевание вызвано мутациями в гене UNC13D, кодирующем белок, который участвует в высвобождении перфорины в клетки-мишени. Кроме того, некоторые синдромы иммунной недостаточности, например, синдром Грисцелли 2 типа (GS-2) и синдром Чедиака-Хигаси (CHS), часто сопровождаются HLH (Janka GE, Lehmborg K: Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013, 2013: 605-611).

Вторичные формы HLH могут возникать в ходе инфекции, аутоиммунного/ревматического заболевания или в связи со злокачественным новообразованием. Вторичные формы имеют те же признаки и симптомы, что и первичный HLH, и могут быть в равной степени тяжелыми.

Композиции и способы по изобретению полезны для лечения вторичного HLH. Композиции и способы по изобретению полезны для лечения синдрома активации макрофагов (MAS).

MAS является тяжелым, потенциально опасным для жизни осложнением ревматических заболеваний, которое вызывается избыточной активацией и экспансией Т-лимфоцитов и макрофагов. Неконтролируемая экспансия этих иммунных клеток приводит к выраженной гиперцитокинемии и гипервоспалительному состоянию, которое связано с лихорадкой, цитопениями, гепатоспленомегалией, дисфункцией печени, аномалиями свертывания крови и гиперферритинемией, и может прогрессировать до полиорганной недостаточности и смерти (Schulert GS, Grom AA: Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine-directed therapies. *Annu. Rev. Med.* 2015, 66: 145-159). Из-за его сильного клинического и патологического сходства с HLH MAS относят к вторичным или приобретенным формам HLH. Действительно, недавно было установлено, что у большинства пациентов с MAS тесты показывают нарушение функции NK и перфорины, и у значительного числа пациентов с MAS наблюдаются полиморфизмы или гетерозиготные мутации в PRF1 и UNC13D (Zhang M, Behrens EM, Atkinson TP, Shakoory B, et al.: Genetic defects in cytotoxicity in macrophage activation syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2014, 16: 439).

MAS чаще всего встречается у пациентов, страдающих sJIA, и, реже, системной красной волчанкой (СКВ), однако также были описаны случаи MAS, хотя и более редкие, у пациентов с васкулитом, в частности, с болезнью Кавасаки. Примерно у 7-17% пациентов с sJIA развивается выраженный MAS (Sawhney S, Woo P, Murray KJ: Macrophage activation syndrome: a potentially fatal complication of rheumatic disorders. *Arch. Dis. Child.* 2001, 85: 421-426; Moradinejad MH, Ziaee V: The incidence of macrophage activation syndrome in children with rheumatic disorders. *Minerva Pediatr.* 2011, 63: 459-466), некоторые данные свидетельствуют о том, что субклинической формой MAS могут страдать до трети пациентов с активным системным заболеванием (Behrens EM, Beukelman T, Paessler M, Cron RQ: Occult macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 2007, 34: 1133-1138).

Поскольку MAS является потенциально смертельным заболеванием, своевременная диагностика и немедленное терапевтическое вмешательство необходимы для надлежащего контроля заболевания. Регистрированные показатели смертности при MAS достигают 20-30%, и он остается основной причиной смерти пациентов в области детской ревматологии (Grom AA, Horne A, De Benedetti F: Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Mar 24. doi: 10.1038/nrrheum.2015.179).

Были предложены различные наборы критериев для диагностирования MAS у пациентов с sJIA. Иногда рекомендуют для использования руководство по диагностике HLH 2004 г. (Henter J, Horne A, Aricó M, Egeler RM, et al.: HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007, 48: 124-131), в основном разработанное для первичных (генетических) форм HLH. Однако эти критерии имеют некоторые ограничения и могут быть неприменимы к пациентам с sJIA. Например, такие критерии, как цитопении и гипофибриногенемия на уровне ниже пороговых значений, которые должны иметь место согласно руководству HLH-2004, становятся очевидными только на более поздних стадиях MAS, поскольку у этих пациентов часто наблюдаются повышенные количества белых клеток крови и тромбоцитов, а также повышенные сывороточные уровни фибриногена, как часть воспалительного ответа при sJIA (Schulert GS, Grom AA: Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine-directed therapies. *Annu. Rev. Med.* 2015, 66: 145-159). Гемофагоци-

тоз может отсутствовать в клинической картине у значительной части пациентов с MAS (Minoia F, Davi S, Home A, Demirkaya E, et al.: Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 3160-3169). Кроме того, гемофагоцитоз, активность NK-клеток и sCD25 обычно не оценивают в контексте MAS.

Альтернативный подход основан на применении предварительного диагностического руководства (PDG) для осложнений MAS при sJIA, которое было создано при анализе группы пациентов с MAS в сравнении с группой пациентов с внезапным обострением sJIA.

Недавно было проведено сравнение диагностического руководства HLH-2004 и предварительного диагностического руководства для sJIA-ассоциированного MAS на их способность отличать sJIA/MAS от sJIA (в отсутствие MAS) и системной инфекции в большой популяции пациентов (Davi S, Minoia F, Pistorio A, Home A, et al.: Performance of current guidelines for diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 2871-2880). Хотя и с некоторыми ограничениями вследствие его ретроспективного характера, данное исследование продемонстрировало, что предварительное руководство для MAS достигает лучшего баланса между чувствительностью и специфичностью, и лучшего совпадения с диагнозом, поставленным лечащим врачом. Чувствительность набора критериев HLH-2004 составляла <30%. Тем не менее, также сообщалось, что доля пациентов, соответствующих каждому критерию PDG, отличается большой вариабельностью, и некоторые клинические признаки (например, дисфункция ЦНС и кровотечения) могут проявляться на поздней стадии MAS, что снижает чувствительность этих критериев на ранних стадиях MAS (Lehmberg K, Pink I, Eulenburg C, Beutel K, et al: Differentiating macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis from other forms of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *The Journal of pediatrics* 2013, 162: 1245-1251).

Недавно была разработана диагностическая шкала оценки в баллах (HScore) и опробована в ретроспективной группе из 312 пациентов, из которых 162 были признаны имеющими реактивный гемофагоцитарный синдром (Fardet L, Galicier L, Lambotte O, Marzac C, Aumont C, Chahwan D, Coppo P, Hejblum G: Development and validation of the HScore, a score for the diagnosis of reactive hemophagocytic syndrome. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 2613-2620).

Девять переменных (3 клинических [то есть, известная основополагающая иммуносупрессия, высокая температура, органомегалия], 5 биологических [то есть, уровни триглицеридов, ферритина, сывороточной глутаматоксалоацетаттрансаминазы, фибриногена и цитопения] и 1 цитологический [то есть, признаки гемофагоцитоза в пунктате костного мозга]) были сохранены в HScore, и вероятность наличия гемофагоцитарного синдрома находится в диапазоне от <1% в случае HScore ≤90 до >99% в случае HScore ≥250.

До того, как будет достигнут окончательный консенсус в отношении валидированных диагностических критериев для MAS, клинический диагноз квалифицированного врача по-прежнему является решающим, когда нужно различать MAS и состояния, проявляющиеся аналогичными клиническими признаками, такие как резкое обострение sJIA или сепсис-подобные синдромы.

В настоящее время не существует одобренных лекарственных средств для лечения MAS. Как правило, прием глюкокортикоидов в высоких дозах является терапией первой линии для MAS. Для пациентов, не отвечающих на глюкокортикоиды, в качестве дополнительной терапии предложено применение циклоспорина А (CsA) (Stéphan JL, Koné-Paut I, Galambun C, Mouy R, Bader-Meunier B, Prieur AM: Reactive haemophagocytic syndrome in children with inflammatory disorders. A retrospective study of 24 patients. *Rheumatology* (Oxford, England) 2001, 40: 1285-1292).

Введение этопозиды, являющееся частью лечебного протокола, разработанного для лечения rHLH согласно HLH-94, также рассматривается для пациентов, не отвечающих на высокие дозы глюкокортикоидов. Однако потенциальная токсичность лекарственного средства по-прежнему вызывает серьезные опасения. Другая современная терапия первой линии для HLH включает применение дексаметазона. Однако такие терапевтические средства, как этопозид и/или дексаметазон, являются миелосупрессорами и/или иммуносупрессорами широкого спектра действия. В настоящее время не существует стандарта терапии второй линии для HLH, лечение такими средствами, как алемтузумаб/ATG, приводит к глубокой иммуносупрессии, и показатели выживаемости при таких методах лечения считаются очень низкими.

Полезность биологических соединений, ингибирующих пути IL-1, IL-6R или TNFα, для лечения MAS по-прежнему остается неясной. Хотя, как сообщалось, биологические соединения, ингибирующие эти пути, эффективны в отдельных случаях, также были сообщения о пациентах, у которых развился MAS в условиях такого лечения (Stern A, Riley R, Buckley L: Worsening of macrophage activation syndrome in a patient with adult onset Still's disease after initiation of etanercept therapy. *J Clin Rheumatol* 2001, 7: 252-256; Ramanan AV, Schneider R: Macrophage activation syndrome following initiation of etanercept in a child with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2003, 30: 401-403; De Benedetti F, Brunner HI, Ruperto N, Kenwright A, et al.: Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367: 2385-2395; Ruperto N, Brunner HI, Quartier P, Constantin T, et al.: Two randomized

trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367: 2396-2406), а также о пациентах, которые не отвечают на такую терапию, это свидетельствует о том, что ингибирование IL-1, IL-6R или TNF α не обеспечивает полную защиту от развития MAS и не является эффективным лечением для развившегося синдрома.

В большом ретроспективном многоцентровом исследовании были изучены клинические, лабораторные и гистопатологические характеристики, а также современные методы и результаты лечения MAS/sJIA в общей сложности у 362 пациентов (Minoia F, Davi S, Home A, Demirkaya E, et al.: Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 3160-3169). У примерно половины пациентов MAS имел место в контексте активного sJIA, или во время острой вспышки sJIA у 30% из них в начале заболевания. Инфекционный триггер был идентифицирован у трети пациентов. Среди 24 пациентов, у которых был определен вид инфекции, EBV был наиболее распространенным возбудителем (25%). Считалось, что у 11 пациентов (3,8%) MAS был связан с побочным эффектом лечения: для 8 из них применялось биологическое средство, направленное на путь IL-6 (N=4), IL-1 (N=3) или TNF α (N=1). Почти все пациенты получали глюкокортикоиды. Циклоспорин, биологические лекарственные средства и этопозид получали 61%, 15% и 12% пациентов, соответственно.

Таким образом, существует высокая неудовлетворенная потребность в разработке эффективных режимов лечения MAS. Более 50% пациентов с sJIA и MAS не отвечают на системное введение одних только глюкокортикоидов или могут нуждаться в продолжительном лечении высокими дозами, что сопряжено со значительным риском для здоровья. Когда пациенты не отвечают на введение глюкокортикоидов, отсутствуют надежные данные по эффективности дополнительных терапевтических средств, таких как CsA или этопозид. Течение MAS может быстро становиться необратимым, приводя к смертельному исходу. Согласно современным данным, смертность от sJIA-ассоциированного MAS составляет 8%, при этом примерно трети пациентов требуется госпитализация в отделении интенсивной терапии. Недавние свидетельства решающей роли IFN γ в патогенезе заболевания указывают на то, что блокада IFN γ потенциально представляет собой новый вид направленной терапии.

Композиции, включая композиции NI-0501, и способы по изобретению обладают преимуществами в сравнении с современными методами лечения первичного и вторичного HLH.

MAS и HLH характеризуются устойчивой активацией иммунных клеток и сопутствующим всплеском продуцирования провоспалительных цитокинов с избыточным продуцированием IFN γ , TNF α , IL-1 и IL-6 (Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, et al.: Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1991, 78: 2918-2922; Imashuku S, Hibi S, Fujiwara F, Todo S: Hyper-interleukin (IL)-6-naemia in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93: 803-807; Xu X, Tang Y, Song H, Yang S, et al.: Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J. Pediatr.* 2012, 160: 984-90.e1; Put K, Avau A, Brisse E, Mitera T, et al.: Cytokines in systemic juvenile idiopathic arthritis and haemophagocytic lymphohistiocytosis: tipping the balance between interleukin-18 and interferon- γ . *Rheumatology (Oxford)* 2015). За последние годы накоплены доказательства в поддержку решающей роли IFN γ в развитии обеих форм HLH (Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P: An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8 $^{+}$ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004, 104: 735-743; Pachlopnik Schmid J, Ho C, Chrétien F, Lefebvre JM, et al.: Neutralization of IFN γ defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. *EMBO Mol Med* 2009, 1: 112-124; Zoller EE, Lykens JE, Terrell CE, Aliberti J, et al.: Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *J. Exp. Med.* 2011, 208: 1203-1214) и MAS (Behrens EM, Canna SW, Slade K, Rao S, et al.: Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J. Clin. Invest.* 2011, 121: 2264-2277).

Мыши с нокаутом гена перфорины считаются релевантной моделью для первичного HLH, поскольку у этих мышей после инфицирования LCMV развиваются все диагностические и многие из клинических и лабораторных характеристик человеческого заболевания. HLH-подобное заболевание, которое развивается у этих животных, зависит от CD8 $^{+}$ Т-клеток и IFN γ , продуцируемого в ответ на стимуляцию антигеном (Imashuku S, Hibi S, Fujiwara F, Todo S: Hyper-interleukin (IL)-6-naemia in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93: 803-807). Было показано, что при нейтрализации высоких циркулирующих уровней IFN γ за счет введения анти-IFN γ антител не только возвращались к прежнему состоянию аномальные клинические и лабораторные показатели, но и резко возрастали показатели выживаемости. Напротив, абляция любого другого цитокина никак не влияла на выживаемость (Imashuku S, Hibi S, Fujiwara F, Todo S: Hyper-interleukin (IL)-6-naemia in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93: 803-807; Xu X, Tang Y, Song H, Yang S, et al.: Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J. Pediatr.* 2012, 160: 984-90.e1). Дополнительными доказательствами важности IFN γ при HLH являются высокие концентрации циркулирующего IFN γ у таких пациентов (Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, et al.: Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1991, 78: 2918-2922; Xu X, Tang Y, Song H, Yang S, et al.: Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J. Pediatr.* 2012, 160:

984-90.e1). В группе из 71 пациента, которых контролировали от момента диагностирования HLH до лечения и последующего наблюдения, уровни IFN γ превышали верхнюю границу нормальных значений (17,3 пг/мл) у всех пациентов и, в частности, 53,5% пациентов имели уровни, превышающие 1000 пг/мл. Также сообщалось, что уровни IFN γ повышаются сразу и быстро, и могут снижаться от >5000 пг/мл до нормальных значений в течение 48 ч при эффективном лечении HLH.

Две животные модели вторичного HLH были исследованы в контексте программы разработки NI-0501 для выяснения потенциальной патогенной роли IFN γ . Во-первых, в мышинной модели, которая имитировала вызванный инфекцией HLH, неоднократное введение CpG через активацию TLR9 инициировало развитие гиперцитокинемии, что приводило к появлению клинических (например, снижение массы тела, спленомегалия) и лабораторных (например, цитопения, гиперферритинемия) признаков HLH. При нейтрализации IFN γ за счет введения анти-IFN γ антитела клинические и лабораторные показатели возвращались к норме. Было показано, что нейтрализация IFN γ также была полной и в соответствующих тканях-мишенях, таких как печень и селезенка. Интересно, что введение анти-IFN γ антитела впервые продемонстрировало количество IFN γ , в 500-2000 раз превышающее количество, которое было измерено в крови, очевидно, более точно отражая продуцирование IFN γ в тканях. Экспрессия двух индуцируемых IFN γ хемокинов (CXCL9 и CXCL10) была повышена после стимуляции TLR9 как в крови, так и в печени, и существенную корреляцию наблюдали между сывороточными уровнями IFN γ и сывороточными концентрациями CXCL9 и CXCL10. Нейтрализация IFN γ вызывала значительное снижение сывороточных уровней CXCL9 и CXCL10, а также уровней их мРНК в печени (Buatois V, Chatel L, Cons L, Lory S, et al.: IFN γ drives disease in the TLR9-mediated secondary HLH in mice: rationale for a new therapeutic target in secondary HLH, готовится к печати).

Во-вторых, была изучена животная модель на трансгенных по гену IL-6 мышах, у которых IL-6 экспрессируется на высоком уровне, поскольку она имитирует состояние пациентов с sJIA, ревматическим заболеванием, наиболее часто ассоциированным с вторичными формами HLH. При стимуляции лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR) у этих животных наблюдали повышение показателей смертности, повышение продуцирования воспалительных цитокинов и гиперактивацию воспалительных сигнальных путей. Кроме того, у этих мышей наблюдали резкое сокращение количества тромбоцитов и нейтрофилов, повышение уровней SCD25, ферритина и LDH, что напоминало многие из признаков, как правило, имеющих у пациентов с MAS (Strippoli R, Carvello F, Scianaro R, De Pasquale L, et al.: Amplification of the response to Toll-like receptor ligands by prolonged exposure to interleukin-6 in mice: implication for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheum.* 2012, 64: 1680-1688). У этих мышей при нейтрализации IFN γ за счет введения анти-IFN γ антитела показатели выживаемости резко улучшались и лабораторные показатели возвращаются к норме (Prencipe G et al., статья готовится к печати).

Аналогичные данные недавно были получены при обсервационном исследовании у пациентов со вторичными формами HLH, возникающими либо вследствие инфекции, либо по неизвестной причине (rHLH был исключен вследствие нормальной цитотоксической активности, отсутствия мутаций в известных генах, вызывающих rHLH, и отсутствия болезни в семейном анамнезе), или с MAS, существующим в контексте sJIA.

У 14 пациентов с вторичным HLH (у 7 из которых удалось идентифицировать лежащую в основе инфекцию) анализировали образцы сыворотки во время острой вспышки заболевания и во время ремиссии заболевания. Уровни IFN γ , CXCL9 и CXCL10 были заметно выше в активной фазе по сравнению с ремиссией заболевания (IFN γ : 34,7 против <3,5 пг/мл; CXCL9: 33598 против 745 пг/мл; CXCL10: 4420 против 132 пг/мл; медианные значения). Уровни IFN γ в значительной степени коррелировали с уровнями CXCL9 ($p=0,0018$) и, в меньшей степени, с уровнями CXCL10 ($p=0,014$). Уровни IFN γ и хемокинов (в частности, CXCL9) в значительной степени коррелировали с показателями тяжести заболевания, такими как количество нейтрофилов и тромбоцитов, ферритина и ALT, дополнительно свидетельствуя в пользу патогенной роли IFN γ во вторичном HLH и потенциального применения хемокинов в качестве релевантных биомаркеров заболевания (Buatois V, Chatel L, Cons L, Lory S, et al: IFN γ drives disease in the TLR9-mediated secondary HLH in mice: rationale for a new therapeutic target in secondary HLH).

Аналогичные результаты были получены у пациентов с MAS, имеющих место у пациентов, страдающих sJIA. Сывороточные концентрации IFN γ , IFN γ -индуцируемых хемокинов (CXCL9, CXCL10, CXCL11) и IL-6 были измерены у 54 пациентов с sJIA, из которых 20 имели MAS. Уровни IL-6 были сопоставимы у пациентов с активным MAS и пациентов с активным sJIA, но без MAS, в момент сбора образцов. Напротив, циркулирующие уровни IFN γ и хемокинов были значительно выше при MAS, особенно в случае CXCL9, медианные уровни которого были примерно в 15 раз выше, чем у пациентов с активным sJIA без MAS (13392 против 837 пг/мл; $p=0,005$). Примечательно, что только у пациентов с MAS была обнаружена существенная корреляция между уровнями CXCL9 и показателями, как правило, аномальными, такими как количество ферритина ($p=0,041$), нейтрофилов ($p=0,010$) и тромбоцитов ($p=0,022$), ALT ($p=0,044$) и LDH ($p=0,013$). Уровни IFN γ также коррелировали с лабораторными показателями тяжести заболевания, за исключением LDH, в случае которой статистическая значимость не была достиг-

нута (Bracaglia et al., статья готовится к печати).

В совокупности, данные результаты создают надежное основание для нейтрализации IFN γ в качестве направленной терапии для вторичного HLH и MAS, а также для исследования этого подхода в клинических условиях.

Композиции, включая композиции NI-0501, и способы по изобретению обладают преимуществами в сравнении с современными методами лечения sJIA. Например, композиции, включая композиции NI-0501, и способы по изобретению полезны для лечения MAS/sHLH у пациентов с sJIA, с основной целью достижения ремиссии MAS.

Обоснование для идентификации популяции пациентов, которые получают пользу от лечения NI-0501, и для оценки эффективности NI-0501 при MAS/sHLH опирается на ряд факторов. Во-первых, данные доклинических исследований, полученные на животной модели, релевантной для MAS при sJIA, показали, что нейтрализация IFN γ приводит к заметному улучшению показателей выживаемости и возвращению к норме лабораторных показателей. Далее, обсервационные данные у пациентов с MAS/sHLH демонстрируют наличие высоких уровней IFN γ и, что более важно, чрезвычайно повышенных уровней IFN γ -индуцируемых хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В-третьих, у пациентов с MAS/sHLH концентрации IFN γ и CXCL9 в значительной степени коррелируют с показателями заболевания, такими как уровни ферритина, тромбоцитов и трансаминаз. Далее, благоприятный профиль переносимости и отсутствие соответствующих проблем безопасности, наблюдаемые у пациентов с rHLH в предыдущих исследованиях, в которых все вводимые инфузией препараты хорошо переносились, подтверждая результаты исследования с участием здоровых добровольцев, а также отсутствие сообщений об инфекциях, вызываемых патогенами, которым, как известно, должна способствовать нейтрализация IFN γ , кроме того, все из инфекций, имеющихся у некоторых пациентов с rHLH, были признаны связанными не с лечением NI-0501, а с иммунным статусом пациентов, продолжительностью заболевания и предшествующим или сопутствующим лечением. В-пятых, предварительные данные предшествующих клинических испытаний демонстрируют благоприятное влияние на показатели заболевания, с заметным началом проявления эффектов в течение первых дней лечения: типичные клинические признаки и симптомы HLH начинали заметно ослабевать после первого введения NI-0501 (лихорадка в течение нескольких часов, сплено/гепатомегалия в течение нескольких дней); и из 18 оцениваемых пациентов на момент прекращения сбора данных, лечение NI-0501 позволило 10 пациентам перейти к ТГСК. Далее, данные, полученные с помощью подхода моделирования и имитации ФК, демонстрируют предсказуемый фармакокинетический профиль NI-0501, а также то, что нейтрализация IFN γ достигается и сохраняется. И наконец, общепринятая терапия (например, CsA) может быть начата незамедлительно, без необходимости в периоде вымывания, если NI-0501 будет недостаточно для адекватного контроля заболевания.

Подводя итоги вышесказанному, на основании данных доклинических и клинических исследований существуют веские доводы в пользу нейтрализации IFN γ при MAS/sHLH, вторичном по отношению к ревматическим заболеваниям, и предварительные результаты у пациентов с rHLH указывают на благоприятное соотношение пользы и риска при использовании NI-0501, со значительными изменениями и возвращением к норме показателей, характерных для HLH.

Таким образом, применение NI-0501 представляет собой инновационный и эффективный терапевтический подход для контроля этого тяжелого, опасного для жизни осложнения ревматических заболеваний, потенциально позволяющий ограничивать побочные эффекты от долгосрочного лечения глюкокортикоидами в высоких дозах.

Введение анти-IFN γ антител

Следует понимать, что терапевтические соединения по настоящему изобретению будут вводиться с соответствующими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения лучшего переноса, доставки, переносимости, и тому подобного. Описание множества соответствующих составов можно найти в справочниках, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15-е издание, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, в главе 87 авторов Blaug, Seymour в указанном сборнике. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как липофектинTM), ДНК конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли разной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любые из вышеуказанных смесей могут быть подходящими для лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется компонентами состава и состав является физиологически совместимым и переносимым при используемом пути введения. Смотри также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance", Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2): 210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals", Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery- some emerging concepts", J Pharm Sci. 89(8): 967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) и приведенные в них ссылки для получения дополнительной информации, относящейся к соста-

вам, эксципиентам и носителям, хорошо известным химикам-фармацевтам.

Эффективность лечения определяют с применением хорошо известных методов диагностирования или лечения конкретного связанного с иммунной системой заболевания. Ослабление одного или более симптомов связанного с иммунной системой заболевания указывает на то, что введение антитела приводит к положительным клиническим результатам.

Антитела по изобретению, включая поликлональные, моноклональные, гуманизированные и полностью человеческие антитела, могут быть использованы в качестве терапевтических средств. Такие средства, как правило, будут использованы для лечения, либо предотвращения заболевания или патологического состояния, ассоциированного с aberrантной экспрессией или активацией конкретной мишени в организме индивида. Состав антитела, предпочтительно антитела, имеющего высокую специфичность и высокую аффинность в отношении своего антигена-мишени, вводят индивиду, и оно будет, как правило, оказывать эффект при его связывании с мишенью. Введение антитела может приводить к отмене или ингибированию, или помехе, сигнальной функции мишени. Введение антитела может приводить к отмене или ингибированию, или помехе, связывания мишени с эндогенным лигандом, с которым мишень связывается естественным образом.

"Терапевтически эффективное количество антитела" по изобретению означает, как правило, количество, необходимое для достижения терапевтической цели. Как отмечено выше, это может быть взаимодействие связывания между антителом и его антигеном-мишенью, что в некоторых случаях препятствует функционированию мишени. Количество, которое необходимо вводить, также будет зависеть от аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном и, кроме того, будет зависеть от скорости, с которой вводимое антитело распространяется из свободного объема, введенного индивиду. Общепринятые диапазоны для терапевтически эффективной дозы антитела или фрагмента антитела по изобретению могут составлять, в качестве неограничивающего примера, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела. Предпочтительные дозы включают 1, 3, 6, 10 мг/кг массы тела. Общепринятая частота дозирования может находиться в диапазоне, например, от одного раза в сутки до двух раз в неделю. Лечение может продолжаться 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

Для лечения различных заболеваний и нарушений антитела или их фрагменты по изобретению можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и соображения, принимаемые в расчет при создании таких композиций, а также руководство для выбора компонентов можно найти, например, в сборнике Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19-е издание (Alfonso R. Gennaro, et al., редакторы) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Состав также может содержать более одного активного соединения, например, антагонистические анти-IFN γ соединения, необходимые для лечения конкретного состояния, предпочтительно, соединения с комплементарными активностями, которые не будут отрицательно влиять друг на друга. Альтернативно или дополнительно, композиция может содержать средство, которое усиливает ее функцию, такое как, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для достижения намеченной цели.

В одном варианте осуществления активное соединение, например, антагонистическое анти-IFN γ соединение, вводят в составе комбинированной терапии, то есть, в сочетании с одним или более дополнительными средствами, полезными для лечения патологических состояний или заболеваний. В данном контексте термин "в сочетании" означает, что средства вводят практически в одно и то же время, либо одновременно, либо последовательно. При последовательном введении в момент начала введения второго соединения первое из двух соединений, предпочтительно, все еще присутствует в эффективных концентрациях в подвергаемой лечению зоне.

Например, комбинированная терапия может включать использование одного или более нейтрализующих анти-IFN γ антител по изобретению, совместно сформулированных и/или совместно вводимых с одним или более дополнительными лекарственными средствами, например, одним или более ингибиторами цитокинов и факторов роста, иммунодепрессантами, противовоспалительными средствами, ингибиторами метаболизма, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими средствами, как описано более подробно ниже. В такой комбинированной терапии, предпочтительно, можно использовать более низкие дозы вводимых терапевтических средств, таким образом избегая возможной токсичности или осложнений, связанных с различными видами монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивное средство представляет собой циклоsporин А (CsA). В некоторых вариантах осуществления индивид получал CsA до начала введения NI-0501. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает по меньшей мере этопозид. В некоторых вариантах осуществления индивид получал этопозид до начала введения NI-0501.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой вводимый интратекально метотрексат и/или глюкокортикоиды. В некоторых вариантах осуществления индивид получал вводимый интратекально метотрексат и/или глюкокортикоиды до начала введения NI-0501.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой вводимые в/в иммуноглобулины (в/в IG). В некоторых вариантах осуществления в/в IG вводят в качестве заместительной терапии индивиду с установленной иммуноглобулиновой недостаточностью. В некоторых вариантах осуществления, когда индивид имеет установленную иммуноглобулиновую недостаточность, в/в IG вводят в дозе 0,5 г/кг каждые 4 недели, или более часто, для поддержания адекватных уровней IgG.

В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств представляют собой анальгетические средства, препараты крови для переливания, электролиты и глюкозу для инфузий, антибиотики, противогрибковые и противовирусные средства и/или общие поддерживающие препараты.

При использовании фрагментов антител предпочтительным является наименьший ингибирующий фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом белка-мишени, и/или наименьший ингибирующий фрагмент, который препятствует или является антагонистом сигнализации IFN γ . Например, на основании последовательностей вариabельной области антитела могут быть сконструированы пептидные молекулы, которые сохраняют способность к связыванию последовательности белка-мишени. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать методами рекомбинантной ДНК. (См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Состав также может содержать более одного активного соединения, необходимого для лечения конкретного состояния, предпочтительно, соединения с комплементарными активностями, которые не будут отрицательно влиять друг на друга. Альтернативно или дополнительно, композиция может содержать средство, которое усиливает ее функцию, такое как, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для достижения намеченной цели.

Режимы дозирования

Изобретение также относится к режиму дозирования для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с повышенными уровнями IFN γ . Режимы дозирования представляют собой режимы введения многократных изменяющихся доз. Доза антитела, которое связывает интерферон гамма (IFN γ), находится в диапазоне от 1,0 до 10 мг/кг массы тела индивида. Дозу вводят в виде по меньшей мере первой и второй дозы. Вторая доза является более низкой или более высокой, чем первая доза.

Режим введения многократных изменяющихся доз для лечения первичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у индивида-человека включает индукционную, или первую, дозу и лечебную, или вторую, дозу анти-IFN γ моноклонального антитела. Индивид является взрослым индивидом или индивидом-ребенком.

Первая доза составляет 1,0 или 3,0, мг/кг массы тела. Вторая доза составляет 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Первая доза антитела составляет 1,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Альтернативно, первая доза антитела составляет 3,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела.

Первую дозу вводят один раз в виде однократной дозы. Альтернативно, первую дозу вводят более одного раза в индукционный период лечения.

Вторую дозу вводят в течение одного или более периодов лечения. Вторую дозу вводят в первый период лечения. На протяжении первого периода лечения вторую дозу вводят каждые три дня после первой дозы. Первый период лечения продолжается примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более недель. Предпочтительно, первый период лечения составляет 2 недели. Необязательно, вторую дозу вводят в течение второго периода лечения после завершения первого периода лечения. На протяжении второго периода лечения вторую дозу вводят два раза в неделю. Второй период лечения продолжается примерно 1-20 недель, 2-20 недель, 3-20 недель, 4-20 недель, 5-20 недель, 6-20 недель, 1-10 недель, 2-10 недель, 3-10 недель, 4-10 недель, 5-10 недель, 6-10 недель. Второй период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу увеличивают или уменьшают в течение первого или второго периода лечения. Увеличенную или уменьшенную дозу называют третьей дозой. Третья доза может составлять 1,0, 3,0 или 6,0 мг/кг массы тела. Третью дозу вводят в течение оставшейся части первого и второго периода лечения. Альтернативно, третью дозу вводят в течение третьего периода лечения. В некоторых вариантах осуществления третью дозу называют поддерживающей дозой, и третий период лечения называют поддерживающим периодом.

Режим введения многократных изменяющихся доз для лечения вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у детей включает индукционную, или первую, дозу и лечебную, или вторую, дозу анти-IFN γ моноклонального антитела.

Первая доза составляет 6,0, мг/кг массы тела. Вторая доза составляет 3,0, мг/кг массы тела или 10,0 мг/кг массы тела.

Первую дозу вводят один раз в виде однократной дозы. Альтернативно, первую дозу вводят более одного раза в индукционный период лечения.

Вторую дозу вводят в течение одного или более периодов лечения. Вторую дозу вводят в первый период лечения. На протяжении первого периода лечения вторую дозу вводят каждые три дня после первой дозы. Первый период лечения продолжается примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более недель. Предпочтительно, первый период лечения составляет 2 недели. Необязательно, вторую дозу вводят в течение второго периода лечения после завершения первого периода лечения. На протяжении второго периода лечения вторую дозу вводят два раза в неделю. Второй период лечения продолжается примерно 1-20 недель, 2-20 недель, 3-20 недель, 4-20 недель, 5-20 недель, 6-20 недель, 1-10 недель, 2-10 недель, 3-10 недель, 4-10 недель, 5-10 недель, 6-10 недель. Второй период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу увеличивают или уменьшают в течение первого или второго периода лечения. Увеличенную или уменьшенную дозу называют третьей дозой. Предпочтительно, третья доза составляет 6,0 мг/кг массы тела. Третью дозу вводят в течение оставшейся части первого и второго периода лечения. Альтернативно, третью дозу вводят в течение третьего периода лечения. В некоторых вариантах осуществления третью дозу называют поддерживающей дозой, и третий период лечения называют поддерживающим периодом.

Режим введения многократных изменяющихся доз для лечения вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у взрослых людей включает индукционную, или первую, дозу и лечебную, или вторую, дозу анти-IFN γ моноклонального антитела.

Первая доза составляет 3,0 или 6,0 мг/кг массы тела. Предпочтительно, первая доза составляет 6,0 мг/кг массы тела. Вторая доза составляет 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Предпочтительно, вторая доза составляет 10,0 мг/кг массы тела. Первая доза антитела составляет 6,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 10,0 мг/кг массы тела. Первую дозу вводят один раз в виде однократной дозы. Альтернативно, первую дозу вводят более одного раза в индукционный период лечения.

Вторую дозу вводят в течение одного или более периодов лечения. Вторую дозу вводят в первый период лечения. На протяжении первого периода лечения вторую дозу вводят каждые три дня после первой дозы. Первый период лечения продолжается примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более недель. Предпочтительно, первый период лечения составляет 2 недели. Необязательно, вторую дозу вводят в течение второго периода лечения после завершения первого периода лечения. На протяжении второго периода лечения вторую дозу вводят два раза в неделю. Второй период лечения продолжается примерно 1-20 недель, 2-20 недель, 3-20 недель, 4-20 недель, 5-20 недель, 6-20 недель, 1-10 недель, 2-10 недель, 3-10 недель, 4-10 недель, 5-10 недель, 6-10 недель. Второй период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу увеличивают или уменьшают в течение первого или второго периода лечения. Увеличенную или уменьшенную дозу называют третьей дозой. Третья доза может составлять 1,0, 3,0 или 6,0 мг/кг массы тела. Третью дозу вводят в течение оставшейся части первого и второго периода лечения. Альтернативно, третью дозу вводят в течение третьего периода лечения. В некоторых вариантах осуществления третью дозу называют поддерживающей дозой, и третий период лечения называют поддерживающим периодом.

Режим введения многократных изменяющихся доз для лечения патологического состояния у индивида-человека включает индукционную, или первую, дозу и лечебную, или вторую, дозу анти-IFN γ моноклонального антитела. Индивид является взрослым индивидом или индивидом-ребенком. Состояние связано с повышенными уровнями IFN γ . Состояние представляет собой отторжение трансплантата, такое как отторжение трансплантата солидного органа или острое отторжение трансплантата костного мозга, реакцию трансплантат против хозяина, паранеопластическую мозжечковую дегенерацию, геморрагическую лихорадку, саркоидоз, приобретенную болезнь Стилла. В других вариантах осуществления режим дозирования применяют к индивиду после получения им CART-клеточной терапии.

Первая доза составляет 1,0-10 мг/кг массы тела. Например, первая доза антитела составляет 1,0, 3,0, 6,0 или 10 мг/кг массы тела. Вторая доза является более высокой или более низкой, чем первая доза. Вторая доза составляет 1,0-10 мг/кг массы тела. Например, вторая доза антитела составляет 1,0, 3,0, 6,0 или 10 мг/кг массы тела. Первая доза составляет 1,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Альтернативно, первая доза антитела составляет 3,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Первая доза антитела составляет 6,0 мг/кг массы тела, и вторая доза составляет 10,0 мг/кг массы тела.

Первую дозу вводят один раз в виде однократной дозы. Альтернативно, первую дозу вводят более одного раза в индукционный период лечения.

Вторую дозу вводят в течение одного или более периодов лечения. Вторую дозу вводят в первый период лечения. На протяжении первого периода лечения вторую дозу вводят каждые три дня после первой дозы. Первый период лечения продолжается примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более недель. Предпочтительно, первый период лечения составляет 2 недели. Необязательно, вторую дозу вводят в течение вто-

рого периода лечения после завершения первого периода лечения. На протяжении второго периода лечения вторую дозу вводят два раза в неделю. Второй период лечения продолжается примерно 1-20 недель, 2-20 недель, 3-20 недель, 4-20 недель, 5-20 недель, 6-20 недель, 1-10 недель, 2-10 недель, 3-10 недель, 4-10 недель, 5-10 недель, 6-10 недель. Второй период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу увеличивают или уменьшают в течение первого или второго периода лечения. Увеличенную или уменьшенную дозу называют третьей дозой. Третья доза может составлять 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг массы тела. Третью дозу вводят в течение оставшейся части первого и второго периода лечения. Альтернативно, третью дозу вводят в течение третьего периода лечения. В некоторых вариантах осуществления третью дозу называют поддерживающей дозой, и третий период лечения называют поддерживающим периодом.

В режиме введения многократных изменяющихся доз по изобретению первый и второй период времени для второй дозы можно корректировать время от времени с учетом, например, состояния здоровья индивида. Например, интервал между дозами может быть скорректирован на ± 1 , 2, 3 или 4 дня. Предпочтительно ± 2 дня.

В режиме введения многократных изменяющихся доз по изобретению дозу вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч. Предпочтительно дозы вводят в течение часа. Период времени для инфузии дозы зависит от ряда факторов, известных в данной области, например, возраста, массы тела, физического состояния индивида или наличия неблагоприятной реакции на терапевтическое средство. Период времени для инфузии дозы, как правило, определяется наибольшей скоростью инфузии, которую может переносить индивид (то есть, которая не вызывает неблагоприятную реакцию).

Дозу вводят в виде однократной инъекции. Антитело вводят в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии для заболевания или состояния, которое подвергают лечению. Например, индивиду вводят второе средство. Второе средство представляет собой, например, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство.

Необязательно, индивиду вводили дексаметазон непосредственно перед введением антитела. Дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 10 мг/м². Альтернативно, дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 5 мг/м².

В некоторых вариантах осуществления индивид ранее не получал лечение HLH.

Фармацевтические композиции

Антитела или растворимые химерные полипептиды по изобретению (также называемые в настоящем документе "активные соединения"), а также их производные, фрагменты, аналоги и гомологи, можно включать в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат антитело или растворимый химерный полипептид и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Соответствующие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочном руководстве в данной области, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также можно использовать липосомы и неводные среды, такие как нелетучие масла. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какие-либо общепринятые среды или средства несовместимы с активным соединением, их использование в композициях подразумевается. В композиции также можно включать вспомогательные активные соединения.

Фармацевтическая композиция по изобретению сформулирована так, чтобы быть совместимой с предназначенным для нее путем введения. Примеры пути введения включают парентеральный, например, внутривенный, внутрикожный, подкожный, пероральный (например, ингаляцию), чрескожный (то есть, топический), трансмукозальный и ректальный пути введения. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного введения, могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или натрия бисульфит; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный состав можно заключать в ампулы, шприцы одноразового использования или многодозовые флаконы, выполненные из стекла или пластика.

Предпочтительным путем введения является инъекция, например, внутривенная инъекция. Внутри-

венная инъекция может представлять собой быструю или медленную инфузию. Например, инфузии выполняют в течение периода времени примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ч. Период времени для инфузии зависит от ряда факторов, известных в данной области, например, возраста, массы тела, физического состояния индивида или наличия неблагоприятной реакции на терапевтическое средство. Период времени для инфузии, как правило, определяется наибольшей скоростью инфузии, которую может переносить индивид (то есть, которая не вызывает неблагоприятную реакцию).

Фармацевтические композиции, подходящие для введения инъекцией, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Подходящие для внутривенного введения носители включают физиологический солевой раствор,

бактериостатическую воду, кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), а также их соответствующие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования таких покрытий, как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования сурфактантов. Предохранения от действия микроорганизмов можно добиваться за счет использования различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях в композицию будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированной абсорбции инъекционных композиций можно добиваться за счет включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, алюминия моностеарата и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения активного соединения в необходимое количество соответствующего растворителя с одним или с сочетанием ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную среду, которая содержит базовую дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, с получением порошка активного ингредиента с любым дополнительным нужным ингредиентом из их раствора, предварительно простерилизованного фильтрованием.

Предпочтительные инъекционные фармацевтические композиции содержат эксципиенты, такие как L-гистидин, L-гистидина моногидрохлорид, моногидрат, хлорид натрия (NaCl), полисорбат 80.

Значение pH инъекционной фармацевтической композиции составляет примерно 5,8-6,2. Предпочтительно значение pH инъекционной фармацевтической композиции составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело, такое как NI-0501, сформулировано (в расчете на мл) следующим образом: 5 мг NI-051, 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет 6,0 $\pm$ 0,2.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция упакована в виде стандартной дозы. Стандартная доза содержится в контейнере. Контейнер представляет собой стеклянный или пластиковый контейнер. Контейнер представляет собой шприц, флакон, бутылку для инфузии, ампулу или карпулу. Контейнер может вмещать объем 1-25 мл. Например, контейнер может вмещать объем 2, 5, 10 или 20 мл.

Стандартная доза полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона гамма (IFN γ) (например, NI-501) составляет 5-25 мг/мл. Предпочтительно, стандартная доза составляет 5 мг/мл или 25 мг/мл. Антитело находится в растворе (например, в воде для инъекций), содержащем в расчете на мл: 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к контейнеру со стандартной дозой, содержащему 20 мл раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона-гамма (IFN γ) в концентрации 5 мг/мл или 25 мг/мл, при этом значение pH раствора составляет от 5,8 до 6,2. Антитело солибилизовано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок. Предпочтительно, антитело находится в растворе (например, в воде для инъекций), содержащем в расчете на мл: 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80.

В других вариантах осуществления изобретение относится к контейнеру со стандартной дозой, содержащему 10 мл или 20 мл раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона-гамма (IFN γ) в концентрации 2 5 мг/мл, при этом значение pH раствора составляет от 5,8 до

6,2. Антитело солибилизировано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок. Предпочтительно, антитело находится в растворе (например, в воде для инъекций), содержащем в расчете на мл: 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80.

В других вариантах осуществления изобретение относится к контейнеру со стандартной дозой, содержащему 2 мл или 10 мл раствора полностью человеческого моноклонального антитела против интерферона-гамма (IFN γ) в концентрации 5 мг/мл, при этом значение pH раствора составляет от 5,8 до 6,2. Антитело солибилизировано в растворе так, что раствор является прозрачным, бесцветным и не содержит осадок. Предпочтительно, антитело находится в растворе (например, в воде для инъекций), содержащем в расчете на мл: 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80.

Пероральные композиции, как правило, содержат инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения активное соединение можно объединять с эксципиентами и использовать в форме таблеток, лепешек или капсул. Пероральные композиции также можно получать с использованием жидкого носителя для применения в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяют перорально, полощут рот и слезывают или проглатывают. В композицию также можно включать фармацевтически приемлемые связывающие вещества и/или адъюванты. Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки, и тому подобное, могут содержать любые из следующих ингредиентов, или соединения аналогичной природы: связывающее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновая вкусо-ароматическая добавка.

Для введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозоля, распыляемого из находящегося под давлением контейнера или дозирующего устройства, содержащего соответствующий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или из небулайзера.

Системное введение также можно осуществлять через слизистую оболочку или через кожу. Для введения через слизистую оболочку или через кожу в составе используют пенетранты, подходящие для барьера, через который будет происходить проникновение. Такие пенетранты, как правило, известны в данной области и включают, например, для введения через слизистую оболочку, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Введение через слизистую оболочку можно выполнять с использованием назальных спреев или суппозиториев. Для введения через кожу активные соединения формулируют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как хорошо известно в данной области.

Соединения также могут быть сформулированы в форме суппозиториев (например, с общепринятыми основами для суппозиториев, такими как масло какао и другие глицериды) или находиться в удерживающих клизмах для ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активные соединения объединяют с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, формулируют в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Методы получения таких составов известны специалистам в данной области. Материалы также могут быть приобретены у компаний Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая нацеленные на инфицированные клетки липосомы с моноклональными антителами против вирусных антигенов) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать методами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительно формулировать пероральные или парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для легкости введения и единообразия дозы. Используемый в настоящем документе термин "стандартная лекарственная форма" означает физически дискретные единицы, содержащие стандартные дозы для индивида, получающего лечение; при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для оказания желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по изобретению диктуется и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который планируется достичь, а также от ограничений, характерных для области создания составов, например, активного соединения, для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или дозирующее устройство вместе с инструкциями по введению.

Обнаружение CXCL9 и других биомаркеров

Уровни CXCL9 и других биомаркеров определяют с использованием любого из множества стан-

дартных методов обнаружения. Можно использовать средства детекции для обнаружения присутствия конкретной мишени (или ее белкового фрагмента) в образце. В некоторых вариантах осуществления средство детекции содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления средство детекции представляет собой антитело (или его фрагмент) или зонд. В некоторых вариантах осуществления средство или зонд является меченым. Термин "меченые" применительно к зонду или антителу охватывает прямое мечение зонда или антитела путем связывания (то есть, физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также не прямое мечение зонда или антитела путем проведения реакции с другим реагентом, который непосредственно является меченым. Примеры использования непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с помощью флуоресцентно меченого вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда биотином, так что его можно обнаруживать с помощью флуоресцентно меченого стрептавидина.

Термин "биологический образец" должен включать ткани, клетки и биологические жидкости, полученные от индивида, а также ткани, клетки и жидкости, находящиеся в теле индивида. Таким образом, термин "биологический образец" охватывает кровь, а также фракцию или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Жидкости тела могут представлять собой жидкости, полученные из какого-либо участка тела индивида, предпочтительно периферической локализации, включая, но без ограничения, например, кровь, плазму, сыворотку, синовиальную жидкость, мочу, мокроту, спинномозговую жидкость, ликвор, плевральную жидкость, жидкость из дыхательных, пищеварительных и мочеполовых путей, слюну, жидкость из органов, асцитную жидкость, кистозную жидкость опухоли, амниотическую жидкость и их сочетания. Биологический образец также включает искусственно разделенные фракции всех из перечисленных жидкостей. Биологические образцы также включают растворы или смеси, содержащие гомогенизированный твердый материал, такой как фекалии, ткани и образцы, полученные при биопсии. Метод обнаружения по изобретению можно использовать для обнаружения аналита мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, *in vitro* методы обнаружения аналита мРНК включают нозерн-гибридизацию и *in situ* гибридизацию. *In vitro* методы обнаружения аналита белка включают иммуноферментные анализы (ELISA), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. *In vitro* методы обнаружения аналита геномной ДНК включают саузерн-гибридизацию. Методики для проведения анализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; и "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, *in vivo* методы обнаружения аналита белка включают введение индивиду меченого антитела против белка-аналита. Например, антитело можно метить радиоактивным маркером, присутствие и локализацию которого у индивида можно определять стандартными методами визуализации.

Определения:

Если нет иных указаний, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь те значения, которые им обычно придают специалисты в данной области. Кроме того, если иное не следует из контекста, термины в единственном числе должны включать термины во множественном числе, и термины во множественном числе должны включать термины в единственном числе. В целом, используемые номенклатуры, а также методы культивирования клеток и тканей, методы молекулярной биологии, а также методы химии белков, олиго- или полинуклеотидов и методы гибридизации, описанные в настоящем документе, хорошо знакомы специалистам и обычно используются в данной области. Для получения рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также для культивирования и трансформации тканей (например, электропорацией, липофекцией) используют стандартные методы. Ферментативные реакции и методы очистки выполняют в соответствии с инструкциями производителя, как обычно принято в данной области или как описано в настоящем документе. Приведенные способы и методики, как правило, используют общепринятым путем, хорошо известным в данной области, и так, как описано в различных литературных источниках общего или специального характера, которые цитируются и обсуждаются в тексте настоящей спецификации. См. например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Используемые номенклатуры, а также лабораторные процедуры и методы аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, создания, формулирования и доставки фармацевтических составов, а также для лечения пациентов используют стандартные методы.

Используемый в настоящем документе термин "доза" означает количество анти-IFN γ антитела, которое вводят индивиду.

Термин "многократные переменные дозы" означает разные дозы анти-IFN γ антитела, которые вводят индивиду для терапевтического лечения. Термины "режим многократных изменяющихся доз" или "терапия многократными переменными дозами" описывают схему лечения, основанную на введении разных количеств анти-IFN γ антитела в разные моменты времени на протяжении курса лечения. В одном

варианте осуществления изобретение относится к способу лечения с использованием многократных изменяющихся доз, включающему индукционную фазу и фазу лечения, при этом анти-IFN γ антитело вводят в более высокой или более низкой дозе во время индукционной фазы, чем во время фазы лечения. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения с использованием многократных изменяющихся доз, включающему индукционную фазу, первую фазу лечения и вторую фазу лечения, при этом анти-IFN γ антитело вводят в более высокой или более низкой дозе во время индукционной фазы, чем во время фазы лечения. Анти-IFN γ антитело можно вводить в более высокой или более низкой дозе во время первой фазы лечения, чем во время второй фазы лечения. Предпочтительно, дозы являются одинаковыми в первой фазе лечения и во второй фазе лечения.

Используемый в настоящем документе термин "индукционная фаза", или "нагрузочная фаза", означает период лечения, включающий введение анти-IFN γ антитела индивиду с целью достижения порогового уровня. Во время индукционной фазы по меньшей мере одну индукционную дозу анти-IFN γ антитела вводят индивиду, страдающему заболеванием, при котором IFN γ наносит вред.

Используемый в настоящем документе термин "пороговый уровень" означает терапевтически эффективный уровень анти-IFN γ антитела у индивида. Порогового уровня достигают путем введения по меньшей мере одной индукционной дозы во время индукционной фазы лечения. Можно вводить любое количество индукционных доз для достижения порогового уровня анти-IFN γ антитела. После достижения порогового уровня начинают фазу лечения.

Термин "индукционная доза", или используемый взаимозаменяемо термин "нагрузочная доза", означает первую дозу анти-IFN γ антитела, которая является либо более высокой, либо более низкой, чем поддерживающая или лечебная доза. Индукционная доза может представлять собой одну дозу или, альтернативно, серию доз. Индукционную дозу часто используют для доведения количества лекарственного средства в организме до стационарного состояния, и могут использовать для быстрого достижения устойчивых уровней лекарственного средства. За введением индукционной дозы следует введение меньшей или большей дозы анти-IFN γ антитела, то есть, лечебной дозы. Индукционную дозу вводят во время индукционной фазы курса терапии.

Используемый в настоящем документе термин "фаза лечения", или "фаза поддержания", означает период лечения, включающий введение анти-IFN γ антитела индивиду с целью поддержания желаемого терапевтического эффекта. Фаза лечения следует за индукционной фазой и, следовательно, она начинается после достижения порогового уровня. Можно использовать более одной фазы лечения, то есть, фазы лечения укорачивают или продлевают для поддержания определенного порога или для достижения желаемого клинического результата. Предпочтительно, в фазе лечения вещество вводят каждые 3 дня после введения индукционной дозы (например, начальной дозы). Альтернативно, вещество вводят один или два раза в неделю.

Термин "лечебная доза", или "поддерживающая доза", означает количество анти-IFN γ антитела, получаемое индивидом для поддержания или сохранения желаемого терапевтического эффекта. Лечебную дозу вводят после индукционной дозы. Лечебная доза может представлять собой одну дозу или, альтернативно, серию доз. Лечебную дозу вводят во время фазы лечения курса терапии. Лечебные дозы являются более низкими или более высокими, чем индукционная доза, и могут быть одинаковыми между собой при последовательном введении. Если используют более одной фазы лечения, то также могут использовать более одной лечебной дозы.

Термин "режим введения доз", или "режим дозирования", означает режим лечения, основанный на введении определенной серии доз.

Используемый в настоящем документе термин "дозирование" означает введение вещества (например, анти-IFN γ антитела) для достижения терапевтической цели (например, лечения связанного с IFN γ заболевания).

Используемые в настоящем документе термины "режим дозирования раз в две недели", "дозирование раз в две недели" и "введение раз в две недели" означают расписание введение вещества (например, анти-IFN γ антитела) индивиду для достижения терапевтической цели (например, лечения связанного с IFN γ заболевания). Режим дозирования раз в две недели не должен включать режим дозирования раз в неделю.

Термин "сочетание", например, в выражении "первое средство в сочетании со вторым средством", означает совместное введение первого средства и второго средства, которые, например, могут быть растворены или смешаны в одном и том же фармацевтически приемлемом носителе, либо введение первого средства, а затем второго средства, или введение второго средства, а затем первого средства. Таким образом, настоящее изобретение включает способы комбинированной терапии и комбинированные фармацевтические композиции.

Термин "сопутствующие", например, в выражении "сопутствующая терапия", означает введение средства в присутствии второго средства. Способ сопутствующей терапии включает способы, в которых первое, второе, третье или дополнительные средства вводят совместно. Способ сопутствующей терапии также включает способы, в которых первое или дополнительные средства вводят в присутствии второго

или дополнительных средств, при этом второе или дополнительные средства, например, могут быть введены заранее. Способ сопутствующей терапии может быть осуществлен поэтапно разными операторами. Например, один оператор может вводить индивиду первое средство, и второй оператор может вводить индивиду второе средство, и этапы введения могут быть выполнены одновременно, или почти одновременно, либо в разные моменты времени, при условии, что первое средство (и дополнительные средства) после введения будет находиться в присутствии второго средства (и дополнительных средств). Оператор и индивид могут относиться к одной категории (например, быть людьми).

Используемый в настоящем документе термин "комбинированная терапия" означает введение двух или более терапевтических средств, например, анти-IFN γ антитела и другого лекарственного средства, такого как БПП или НПВП. Другое лекарственное средство(а) можно вводить в процессе, до или после введения анти-IFN γ антитела.

Варианты осуществления

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, антитело NI-0501 сформулировано в виде стерильного концентрата для инфузии (в расчете на мл). В некоторых вариантах осуществления NI-0501 сформулировано следующим образом: 5 мг NI-051, 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет от 5,8 до 6,2. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 сформулировано следующим образом: 5 мг NI-051, 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет 6,0.

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с HLH. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых популяциях пациентов, например, пациентов с низкой массой тела и/или очень молодых пациентов, в/в инфузию можно выполнять в течение более чем одного часа, например, по меньшей мере 90 минут, по меньшей мере 2 часов или по меньшей мере 3 часов, или более.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем по меньшей мере одной дополнительной в/в инфузии после первоначальной в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в дозе, которая выше, чем начальная доза 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза по меньшей мере одной дополнительной в/в инфузии составляет 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют по меньшей мере через три дня после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем по меньшей мере одной серии дополнительных в/в инфузий после первоначальной в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг, при этом серия дополнительных в/в инфузий включает по меньшей мере одну серию в/в инфузий два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе, более высокой, чем начальная доза 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют по меньшей мере через три недели после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем по меньшей мере двух дополнительных в/в инфузий после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две дополнительные в/в инфузии выполняют в дозе, более

[illegible][illegible]

чальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления первая дополнительная в/в инфузия включает, по меньшей мере, первую серию в/в инфузий два раза в неделю, и вторая дополнительная в/в инфузия включает по меньшей мере вторую серию в/в инфузий два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления первую серию в/в инфузий два раза в неделю и вторую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе, более высокой, чем начальная доза 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе 3 мг/кг и вторую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют по меньшей мере через три дня после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии, и вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы, с последующими инфузиями два раза в неделю, начиная по меньшей мере через 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления дозу инфузии увеличивают до 3 мг/кг в любое время после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления после минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг дозу NI-0501 увеличивают до 6 мг/кг для последующих вплоть до четырех инфузий.

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с HLH. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы, с последующими инфузиями два раза в неделю, начиная по меньшей мере через 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления дозу инфузии увеличивают до 3 мг/кг в любое время после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления после минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг дозу NI-0501 увеличивают до 6 мг/кг для последующих вплоть до четырех инфузий.

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с HLH. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в дозе, превышающей 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем в/в инфузии после введения начальной дозы во второй дозе, превышающей 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет по меньшей мере 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение 1 недели. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10

мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение более 2 недель.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с вторичным HLH. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с вторичным HLH на фоне sJIA. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, в начальной дозе 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления лечение NI-0501 продолжают, используя следующую дозу NI-0501. В некоторых вариантах осуществления лечение NI-0501 продолжают, используя следующую дозу NI-0501, составляющую 3 мг/кг, каждые 3 дня в течение по меньшей мере 4 недель (то есть, до SD27).

В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью NI-0501 приостанавливают, останавливают или иным образом сокращают после достижения желаемого клинического результата. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью NI-0501 сокращают после появления свидетельств полного клинического ответа, то есть, ремиссии MAS.

В некоторых вариантах осуществления после 4 недель лечения с помощью NI-0501 продолжают дополнительно в течение вплоть до 4 недель (то есть, до SD56) в качестве поддерживающей терапии, по мере необходимости, до достижения ремиссии MAS. В некоторых вариантах осуществления после 4 недель лечения с помощью NI-0501 продолжают дополнительно в течение вплоть до 4 недель (то есть, до SD56) в качестве поддерживающей терапии, по мере необходимости, до достижения ремиссии MAS, с возможностью снижения дозы до 1 мг/кг и увеличения интервала между инфузиями до введения один раз в неделю.

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления симптома, ассоциированного с HLH, в случаях, когда индивиду ранее вводили дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления индивид является пациентом, который ранее не получал лечение (то есть, который ранее не получал лечение HLH), и дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 10 мг/м². В некоторых вариантах осуществления индивид получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при HLH, и дексаметазон вводят в дозе, находящейся в диапазоне от 10 до 5 мг/м². В некоторых вариантах осуществления индивид получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при HLH, и дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 5 мг/м². В некоторых вариантах осуществления индивид получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при HLH, и дексаметазон вводят в дозе менее 5 мг/м².

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят до и/или в процессе и/или после лечения в сочетании с одним или более дополнительными средствами, такими как, в качестве неограничивающего примера, терапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления второе средство представляет собой средство, которое, как известно, используют для лечения HLH. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает по меньшей мере этопозид. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 и дополнительное средство сформулированы в одной терапевтической композиции, и NI-0501 и дополнительное средство вводят одновременно. Альтернативно, NI-0501 и дополнительное средство отделены друг от друга, например, каждое сформулировано в отдельной терапевтической композиции, и NI-0501 и дополнительное средство вводят одновременно, или NI-0501 и дополнительное средство вводят в разные моменты времени в процессе лечения. Например, NI-0501 вводят до введения дополнительного средства, NI-0501 вводят после введения дополнительного средства или NI-0501 и дополнительное средство вводят попеременно. Как описано в настоящем документе, NI-0501 и дополнительное средство вводят в однократных дозах или в многократных дозах.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 и дополнительное средство(а) вводят одновременно. Например, NI-0501 и дополнительное средство(а) можно формулировать в одной композиции или вводить в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 и дополнительное средство(а) вводят последовательно или NI-0501 и дополнительное средство вводят в разные моменты времени в процессе лечения.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивное средство представляет собой циклоспорин А (CsA). В некоторых вариантах осуществления индивид получал CsA до начала введения NI-0501. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает по меньшей мере этопозид. В некоторых вариантах осуществления индивид получал этопозид до начала введения NI-0501.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой вводимый интратекально метотрексат и/или глюкокортикоиды. В некоторых вариантах осуществления индивид получал вводимый интратекально метотрексат и/или глюкокортикоиды до начала введения NI-0501.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой вводимые в/в иммуноглобулины (в/в IG). В некоторых вариантах осуществления в/в IG вводят в качестве заместитель-

ной терапии индивиду с установленной иммуноглобулиновой недостаточностью. В некоторых вариантах осуществления, когда индивид имеет установленную иммуноглобулиновую недостаточность, в/в IG вводят в дозе 0,5 г/кг каждые 4 недели, или более часто, для поддержания адекватных уровней IgG.

В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств представляют собой анальгетические средства, препараты крови для переливания, электролиты и глюкозу для инфузий, антибиотики, противогрибковые и противовирусные средства и/или общие поддерживающие препараты.

Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с недостаточностью трансплантата, отторжением трансплантата, и/или воспалительного заболевания, связанного с отторжением трансплантата. Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для лечения, подавления, отсрочки прогрессирования, или иного облегчения симптома реакции трансплантат против хозяина (GvHD) у индивида, который получил или получает трансплантат, содержащий биологический материал, или серию трансплантатов, содержащих биологический материал. Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для продления срока жизнеспособности трансплантированного биологического материала.

Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны в случае трансплантации какого-либо биологического материала, включая, например, клетки, ткань(и), костный мозг и/или орган(ы), в том числе, в качестве неограничивающего примера, сердце, почку, поджелудочную железу, печень и/или кишечник. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой аллогенный биологический материал. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой костный мозг. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой популяцию гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления трансплантируемый биологический материал представляет собой или получен из одного или более гепатоцитов.

При использовании композиций и способов, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, для лечения, профилактики и/или отсрочки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с недостаточностью трансплантата, отторжением трансплантата, и/или воспалительного заболевания, связанного с отторжением трансплантата. В некоторых вариантах осуществления отторжение трансплантата, также называемое в настоящем документе недостаточностью трансплантата, является острым. В некоторых вариантах осуществления отторжение трансплантата является сверхострым.

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, антитело NI-0501 сформулировано в виде стерильного концентрата для инфузии (в расчете на мл). В некоторых вариантах осуществления NI-0501 сформулировано следующим образом: 5 мг NI-051, 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет от 5,8 до 6,2. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 сформулировано следующим образом: 5 мг NI-051, 1,55 мг L-гистидина, 3,14 мг L-гистидина моногидрохлорида, моногидрата, 7,31 мг хлорида натрия (NaCl) и 0,05 мг полисорбата 80, при этом значение pH составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления отторжение трансплантата является хроническим. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых популяциях пациентов, например, пациентов с низкой массой тела и/или очень молодых пациентов, в/в инфузию можно выполнять в течение более чем 1 ч, например по меньшей мере 90 мин, по меньшей мере 2 ч или по меньшей мере 3 ч, или более.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем по меньшей мере одной дополнительной в/в инфузии после первоначальной в/в инфузии в течение 1 ч в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в дозе, которая выше, чем начальная доза 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза по меньшей мере одной дополнительной в/в инфузии составляет 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют по меньшей мере через три дня после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной в/в инфузии и через 15 дней после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной в/в инфузии и через 15 дней после первоначальной в/в инфузии.

В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят индивиду, который нуждается в этом, путем по меньшей мере одной серии дополнительных в/в инфузий после первоначальной в/в инфузии в течение 1 ч в начальной дозе 1 мг/кг, при этом серия дополнительных в/в инфузий включает по меньшей мере одну серию в/в инфузий два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере од-

инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую дополнительную в/в инфузию выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии и вторую дополнительную в/в инфузию выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления первая дополнительная в/в инфузия включает, по меньшей мере, первую серию в/в инфузий два раза в неделю и вторая дополнительная в/в инфузия включает, по меньшей мере, вторую серию в/в инфузий два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления первую серию в/в инфузий два раза в неделю и вторую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе, более высокой, чем начальная доза 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе 3 мг/кг, и вторую серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют по меньшей мере через три дня после первоначальной в/в инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют в момент времени, выбранный из группы, состоящей из момента времени через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии. В некоторых вариантах осуществления первую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 дня после первоначальной в/в инфузии, через 6 дней после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии, и вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления инфузии выполняют каждые 3 дня после введения начальной дозы в течение срока вплоть до 15 дней после введения начальной дозы, с последующими инфузиями два раза в неделю, начиная по меньшей мере через 15 дней после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления дозу инфузии увеличивают до 3 мг/кг в любое время после введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления после минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг дозу NI-0501 увеличивают до 6 мг/кг для последующих вплоть до четырех инфузий.

Данное изобретение также относится к композициям и способам, полезным для идентификации или более точного определения группы пациентов, страдающих заболеванием, при котором пациент имеет повышенный уровень CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более дополнительными связанными с интерфероном γ (IFN γ) биомаркерами. В частности, изобретение относится к композициям и способам для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, стра-

дающих, или предположительно страдающих, гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH). В частности, изобретение относится к композициям и способам для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, синдромом активации макрофагов (MAS). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, MAS в контексте аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, MAS в контексте системного аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, MAS в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (sJIA). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих MAS в контексте системной красной волчанки (СКВ).

Пациентов, идентифицированных, как имеющие повышенные уровни CXCL9, считают подходящими кандидатами для лечения средством (например, антителами или другими терапевтическими средствами на основе полипептидов, терапевтическими средствами на основе пептидов, низкомолекулярными ингибиторами, терапевтическими средствами на основе нуклеиновых кислот и их производных), которое препятствует или является антагонистом одного или более видов биологической активности IFN γ , таких как, например, сигнализация IFN γ , и нейтрализует по меньшей мере одну биологическую активность IFN γ .

У некоторых пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, заболеванием, жидкости тела и другие биологические образцы содержат повышенные уровни CXCL9, отдельно или в сочетании с другими связанными с IFN γ биомаркерами, такими как, например, CXCL10 и/или CXCL11.

CXCL9 и указанные другие биомаркеры являются индикаторами *in vivo* продуцирования IFN γ . Таким образом, использование анти-IFN γ антагониста, который препятствует, ингибирует, снижает или иным образом проявляет антагонизм в отношении сигнализации IFN γ , например, нейтрализующего анти-IFN γ антитела или другого терапевтического средства на основе полипептидов, терапевтического средства на основе пептидов, низкомолекулярного ингибитора, терапевтического средства на основе нуклеиновых кислот и их производных, приводит к блокированию или иному ингибированию активности IFN γ . Таким образом, композиции и способы полезны для лечения, замедления прогрессирования или ослабления симптома заболевания, которое зависит, вызывается, связано или иным образом подвержено воздействию аберрантной, например, повышенной, экспрессии и/или активности IFN γ , аберрантного продуцирования провоспалительных цитокинов, и/или их сочетания, путем введения анти-IFN γ антагониста, например нейтрализующего анти-IFN γ антитела или другого терапевтического средства на основе полипептидов, терапевтического средства на основе пептидов, низкомолекулярного ингибитора, терапевтического средства на основе нуклеиновых кислот и их производных, пациентам, имеющим повышенные уровни экспрессии CXCL9 и/или других биомаркеров. Пациентов, которые, вероятно, являются подходящими кандидатами для лечения анти-IFN γ антагонистом, например нейтрализующим анти-IFN γ антителом, таким как те, которые описаны в настоящем документе, идентифицируют путем определения уровня CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более связанными с IFN γ лигандами или другими биомаркерами. В некоторых вариантах осуществления пациентов, которые не имеют повышенные уровни CXCL9, отдельно или в сочетании с другими связанными с IFN γ биомаркерами, также можно лечить анти-IFN γ антагонистами, включая любые нейтрализующие анти-IFN γ антитела, описанные в настоящем документе, или другие терапевтические средства на основе полипептидов, терапевтические средства на основе пептидов, низкомолекулярные ингибиторы, терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот и их производных.

Пациентов, имеющих повышенные уровни CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более дополнительными связанными с IFN γ биомаркерами, идентифицируют как подходящих кандидатов для терапии одним или более анти-IFN γ антагонистами, например нейтрализующим анти-IFN γ антителом, описанным в настоящем документе. При использовании в настоящем документе выражение "повышенный уровень экспрессии" означает уровень экспрессии, который выше, чем базовый уровень экспрессии CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более дополнительными биомаркерами, в образце от пациента, который не страдает, или предположительно не страдает, первичным или вторичным HLH или связанным с HLH заболеванием, или в другом контрольном образце. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень экспрессии CXCL9 и/или другого биомаркера представляет собой значи-

тельно повышенный уровень.

Определяемый уровень CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более другими связанными с IFN γ биомаркерами, полезен для уточнения или стратификации популяции пациентов. В некоторых вариантах осуществления определяемый уровень используют для определения дозы анти-IFN γ антагониста, которую следует вводить конкретному пациенту. В некоторых вариантах осуществления определяемый уровень используют для категоризации или стратификации популяции пациентов. Например, пациенты могут быть классифицированы, как имеющие "тяжелый" или сильно выраженный MAS, или наоборот, не тяжелый или слабо выраженный MAS, на основании измеренного уровня CXCL9.

Образец представляет собой, например, кровь или компонент крови, например, сыворотку, плазму. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой другую жидкость тела, такую как, в качестве неограничивающего примера, моча, синовиальная жидкость, бронхиальная альвеолярная жидкость, спинномозговая жидкость, бронхоальвеолярный лаваж (BAL) и/или слюна. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой CSF. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой CSF от пациента с HLH.

В дополнение к определяемому уровню IFN γ и/или других связанных с IFN γ биомаркеров, пациентов, подходящих для лечения анти-IFN γ антагонистами, также можно идентифицировать путем оценки любого из целого ряда дополнительных биологических и клинических показателей, которые будут повышать чувствительность и специфичность биомаркеров для идентификации или уточнения популяции пациентов. Альтернативно, эти дополнительные биологические и клинические показатели можно использовать отдельно в качестве средств для идентификации пациентов, являющихся подходящими кандидатами для лечения анти-IFN γ антагонистом или другим соответствующим терапевтическим средством. Эти биологические и клинические показатели включают, в качестве неограничивающего примера, любое из следующего: уровни ферритина, количество нейтрофилов, количество тромбоцитов, уровни аланинаминотрансферазы и/или уровни лактатдегидрогеназы.

Заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов по изобретению, включают любое заболевание, при котором имеет место аберрантная, например повышенная, экспрессия и/или активность IFN γ , в частности, HLH, включая вторичный HLH, MAS и/или sJIA.

В качестве неограничивающих примеров, способы и композиции, предложенные в настоящем документе, подходят для диагностирования и/или лечения таких заболеваний, как первичный и/или вторичный HLH. Соответствующие аутоиммунные и/или воспалительные заболевания включают, в качестве неограничивающего примера, первичный и/или вторичный HLH, ассоциированный с аберрантной экспрессией и/или активностью IFN γ .

После идентификации пациентов, как имеющих повышенные уровни CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более связанными с IFN γ биомаркерами, их лечат анти-IFN γ антагонистом. Например, анти-IFN γ антагонист представляет собой нейтрализующее анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный (например, антигенсвязывающий) фрагмент. Подходящие нейтрализующие анти-IFN γ антитела включают любое из анти-IFN γ антител, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SYAMS (SEQ ID NO: 1); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности EDNQRPS (SEQ ID NO: 5); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит область VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); область VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и область VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной об-

вательности легкой цепи, соответствующей аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность легкой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102, и аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в терапевтически эффективном количестве. "Терапевтически эффективное количество" антитела по изобретению означает, как правило, количество, необходимое для достижения терапевтической цели. Данной терапевтической целью может быть взаимодействие связывания между антителом и его антигеном-мишенью, что в некоторых случаях препятствует функционированию мишени. Общепринятый диапазон терапевтически эффективных доз антитела или фрагмента антитела по изобретению может составлять, в качестве неограничивающего примера, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела. Общепринятая частота дозирования может находиться в диапазоне, например, от введения два раза в сутки до введения один раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в начальной дозе, то есть, нагрузочной дозе, находящейся в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 2 мг/кг, например, в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 1,5 мг/кг и/или от примерно 0,5 до примерно 1,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в начальной дозе примерно 1,0 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в начальной нагрузочной дозе, за которой следуют одна или более поддерживающих доз. В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз представляют собой дозу, которая практически аналогична начальной нагрузочной дозе. В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз представляют собой дозу, которая меньше, чем начальная нагрузочная доза. В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз представляют собой дозу, которая больше, чем начальная нагрузочная доза.

В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз включают по меньшей

мере две или более доз, при этом все поддерживающие дозы представляют собой одну и ту же дозу. В некоторых вариантах осуществления две или более поддерживающих доз практически аналогичны начальной нагрузочной дозе. В некоторых вариантах осуществления две или более поддерживающих доз больше, чем начальная нагрузочная доза. В некоторых вариантах осуществления две или более поддерживающих доз меньше, чем начальная нагрузочная доза.

В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз включают по меньшей мере две или более доз, при этом все поддерживающие дозы не являются одной и той же дозой. В некоторых вариантах осуществления две или более поддерживающих доз вводят в порядке повышения дозы. В некоторых вариантах осуществления две или более поддерживающих доз вводят в порядке понижения дозы.

В некоторых вариантах осуществления одна или более поддерживающих доз включают по меньшей мере две или более доз, при этом каждую поддерживающую дозу вводят периодически, через определенные интервалы времени. В некоторых вариантах осуществления две или более доз вводят через увеличивающиеся интервалы времени. В некоторых вариантах осуществления две или более доз вводят через уменьшающиеся интервалы времени.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в начальной нагрузочной дозе, находящейся в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 2 мг/кг, например, в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 1,5 мг/кг и/или от примерно 0,5 до примерно 1,0 мг/кг, за которой следует по меньшей мере одна, например, две или более, три или более, четыре или более, или пять или более поддерживающих доз. В некоторых вариантах осуществления анти-IFN γ антитело или его иммунологически активный фрагмент вводят в начальной нагрузочной дозе примерно 1,0 мг/кг, за которой следует по меньшей мере одна, например, две или более, три или более, четыре или более или пять или более поддерживающих доз.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать анти-IFN γ антитело по изобретению и носитель. Эти фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

Изобретение также относится к наборам для осуществления на практике любого из способов, предложенных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления наборы включают обнаруживающий реагент, специфический для CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более из связанных с IFN γ биомаркеров, а также средство для детекции обнаруживающего реагента.

Далее изобретение будет описано с помощью примеров, которые не ограничивают объем изобретения, изложенный в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Уровни CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN γ при синдроме активации макрофагов (MAS)

Исследования, представленные в настоящем документе, были разработаны для оценки корреляции сывороточных уровней IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов между собой и с лабораторными показателями активности заболевания у пациентов с активным MAS с целью поиска потенциального биомаркера продуцирования IFN γ in vivo.

Циркулирующие уровни IFN γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 измеряли с использованием мультиплексного анализа Luminex у пациентов с sJIA (n=54), из которых 20 имели MAS в момент сбора образцов. Была проведена оценка связи этих циркулирующих уровней с показателями активности заболевания, а также корреляции уровней IFN γ с уровнями CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

Уровни IFN γ и 3 связанных с IFN γ хемокинов (CXCL9, CXCL10 и CXCL11) были значительно повышены при активном MAS в сравнении с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов (все р-значения <0,005). При активном MAS лабораторные показатели тяжести заболевания (уровни ферритина, нейтрофилов, тромбоцитов, аланинаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы) в значительной степени коррелировали с уровнями IFN γ и CXCL9, и в меньшей степени с уровнями CXCL10 и CXCL11; не было обнаружено корреляции с уровнями IL-6. У пациентов с активным sJIA без MAS отсутствовала существенная корреляция между лабораторными показателями и уровнями цитокинов, как видно из табл. 7, ниже. При активном MAS уровни IFN γ в значительной степени коррелировали с уровнями CXCL9 ($r=0,69$; $r^2=0,47$; $p=0,001$), в меньшей степени с уровнями CXCL10 ($r=0,53$; $r^2=0,28$; $p=0,015$) и не коррелировали с уровнями CXCL11 ($r=-0,04$; $p=0,886$).

Таблица 7. Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с MAS и у пациентов с активным sJIA

	Синдром активации макрофагов	IFN γ		CXCL9		CXCL10		CXCL11		IL-6	
		r*	p	r*	p	r*	p	r*	p	r*	p
Ферритин	8000 (3159-13174)	0,57	0,014	0,49	0,041	0,66	0,002	0,62	0,023	0,17	>0,1
N	6,9 (3,4-13,9)	-0,64	0,005	-0,61	0,010	-0,37	>0,1	-0,08	>0,1	0,09	>0,1
PLT	198 (115-392)	-0,53	0,017	-0,52	0,022	-0,58	0,008	-0,22	>0,1	-0,02	>0,1
ALT	46 (18-164)	0,49	0,045	0,49	0,044	0,51	0,038	0,06	>0,1	-0,44	0,080
LDH	1152 (722-2135)	0,45	0,095	0,62	0,013	0,64	0,010	0,64	0,048	0,09	>0,1
	Системный ювенильный идиопатический артрит	IFN γ		CXCL9		CXCL10		CXCL11		IL-6	
		r*	p	r*	p	r*	p	r*	p	r*	p
Ферритин	215 (38-1669)	-0,27	>0,1	0,28	>0,1	0,27	>0,1	0,29	>0,1	-0,12	>0,1
N	8,4 (5,2-14,5)	0,30	>0,1	0,40	0,061	0,32	>0,1	0,40	0,067	0,28	>0,1
PLT	444 (353-544)	0,21	>0,1	-0,14	>0,1	-0,13	>0,1	0,27	>0,1	0,35	0,064
ALT	16 (11-24)	0,29	>0,1	0,42	0,049	0,50	0,011	0,44	0,039	0,04	>0,1
LDH	506 (456-851)	0,07	>0,1	0,49	>0,1	0	>0,1	0,26	>0,1	0	>0,1

N=количество нейтрофилов; PLT=количество тромбоцитов; ALT=аланинаминотрансфераза, I=медиана (IQR); r*=r Спирмена

Высокие уровни IFN γ и CXCL9, наблюдаемые у пациентов с активным MAS, в значительной степени коррелировали с лабораторными показателями тяжести заболевания. У пациентов с активным MAS уровни IFN γ и CXCL9 тесно коррелируют. Поскольку было показано, что CXCL9 индуцируется только IFN γ и никакими другими интерферонами (смотри, например, Groom J.R. and Luster A.D. Immunol Cell Biol 2011, Feb; 89(2):207-15), эти данные демонстрируют, что CXCL9 является биомаркером продуцирования IFN γ при MAS.

Пример 2. Корреляция уровней CXCL9 и IFN γ у пациентов с первичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH)

Приведенные в настоящем документе данные получены в текущем пилотном исследовании фазы 2 с участием пациентов с первичным HLH, которым вводили антитело NI-0501, и от пациентов, которым антитело NI-0501 было предоставлено из соображений гуманности.

Как показано на фиг. 1, сывороточные уровни CXCL9 и IFN γ были измерены с использованием технологии Luminex и Meso Scale Discovery (MSD), соответственно, в образцах, полученных от 6 пациентов с первичным HLH и от 3 пациентов, получавших препарат из соображений гуманности. Были проведены корреляции между концентрациями CXCL9 и общего IFN γ . Была проведена статистическая обработка данных и получены р-значения с использованием критерия Спирмена.

Как показано на фиг. 2, сывороточные уровни CXCL9 и IFN γ до введения доз измеряли с использованием технологии Luminex и MSD, соответственно, в образцах, полученных от 6 пациентов с первичным HLH, и от 3 пациентов, получавших препарат из соображений гуманности. Были проведены корреляции между концентрациями CXCL9 и общего IFN γ . Была проведена статистическая обработка данных и получены р-значения с использованием критерия Спирмена.

Пример 3. Корреляция уровней CXCL9 и IFN γ у пациентов с вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH)

Приведенные в настоящем документе данные получены в обсервационном исследовании с участием пациентов с вторичным HLH, которым вводили антитело NI-0501, и от пациентов, которым антитело NI-0501 было предоставлено из соображений гуманности.

В частности, в исследовании участвовали пациенты с системным ювенильным идиопатическим артритом (sJIA), у которых развился синдром активации макрофагов (MAS, форма вторичного HLH). У этих пациентов также обнаружена корреляция между уровнями CXCL9 или IFN γ и показателями активности заболевания, такими как уровень ферритина, количество тромбоцитов (PLT), количество нейтрофилов (Neu) и уровень аланинаминотрансферазы (ALT).

Как показано на фиг. 3А и 3В, сывороточные уровни CXCL9 и IFN γ были измерены в мультиплексном анализе с использованием технологии Luminex в образцах, полученных от 19 пациентов с MAS, вторичным по отношению к sJIA, и у 24 пациентов с активным sJIA в момент сбора образцов. Были проведены корреляции между концентрациями CXCL9 и IFN γ . Была проведена статистическая обработка данных и получены р-значения с использованием критерия Спирмена.

Как показано на фиг. 4А-1, 4А-2, 4В-1, 4В-2, 4С-1, 4С-2, 4Д-1 и 4Д-2, сывороточные уровни CXCL9 и IFN γ были измерены в мультиплексном анализе с использованием технологии Luminex в образцах от пациентов с MAS, вторичным по отношению к sJIA, и пациентов с активным sJIA в момент сбора образцов. Были проведены корреляции между уровнями IFN γ или CXCL9 и уровнем ферритина, количеством тромбоцитов, количеством нейтрофилов или уровнем ALT (аланинаминотрансферазы). Была проведена статистическая обработка данных и получены р-значения с использованием критерия Спирмена.

Пример 4. Корреляция уровней CXCL9 и IFN γ у пациента с тяжелым гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH)

Приведенные в настоящем документе данные получены от пациента, которому антитело NI-0501 было предоставлено из соображений гуманности. У этого пациента проявлялись симптомы NLRC4-связанного заболевания и тяжелого гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH). Недавно сообщалось, что мутации в гене NLRC4 вызывают рецидивирующий синдром активации макрофагов и увеличение продуцирования IL-18, который, как известно индуцирует IFN γ .

Пациент в данном исследовании имел следующие характеристики: начало в возрасте 20 недель с проявлениями в виде лихорадки, сыпи, выраженной гепатоспленомегалии, панцитопении, гипофибриногенемии, гипертриглицеридемии, заметно повышенных уровней ферритина и SCD25. После развития полиорганной недостаточности потребовалась госпитализация в отделение интенсивной терапии. Диагноз HLH был основан на 6 из 8 критериев руководства HLH-2004. Результаты анализа генов, вызывающих первичный HLH (PRF1, UNC13D, STXBP2, STX11, RAB27A, XIAP), и функциональных тестов (экспрессия перфорина, дегрануляция и цитотоксичность) были отрицательными. В/в введение глюкокортикоидов в высокой дозе и в/в введение циклоспорина-А, с прогрессирующим улучшением общего состояния и лабораторных показателей. Реактивация HLH, инициированная инфекциями (*Candida albicans* и *Klebsiella pneumoniae*, сепсис), быстрое ухудшение общего состояния и повторное поступление в отделение интенсивной терапии. Лечение этопозидом и/или ATG не рассматривалось из-за наличия активных инфекций у индивида, уже имеющего иммунную недостаточность.

Были зарегистрированы поддающиеся измерению уровни IFN γ и высокие сывороточные уровни IFN γ -индуцируемых хемокинов CXCL9 и CXCL10, а также заметно повышенные сывороточные уровни IL-18 (табл. 8).

Таблица 8. Уровни IFN γ , связанных с IFN γ хемокинов и IL-18 в момент начала лечения NI-0501 и в процессе лечения NI-0501

	До лечения	1 месяц после лечения	2 месяца после лечения	3 месяца после лечения	4 месяца после лечения	sJIA* неактивный
Свободный IFN γ (пг/мл)	6,02	н/о	н/о	н/о	н/о	4,2 (3,2-9,3)
CXCL9 (пг/мл)	5670	495,16	207,4	207,4	207,4	901 (466-1213)
CXCL10 (пг/мл)	4400	529,54	201,12	147,84	138	235 (172-407)
CXCL11 (пг/мл)	188,68	н/о	н/о	н/о	н/о	111 (63-187)
IL18 (пг/мл)	>300000	95000	34000	27000	32000	-

*Медиана (межквартильный диапазон)

Лечение NI-0501 из соображений гуманности начинали на фоне введения дексаметазона (13,6 мг/м²) и в/в введения циклоспорина-А. NI-0501 вводили каждые 3 дня, а впоследствии каждые 7 дней в соответствии с фармакокинетикой. Реакции на инфузию не наблюдали. Препарат NI0501 хорошо переносился. Клинические признаки и лабораторные показатели HLH прогрессивно улучшались. Активные текущие инфекции быстро исчезли. Через 5 месяцев лечения пациент оставался в отличном состоянии. Пациент продолжал получать перорально циклоспорин-А (6 мг/кг) и преднизон (0,3 мг/кг, эквивалент 0,9 мг/м² дексаметазона). Все показатели, характерные для HLH, вернулись к норме.

У индивида все еще наблюдались необъяснимые эпизоды воспаления. Анализ NLRC4 показал de novo миссенс-мутацию (T337N). Были отмечены повышенные сывороточные уровни IL-18, что подтверждало важную роль мутации NLRC4. Было продемонстрировано продуцирование IFN γ на высоком уровне за счет наличия высоких концентраций IFN γ в комплексе с NI-0501. IFN γ был полностью нейтрализован, о чем свидетельствовало отсутствие поддающихся обнаружению уровней IFN γ -индуцируемых хемокинов (фиг. 5 и табл. 8). Циркулирующие уровни IL-18 были постоянно повышены.

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что у пациента с тяжелым не поддающимся лечению HLH (вследствие мутации NLRC4) блокирование IFN γ с помощью NI-0501 хорошо переносилось, не вызывало проблем с безопасностью, позволяло контролировать все признаки HLH, позволяло быстро снижать дозы глюкокортикоидов и ассоциировалось с разрешением текущих активных инфекций.

Пример 5. Направленный подход к лечению гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) с использованием NI-0501

Приведенные в настоящем документе данные получены в пилотном исследовании фазы 2 с участи-

ем детей, страдающих первичным НЛН. Первичный НЛН (рНЛН) представляет собой редкое заболевание иммунной регуляции, которое является заведомо смертельным, если не применять лечение. Оно возникает в результате патологической иммунной активации, приводящей к развитию лихорадки, спленомегалии, цитопений и коагулопатии, что может вызывать полиорганную недостаточность и смерть. На основании данных, полученных в моделях первичного и вторичного НЛН (sНЛН) на мышах, получавших лечение анти-IFN γ антителом, а также результатов обсервационных исследований с участием пациентов с НЛН, продуцирование IFN γ на высоком уровне считают критическим фактором, стимулирующим развитие заболевания. Иммуно-химиотерапия, главным образом, режимы лечения на основе этопозида в настоящее время считаются единственными фармакологическими подходами для контроля НЛН и подготовки пациентов к исцеляющей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Несмотря на недавние попытки дальнейшей интенсификации режимов лечения, смертность и частота осложнений остаются высокими, частично из-за связанной с лекарственными средствами токсичности.

Как описано выше, NI-0501 представляет собой полностью человеческое высокоаффинное анти-IFN γ мАт, которое связывает и нейтрализует человеческий IFN γ , оно лежит в основе нового и направленного подхода к контролю НЛН.

Методы: Открытое клиническое исследование фазы 2 проводили в США и Европе для оценки безопасности и эффективности NI-0501 у детей с подтвержденным или подозреваемым рНЛН. NI-0501 вводили в начальной дозе 1 мг/кг каждые 3 дня, с возможным увеличением дозы в зависимости от ФК данных и/или клинического ответа у каждого пациента, на фоне начальной дозы 5-10 мг/м² дексаметазона. Лечение продолжалось от 4 до 8 недель. Оценивали возможность перехода к алло-ТГСК, релевантные показатели тяжести НЛН и показатели 8-недельной выживаемости.

Популяция, вошедшая в исследование: в общей сложности, в исследовании принимали участие 13 пациентов: 8Ж/5М, средний возраст 1,0 год (диапазон 2,5 месяца - 13 лет). Двенадцать пациентов получали NI-0501 в качестве терапии второй линии после получения общепринятой терапии в случае либо реактивации заболевания, отсутствия удовлетворительного ответа на терапию, либо непереносимости терапии. Один пациент получал NI-0501 в качестве терапии 1-й линии. Девять пациентов имели известный для НЛН генетический дефект (3 FHL2, 2 FHL3, 2 GS-2, 1 XLP1, 1 XLP2). Большинство пациентов имели НЛН в тяжелой форме, плохое общее состояние, страдали от сильной токсичности, связанной с предыдущими методами лечения НЛН. Уровень ферритина был повышен у 12/13 пациентов и SCD25 у 8, цитопении имели место у 10 пациентов, спленомегалия у 8, гипофибриногенемия и гипертриглицеридемия у 9. Нарушение функции печени и ЦНС имели место у 7 и 3 пациентов соответственно.

Результаты: В целом, лечение с использованием NI-0501 приводило к значительному улучшению показателей активности НЛН (фиг. 6), и у 9 из 13 пациентов был достигнут удовлетворительный ответ. Для шести пациентов стал возможен переход к ТГСК. Для двух пациентов с хорошо контролируемым НЛН было запланировано проведение ТГСК после нахождения соответствующего донора. Для одного пациента (у которого был достигнут контроль заболевания при использовании NI-0501 в качестве терапии 1-й линии) ТГСК пока не планируется, учитывая отсутствие вызывающей НЛН генной мутации. Одиннадцать из 13 пациентов были живы в течение 8 недель. Признаки и симптомы нарушения функции ЦНС были устранены у 2 подлежащих оценке пациентов. Более чем 50% сокращение дозы дексаметазона было возможным для 50% пациентов в течение первых 4 недель лечения NI-0501.

Оценка биомаркеров, в частности, CXCL9, хемокина, который, как известно, индуцируется исключительно IFN γ , не только позволила продемонстрировать полную нейтрализацию IFN γ , но и выступила в качестве нового показателя для диагностирования НЛН, коррелирующего с продуцированием IFN γ (фиг. 7А и 7В).

Препарат NI-0501 хорошо переносился, и не было выявлено проблем с безопасностью. Не сообщалось ни об одной инфекции, развитию которых, как известно, способствует нейтрализация IFN γ , и у пациентов, не получавших ранее химиотерапию, инфекции отсутствовали. У семи пациентов было отмечено по меньшей мере одно СНЯ, все были оценены независимой комиссией по мониторингу данных (DMC) как не связанные с введением NI-0501. Не наблюдалось каких-либо неожиданных явлений, объясняемых "нецелевыми" эффектами NI-0501 (например, миелотоксичность, гемодинамические эффекты).

Выводы: Направленная нейтрализация IFN γ с использованием NI-0501 является инновационным и потенциально менее токсичным подходом к контролю НЛН. Результаты данного исследования показывают, что введение NI-0501 является безопасным и эффективным вариантом лечения для пациентов с первичным НЛН, которые неудовлетворительным образом отвечают на общепринятую терапию или не способны ее переносить. Более того, терапия с использованием NI-0501 не связана с какой-либо типичной краткосрочной или долгосрочной токсичностью, ассоциированной с режимами лечения на основе этопозида. В настоящее время продолжается оценка применения NI-0501 в качестве терапии 1-й линии у пациентов с рНЛН, ожидается, что могут быть достигнуты аналогичные значительные клинические успехи.

Пример 6. Повышенные циркулирующие уровни интерферона- γ и индуцируемых интерфероном хемокинов характерны для пациентов с синдромом активации макрофагов, являющимся осложнением системного ЮИА

Интерферон-гамма (IFN γ) является основным медиатором в мышинных моделях первичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH). Учитывая сходство между первичным и вторичным HLH (втор- HLH), включая синдром активации макрофагов (MAS), анализировали уровни IFN γ и его биологическую активность у пациентов с системным ювенильным идиопатическим артритом (sJIA) и MAS.

В исследованиях, описанных в настоящем документе, использовали мультиплексный анализ Luminex для оценки сывороточных уровней IL-1 β , IL-6, IFN γ и индуцируемых IFN и/или связанных с IFN хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 у пациентов с втор- HLH (n=11) и у пациентов с sJIA (n=54), из которых 20 имели MAS в момент сбора образцов. Экспрессию IFN γ -индуцируемых хемокинов (уровни мРНК CXCL9 и CXCL10 в печени и селезенке), а также корреляцию их уровней с сывороточными уровнями ферритина оценивали в модели на трансгенных по IL-6 мышах, у которых признаки MAS индуцировали стимуляцией TLR4 с помощью LPS.

Как более подробно показано ниже, циркулирующие уровни IFN γ и IFN-индуцируемых хемокинов были заметно повышены при MAS, также называемом в настоящем документе активным MAS и втор- HLH. Уровни IFN γ и IFN-индуцируемых хемокинов были заметно выше у пациентов с MAS в сравнении с пациентами, имеющими sJIA без MAS. В этой последней группе уровни IFN γ и IFN-индуцируемых хемокинов были сопоставимы с уровнями у пациентов с клинически неактивным sJIA. При MAS, аномалии лабораторных показателей, характерные для данного синдрома, включая уровни ферритина и аланин-трансаминазы, а также количество нейтрофилов и тромбоцитов, в значительной степени коррелировали с уровнями IFN γ и CXCL9. В мышинной модели MAS сывороточные уровни ферритина в значительной степени коррелировали с уровнями мРНК CXCL9 в печени и селезенке.

Таким образом, результаты исследований, приведенные ниже, показывают, что высокие уровни IFN γ и IFN-индуцируемых хемокинов, а также их корреляция, в частности, в случае CXCL9, со степенью аномалии лабораторных показателей MAS указывают на то, что IFN γ играет ключевую роль в MAS. Повышенные циркулирующие уровни интерферона- γ и интерферон-индуцируемых хемокинов характерны для пациентов с синдромом активации макрофагов, являющимся осложнением системного ЮИА.

Материалы и методы

Пациенты и образцы.

Образцы периферической крови собирали от пациентов, страдающих sJIA с, или без, MAS, в 3 педиатрических ревматологических центрах: Ospedale Pediatrico Bambino Gesù в Риме, Istituto Giannina Gaslini в Генуе и Медицинском центре детской больницы Цинциннати. Были изучены пятьдесят четыре пациента с sJIA (возраст в начале заболевания 7,9 лет, межквартильный диапазон 4,6-13,6 лет; 48% женского пола), соответствующие классификационным критериям ILAR для системного артрита (Petty, R.E., et al., International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. J Rheumatol, 2004. 31(2): p. 390-2). У двадцати из пациентов с sJIA образцы были собраны во время эпизодов активного резко выраженного MAS, который был диагностирован лечащими врачами в каждом из трех центров. Апостериорный анализ показал, что 17 из этих 20 эпизодов (85%) отвечали новым предложенным квалификационным критериям MAS (Minoia F, Davi S, Bovis F, et al. Development of new classification criteria for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. Pediatric Rheumatology 2014, 12 (Suppl 1):O1.). Были доступны образцы от двадцати восьми пациентов с активным sJIA без признаков MAS. Тридцать пять образцов были доступны от 35 пациентов с sJIA (как имеющих, так и не имеющих MAS в их истории болезни) в стадии клинически неактивного заболевания, определенного в соответствии с критериями Уоллеса (Wallace, C.A., et al., Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol, 2004. 31(11): p. 2290-4).

Поскольку было показано, что уровни IFN γ повышены у пациентов с втор- HLH (ревматическое заболевание было исключено), образцы собирали также от 11 пациентов (возраст в начале заболевания 8,6 лет, межквартильный диапазон 4,1-12,9 лет; 36% женского пола) с втор- HLH, наблюдаемых в Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, и использованы в качестве положительных контролей. Все пациенты с втор- HLH отвечали критериям диагностического руководства HLH-2004 (Henter J.I., et al., HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr Blood Cancer, 2007. 48(2): p. 124-31): 6 пациентов отвечали 5 критериям и 5 пациентов отвечали 4 критериям. Следует отметить, что уровни SCD25, выраженные в Ед/мл, не удалось определить, поскольку данный тест обычно не проводят в медицинском учреждении, где наблюдались эти пациенты. Диагноз первичного HLH был исключен на основании отсутствия болезни в семейном анамнезе, отсутствия патогенных мутаций в генах, которые, как известно, вызывают HLH, и наличия нормальных результатов функциональных анализов (включая активность NK-клеток, экспрессию перфорина и дегрануляцию CD107). У всех 11 пациентов с втор- HLH собирали по одному образцу, все из них были получены во время активного заболевания.

Клинические и лабораторные показатели всех пациентов, относящиеся к постановке диагноза и оп-

ределенные в момент сбора образцов, были собраны в централизованной веб-базе данных исследователями каждого центра. Из 20 пациентов с MAS, от которых были получены образцы во время активного заболевания, 6 не получали никакого лечения в момент сбора образцов, в то время как остальные 14 пациентов уже получали один из видов терапии, специфической для MAS, включая периодический прием глюкокортикоидов, циклоспорина А, анакинры или циклофосфида. Шесть из 11 пациентов с вторичным НЛН в активной фазе заболевания не получали специального лечения в момент сбора образцов, в то время как остальные 5 пациентов уже получали по меньшей мере один из указанных выше терапевтических препаратов. Исследование было одобрено Этической комиссией Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. Письменное согласие было получено для всех участников исследования.

Количественное определение цитокинов

Уровни IL-6, IL-1 β , IFN γ , CXCL9, CXCL10 и CXCL11 анализировали, используя технологию мультиплексного анализа с гранулами Luminex®. Реагенты приобретали у компании Millipore, и все реагенты были предоставлены с наборами Milliplex® MAP. Реагенты готовили в соответствии с протоколом производителя. По 25 мкл/лунку стандартов, пустых проб и проб для проверки качества вносили в двойном повторе в 96-луночный планшет Milliplex MAP, с последующим добавлением 25 мкл Serum Matrix. 25 мкл аналитического буфера добавляли в каждую лунку для образца, с последующим добавлением 25 мкл образца. Образцы добавляли в двойном или тройном повторе, в зависимости от доступного объема образца. Показания с планшета снимали на системе Luminex 200® (Luminex Corp.). Первичные данные получали с использованием программы $\times$ PONENT версии 3.1 (Luminex Corp.), и данные анализировали с использованием программы Milliplex Analyst версии 3.5.5.0 (Millipore). Первичные данные, полученные с помощью программы Milliplex Analyst, затем дополнительно анализировали в специальной макропрограмме для анализа Luminex (NI-Sc-ESM-MAC-012-v01 и Sc-ESM-MAC-013-v01).

Эксперименты на животных

Получение и фенотип трансгенных по IL-6 мышей, а также признаки MAS-подобного синдрома, вызываемого введением лигандов TLR, описаны ранее (Strippoli, R., et al., Amplification of the response to Toll-like receptor ligands by prolonged exposure to interleukin-6 in mice: implication for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(5): p. 1680-8). Мышей содержали в условиях, свободных от специфических патогенов, и обращались с ними в соответствии с национальной политикой в этой области. Протокол исследования был одобрен местной комиссией по этике. Все эксперименты выполняли на мышах в возрасте 10-14 недель. Мышам вводили внутривенно одну дозу 5 мкг/г массы тела липополисахарида (LPS, E. coli серотип 055:B5; Sigma-Aldrich). Мышей умерщвляли через 30 часов. Суммарную РНК экстрагировали из тканей селезенки и печени с использованием Trizol (Life technologies). кДНК получали с использованием набора Superscript Vilo (Invitrogen). Анализы ПЦР в реальном времени выполняли с использованием универсальной смеси TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) с наборами для анализа экспрессии мышинных генов Cxcl9 и Cxcl10 (Applied Biosystems). Данные по экспрессии генов нормировали на экспрессию мышинного гена Hprt (Applied Biosystems). Данные выражены в произвольных единицах (ПЕ), определенных с использованием метода $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Сывороточные концентрации ферритина определяли с использованием коммерчески доступного набора для ELISA (ALPCO Diagnostics) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием программы GraphPad Prism 5. Непрерывные переменные (количественные демографические, клинические и лабораторные данные) выражали в виде медиан и межквартильных диапазонов (IQR), и сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Знаковый ранговый критерий Уилкоксона использовали для сравнения двух парных групп, не предполагая, что распределение различий до-после следует распределению Гаусса. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для оценки связи с лабораторными показателями. Р-значение <0,05 считали показателем статистической значимости.

Результаты:

Повышенные уровни IFN γ и IFN γ -индуцируемых хемокинов у пациентов с MAS. При сравнении пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов с пациентами, у которых образцы собирали во время клинически неактивного заболевания, было установлено, как и ожидалось (de Benedetti, F., et al., Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1991. 34(9): p. 1158-63), что уровни IL-6 были значительно выше у пациентов с активным sJIA ($p < 0,01$) в сравнении с уровнями у пациентов с клинически неактивным заболеванием. Как было установлено в нескольких предыдущих исследованиях активного sJIA, сывороточные уровни IL-1 β были ниже предела обнаружения у большинства пациентов, независимо от состояния активности заболевания. Следует отметить, что отсутствовали различия в уровнях IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов у пациентов с клинически активным sJIA и пациентов с клинически неактивным заболеванием.

При сравнении пациентов, имеющих MAS в момент сбора образцов, с пациентами с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов уровни IL-1 β и IL-6 были сопоставимыми, это указывало на то, что

уровни двух цитокинов, которые, как известно, играют ключевую роль в активном sJIA, не возрастают во время резко выраженного MAS. Следует отметить, что циркулирующие уровни IL-1 β были ниже предела количественной оценки (т.е., 3,5 пг/мл) у большинства пациентов с sJIA при наличии или отсутствии MAS. Напротив, циркулирующие уровни IFN γ были значительно выше у пациентов с активным MAS по сравнению с пациентами с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов. Уровни трех связанных с IFN γ хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 также были значительно выше у пациентов с активным MAS по сравнению с пациентами с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов. Это различие было особенно очевидным в случае CXCL9, медианные уровни которого были примерно в 15 раз выше у пациентов с MAS, чем у пациентов с активным sJIA без MAS.

У пациентов с втор-HLN уровни IFN γ , а также уровни трех связанных с IFN γ хемокинов были заметно повышены. Уровни IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов были в значительной степени неотличимы от уровней у пациентов с MAS, и различия не были статистически значимыми. Кстати, у пациентов с активным MAS и у пациентов с активным втор-HLN уровни IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов были сопоставимы у пациентов, не получающих лечение, и у пациентов, уже получающих лечение.

Уровни IFN γ , а также CXCL9, CXCL10 и CXCL11, были связаны с наличием MAS у отдельных пациентов. На фиг. 8A-8D показаны уровни IFN γ , а также CXCL9, CXCL10 и CXCL11 у отдельных пациентов, от которых были получены парные образцы во время активного MAS и во время активного sJIA без MAS. В соответствии с результатами, полученными в перекрестном анализе, уровни IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов были значительно выше в образцах, полученных во время MAS, при попарном анализе образцов. Кроме того, образцы от некоторых пациентов были получены как до, так и после эпизодов MAS и было показано, что уровни IFN γ и IFN γ -индуцируемых хемокинов возвращаются к норме при разрешении клинических симптомов MAS. Например, один пациент в данном исследовании испытал три эпизода MAS, от него были получены образцы сыворотки во время этих эпизодов, а также во время фаз заболевания без MAS в момент сбора образцов. Дополнительным свидетельством в пользу связи повышенного продуцирования IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов с активным MAS явилось то, что у этого пациента повышенные уровни IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов были обнаружены только во время эпизодов MAS (фиг. 9A-9B).

Уровни IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов коррелируют с аномальными лабораторными показателями MAS. Впоследствии была изучена корреляция уровней IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов с лабораторными показателями MAS в момент сбора образцов. У пациентов с активным sJIA без MAS уровни IFN γ и трех IFN γ -индуцируемых хемокинов не были связаны с лабораторными показателями MAS за одним исключением: уровни CXCL9, CXCL10 и CXCL11 слабо коррелировали с уровнями ALT с величиной r^2 в диапазоне от 0,17 до 0,25 (табл. 2). Значимость этой связи остается неясной; однако следует отметить, что уровни ALT находились в пределах диапазона нормальных значений у всех пациентов с активным sJIA без MAS. У пациентов с MAS в момент сбора образцов не было обнаружено никакой существенной корреляции лабораторных показателей MAS с уровнями IL-1 и IL-6. Напротив, у пациентов с MAS в момент сбора образцов уровни IFN γ и IFN γ -индуцируемых хемокинов были связаны с уровнями ферритина, количествами нейтрофилов и тромбоцитов, а также с повышенными уровнями LDH и ALT, все из которых, как правило, являются аномальными у пациентов с MAS (табл. 2). Корреляции с аномальными лабораторными показателями были особенно очевидны для IFN γ и для CXCL9, за единственным исключением корреляции IFN γ с LDH, которая не была статистически значимой (табл. 2 и фигуры 10A-10J). Опять-таки, как упомянуто выше, данные корреляции отсутствовали у пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов. Один пациент в этой группе имел существенно повышенные уровни IFN γ (336,2 пг/мл), CXCL9 (549400 пг/мл) и CXCL10 (35066 пг/мл). Этот пациент имел особенно тяжелую форму MAS и был госпитализирован в отделении интенсивной терапии с тяжелыми нарушениями функций центральной нервной системы. Это наблюдение дополнительно свидетельствует в пользу гипотезы о том, что существует сильная связь между уровнями IFN γ и CXCL9 и тяжестью заболевания. В совокупности, эти результаты показывают, что повышенное продуцирование IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов является характерным признаком активного MAS, который сильно коррелирует с тяжестью аномалии лабораторных показателей MAS.

Таблица 2. Сывороточные уровни IL-1 β , IL-6, IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 у пациентов с активным вторичным HLH с активным MAS в момент сбора образцов, с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов и с клинически неактивным sJIA

	втор-HLH (n=11)	Активный sJIA			Втор-HLH против MAS	MAS против активного sJIA без MAS
		MAS в момент сбора образцов (n=20)	без MAS (n=28)	Неактивный sJIA (n=35)		
IL-1 β (пг/мл)	<3,5 (<3,5- 10,7)	<3,5 (<3,5- 6,1)	<3,5 (<3,5- 3,8)	<3,5 (<3,5-3,5)	р- значение 0,69	р- значение 0,86
IL-6 (пг/мл)	11,4 (3,2- 49,3)	22,9 (5,5- 45,6)	20,3* (5,9- 54,9)	3,2 (3,2-7,9)	0,56	0,43
IFN γ (пг/мл)	34,7 (23,9- 170,1)	15,4 (5,1- 52,6)	4,9 (3,2-8,6)	4,2 (3,2-9,3)	0,12	0,03
CXCL9 (пг/мл)	33598 (3083- 127687)	13392 (2163- 35452)	837 (471- 2505)	901 (466-1213)	0,23	0,005
CXCL10 (пг/мл)	4420 (799- 8226)	1612 (425- 4309)	307 (199-694)	235 (172-407)	0,19	0,0016
CXCL11 (пг/мл)	1327 (189- 2000)	565 (198- 1007)	122 (62-197)	111 (63-187)	0,30	0,003

Значения представлены в виде медианы (межквартильный диапазон)

*Активный sJIA против клинически неактивного sJIA: p<0,01

Таблица 3. Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с MAS и у пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов

СМ		IFN γ		CXCL9		CXCL10		CXCL11		IL-6	
		r*	p	r*	p	r*	p	r*	p	r*	p
Ферритин	8000 (3158-13174) ¹	0,57	0,014	0,49	0,041	0,66	0,002	0,62	0,023	0,17	>0,1
NEU	6,9 (3,4-13,9) ¹	-0,64	0,005	-0,61	0,010	-0,37	>0,1	-0,08	>0,1	0,09	>0,1
PLT	197 (114-392) ¹	-0,53	0,017	-0,52	0,022	-0,58	0,008	-0,22	>0,1	-0,02	>0,1
ALT	46 (18-164) ¹	0,49	0,045	0,49	0,044	0,51	0,038	0,06	>0,1	-0,44	0,080
LDH	1152 (722-2135) ¹	0,45	0,095	0,62	0,013	0,64	0,001	0,64	0,048	0,08	>0,1
Активный sJIA без СМ											
Ферритин	214 (37-1669) ¹	-0,27	>0,1	0,28	>0,1	0,27	>0,1	0,29	>0,1	-0,12	>0,1
N	8,4 (5,2-14,5) ¹	0,30	>0,1	0,40	0,061	0,32	>0,1	0,40	0,067	0,28	>0,1
PLT	444 (353-544) ¹	0,21	>0,1	-0,14	>0,1	-0,13	>0,1	0,27	>0,1	0,35	0,064
ALT	16 (11-24) ¹	0,29	>0,1	0,42	0,049	0,50	0,011	0,44	0,039	0,04	>0,1
LDH	506 (455-851) ¹	0,07	>0,1	0,49	>0,1	0	>0,1	0,26	>0,1	0	>0,1

NEU=количество нейтрофилов; PLT=количество тромбоцитов; ALT=аланинаминотрансфераза; LDH=лактатдегидрогеназа;

1= Медиана (IQR);

r* = r Спирмена.

Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с MAS и у пациентов с активным sJIA.

Корреляция уровней IFN γ с уровнями IFN γ -индуцируемых хемокинов у пациентов с MAS. Для дальнейшего выяснения связи между IFN γ и тремя IFN γ -индуцируемыми хемокинами у пациентов с MAS оценивали корреляцию уровней IFN γ с уровнями каждого отдельного хемокина. Примечательно, что, судя по всему, CXCL9 в основном, и специфически, индуцируется IFN γ , в то время как CXCL10 и CXCL11 также индуцируются интерферонами I типа. С этим согласуется тот факт, что у пациентов с активным MAS циркулирующие уровни IFN γ в значительной степени коррелировали с уровнями CXCL9 ($r=0,693$; $r^2=0,48$; $p=0,001$), однако в меньшей степени коррелировали с уровнями CXCL10 ($r=0,535$; $r^2=0,29$; $p=0,015$) (фиг. 11A-11F). Корреляция с уровнями CXCL11 также была слабее и не достигала уровня статистической значимости ($r=0,447$; $r^2=0,20$; $p=0,08$) (не показано).

Уровни IFN γ -индуцируемых хемокинов коррелируют с активностью заболевания в мышинной модели MAS. Для дальнейшего изучения связи продуцирования IFN γ -индуцируемых хемокинов с MAS изучали экспрессию этих хемокинов в тканях-мишенях (печени и селезенке) в мышинной модели MAS. В

данной модели клинические и лабораторные признаки MAS индуцируют путем имитации острой инфекции с использованием агониста TLR4 липополисахарида (LPS) на фоне высоких уровней IL-6 у трансгенных по IL-6 мышей (Strippoli et al., *Arthritis Rheum* 2012). Данный подход позволяет воспроизводить то, что происходит у пациентов с sJIA: инфекция может запускать MAS/HLH при наличии активного заболевания, которое действительно характеризуется высокими уровнями IL-6. После индукции с помощью LPS высокие уровни мРНК для CXCL9 и CXCL10 были обнаружены в печени и селезенке трансгенных по IL-6 мышей. Примечательно, что сывороточные уровни ферритина в значительной степени коррелировали с уровнями экспрессии CXCL9 в селезенке и печени, и CXCL10 в печени, демонстрируя связь между связанными с IFN γ предшествующими событиями в тканях-мишенях (то есть продуцированием CXCL9 и CXCL10 в печени и селезенке) и типичными последующими аномалиями лабораторных показателей, такими как высокие уровни ферритина. В совокупности, данные, полученные у пациентов с MAS и в мышинной модели MAS, указывают на четкую связь увеличения продуцирования IFN γ с повышением экспрессии CXCL9 и, в меньшей степени, CXCL10, а также аномальными лабораторными показателями при MAS.

Исследования, проводимые как с пациентами, так и в мышинных моделях p-HLH, продемонстрировали центральную роль IFN γ в патогенезе заболевания. Однако роль IFN γ во втор-HLH, включая MAS в условиях sJIA, оставалась неясной. Данное исследование убедительно продемонстрировало, что высокие уровни IFN γ и IFN γ -индуцируемых хемокинов имели место у пациентов с MAS, возникающем при sJIA. Кроме того, уровни IFN γ , CXCL9 и CXCL10 сильно коррелировали с лабораторными показателями тяжести MAS. В данном исследовании было обнаружено, что сывороточные уровни IFN γ и трех связанных с IFN γ хемокинов были сопоставимыми у пациентов с активным sJIA и пациентов с клинически неактивным заболеванием. Данный результат противоречит мнению о патогенной роли IFN γ в sJIA и, действительно, согласуется с целым рядом наблюдений, сделанных другими авторами. В трех исследованиях экспрессии генов не удалось обнаружить характерный IFN γ -индуцированный профиль генной экспрессии в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов (Fall N., et al., *Gene expression profiling of peripheral blood from patients with untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis reveals molecular heterogeneity that may predict macrophage activation syndrome. Arthritis Rheum*, 2007. 56(11): p. 3793-804; Ogilvie, E.M., et al., *Specific gene expression profiles in systemic juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum*, 2007. 56(6): p. 1954-65; Pascual, V., et al., *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. J Exp Med*, 2005. 201(9): p. 1479-86). После *ex vivo* стимуляции МКПК число клеток, продуцирующих IFN γ , у пациентов с активным sJIA было аналогично таковому у контролей (Lasigle D., et al., *Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLPR3 mutated patients. PLoS One*, 2011. 6(5): p. e20014). У пациентов как с активным, так и с неактивным sJIA, стабильно не были обнаружены повышенные уровни IFN γ в сыворотке или синовиальной жидкости (de Jager, W., et al., *Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. Ann Rheum Dis*, 2007. 66(5): p. 589-98). В поддержку отсутствия участия IFN γ в воспалении суставов при sJIA свидетельствовало то, что CXCL9 и CXCL10 почти не поддавались измерению в синовиальных тканях пациентов с sJIA, в то время как высокие уровни этих хемокинов можно обнаружить в синовиальных тканях пациентов с олигоартикулярным или полиартикулярным ЮИА (Sikora K.A., et al., *The limited role of interferon-gamma in systemic juvenile idiopathic arthritis cannot be explained by cellular hyporesponsiveness. Arthritis Rheum*, 2012. 64(11): p. 3799-808). Недавно полученные результаты на мышцах продемонстрировали, что иммунная стимуляция мышей с нокаутом гена IFN γ полным адьювантом Фрейнда вызывает развитие системного воспалительного синдрома, который включает характерные признаки sJIA, это также свидетельствует в пользу ограниченной роли IFN γ при sJIA (Avau, A., et al., *Systemic juvenile idiopathic arthritis-like syndrome in mice following stimulation of the immune system with Freund's complete adjuvant: regulation by interferon-gamma. Arthritis Rheumatol*, 2014. 66(5): p. 1340-51).

В резком противоречии с этим в данном исследовании были продемонстрированы заметно повышенные уровни IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов у пациентов с активным MAS в момент сбора образцов по сравнению с уровнями у пациентов, имеющих активный sJIA без MAS в момент сбора образцов. Это также было подтверждено в случае отдельных пациентов, у которых были серийно взяты образцы как во время активного MAS, так и во время активного sJIA без MAS. Кстати, в данном исследовании у пациентов, у которых были собраны образцы во время MAS, не было обнаружено значительного увеличения уровней IL-6 или IL-1 β , а также какой-либо связи с лабораторными показателями MAS, это указывало на то, что эти цитокины, хотя и серьезно вовлечены в патогенный механизм sJIA (De Benedetti F., et al., *Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. N Engl J Med*, 2012. 367(25): p. 2385-95; Ruperto N., et al., *Two randomized trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. N Engl J Med*, 2012. 367(25): p. 2396-406), могут не играть ключевую роль в поддержании MAS. Эти данные о повышенных уровнях IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов согласуются с некоторыми полученными ранее результатами. Shimizu с соавторами сообщали, что уровни неоптерина, катаболита гуанозинтри-

фосфата, синтезируемого человеческими макрофагами при стимуляции IFN γ , были выше у пациентов с MAS во время sJIA, чем у пациентов с активным sJIA без MAS (Shimizu M., et al., Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(9): p. 1645-53). Совсем недавно Put с соавторами сообщили о повышенных уровнях IFN γ и CXCL10 у 5 пациентов как с первичным, так и с вторичным HLH, 3 из которых имели MAS в процессе sJIA (Put K., et al., Cytokines in systemic juvenile idiopathic arthritis and haemophagocytic lymphohistiocytosis: tipping the balance between interleukin-18 and interferon-gamma. *Rheumatology (Oxford)*, 2015). Согласно этим результатам, 5 пациентов с активным sJIA без MAS в момент сбора образцов имели заметно более низкие уровни IFN γ и CXCL10 (Put et al., *Rheumatology* 2015).

Интересно, что в настоящем исследовании было обнаружено, что не только уровни IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов были заметно повышены, но также и то, что эти уровни, в частности, уровни CXCL9, четко коррелировали с лабораторными показателями MAS, что указывало на связь с тяжестью заболевания. В качестве дополнительного доказательства связи с тяжестью заболевания в данном исследовании были обнаружены заметно повышенные уровни IFN γ , а также уровни CXCL9 и CXCL10, у одного пациента, страдающего тяжелой формой заболевания с полиорганной недостаточностью и вовлечением центральной нервной системы, с генерализованными судорогами, требующими длительного пребывания в отделении интенсивной терапии.

У пациентов с MAS было обнаружено, что из трех IFN γ -индуцируемых хемокинов CXCL9 демонстрировал самую сильную корреляцию с уровнями IFN γ . Это наблюдение согласуется с установленным фактом, что продуцирование CXCL9, судя по всему, индуцируется специфически, и исключительно, IFN γ в отличие от продуцирования CXCL10 и CXCL11, которые могут индуцироваться также интерферонами I типа (Groom, J.R. and A.D. Luster, CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*, 2011. 89(2): p. 207-15). Это свидетельствует о том, что уровни CXCL9 могут служить чувствительным и специфическим биомаркером активности MAS. Действительно, в настоящем исследовании с использованием мышинной модели MAS, которая имитирует иницирование MAS инфекционным стимулом на фоне высоких уровней IL-6 (Strippoli et al., *Arthritis Rheum* 2012), также было обнаружено, что уровни экспрессии CXCL9 в печени и селезенке в значительной степени коррелировали с циркулирующими уровнями ферритина. Для экспрессии CXCL10 эта корреляция имела место только для уровней в печени, но не для уровней в селезенке. В пользу этого также свидетельствуют результаты, полученные у пациентов с MAS, у которых уровни CXCL9 четко коррелировали со всеми лабораторными показателями MAS. В совокупности, данные результаты, полученные у людей и мышей, демонстрируют, что уровни CXCL9 сильно коррелируют с признаками MAS и продуцированием IFN γ , дополнительно поддерживая гипотезу, что избыточное продуцирование IFN γ играет основную патогенную роль в MAS. Эти наблюдения также согласуются с иммуногистохимическими данными, полученными Put с соавторами при изучении серийных биопсий лимфатических узлов от одного и того же пациента с sJIA, которые были получены во время активного sJIA без MAS, а также во время MAS. Эти авторы сообщают, что CXCL10 и индолламин-2,3-диоксигеназа, оба представляют собой индуцируемые IFN γ белки, были обнаружены на высоких уровнях методами иммуногистохимии в ткани, собранной во время MAS, но не в ткани, собранной во время активного sJIA без MAS (Put et al., *Rheumatology* 2015).

Данные результаты, полученные в случае MAS и в случае втор-HLH, совместно с доступными в литературе результатами у пациентов с п-HLH, поддерживают гипотезу о том, что увеличение уровней IFN γ и связанных с IFN γ хемокинов, в частности, CXCL9, является характерным признаком HLH независимо от основополагающей причины. В этом отношении интересно отметить, что высокие уровни CXCL9 были обнаружены у пациента с рецидивирующим MAS, индуцированным мутацией с приобретением функции в гене NLRC4 (Canna S.W., et al., An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet*, 2014. 46(10): p. 1140-6), это указывало на то, что даже в случае HLH, индуцированного только нарушением регуляции инфламмасом, может иметь место избыточное продуцирование IFN γ .

Данные, полученные в животных моделях п-HLH на мышах как с нокаутом гена перфорины, так и с нокаутом гена Rab27a, однозначно демонстрируют патогенную роль IFN γ . Аналогично, недавно полученные данные в индуцируемой TLR9 модели HLH, модели HLH, вторичного по отношению к инфекции, также продемонстрировали важную роль повышенного продуцирования IFN γ (Behrens, E.M., et al., Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J Clin Invest*, 2011. 121(6): p. 2264-77 и Bautois et al., готовится к печати). Недавние исследования с использованием описанной выше мышинной модели MAS показали, что лечение анти-IFN γ антителом приводит к росту показателей выживаемости и возвращению к норме аномальных клинических и лабораторных показателей, характерных для MAS (Prencipe et al., готовится к печати). В совокупности, результаты данного исследования и данные, полученные на животных, являются обоснованием нейтрализации IFN γ как терапевтического подхода в случае MAS.

Пример 7. Оценка безопасности, переносимости, фармакокинетики и эффективности многократного внутривенного введения анти-IFN γ моноклональных антител против интерферона-гамма пациентам-детям с первичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH)

Исследования, описанные в настоящем документе, были спланированы для определения профиля безопасности и переносимости многократного внутривенного (в/в) введения анти-IFN γ антитела, называемого в настоящем документе NI-0501; для определения эффективности и соотношения польза/риск NI-0501 у пациентов с HLH; для описания фармакокинетического (ФК) профиля NI-0501 у пациентов с HLH; для определения подходящего режима введения доз NI-0501 при HLH; а также для оценки иммуногенности NI-0501.

Доклинические исследования:

Предыдущие исследования показали, что NI-0501 демонстрирует сходные значения аффинности связывания и блокирования активности для IFN γ из видов приматов, отличных от человека, включая макакак-резусов и яванских макаков, но не IFN γ собак, кошек, свиней, кроликов, крыс или мышей. Исследования токсичности и безопасности на яванских макаках показали отсутствие токсичности, связанной с нецелевым действием, при введении NI-0501; еженедельное введение NI-0501 хорошо переносилось; не возникало необходимости в профилактическом приеме антибиотиков и не наблюдалось никаких аномальных гистопатологических или поведенческих особенностей во время этих предварительных исследований.

Вследствие способности NI-0501 к связыванию свободного и связанного с IFN γ R1 IFN γ , проводили исследования для изучения потенциальной способности NI-0501 к опосредованию активностей ADCC и CDC в присутствии мишени. Было продемонстрировано отсутствие активности ADCC и не было отмечено индукции активности CDC.

Клиническое исследование фазы I:

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы I действия однократных нарастающих доз с участием 20 здоровых взрослых добровольцев для изучения безопасности, переносимости и фармакокинетических профилей при однократном внутривенном (в/в) введении NI-0501. Во время данного исследования 6 индивидов получали плацебо, и 3, 3, 4 и 4 индивида (в общей сложности 14 индивидов) получали дозы 0,01, 0,1, 1 и 3 мг/кг NI-0501 соответственно.

ФК анализ NI-0501 продемонстрировал ожидаемый профиль для IgG1 с длительным временем полувыведения (примерно 22 дня), медленное выведение (<0,007 л/ч) и низкий объем распределения (<6 л в среднем).

Всего 41 нежелательное явление (НЯ) наблюдали после начала инфузии лекарственного средства у 14 из 20 индивидов (70%), о 10 из которых сообщали 4 индивида, получающие плацебо. Тридцать шесть (87,8%) НЯ имели слабую интенсивность и 5 (12,2%) имели умеренную интенсивность. Не было отмечено никаких тяжелых или опасных для жизни НЯ. Двадцать три НЯ (56,1%) у 10 из 14 индивидов, испытывавших НЯ, были признаны связанными с лекарственным средством (по меньшей мере с обоснованной вероятностью). Большинство НЯ были однократными, и не наблюдалось связи с увеличением дозы NI-0501. Все инфузии NI-0501 были неосложненными.

Подводя итог вышеизложенному, инфузия NI-0501 хорошо переносилась, и эффекты, наблюдаемые в течение 8 недель мониторинга после инфузии лекарственного средства, не выявили никаких серьезных или неожиданных проблем с безопасностью, вызванных нецелевым действием или иммуногенностью препарата.

Клиническое исследование фазы 2/3.

Материалы и методы:

В данном исследовании участвуют пациенты с первичным HLH. Исследование разделено на три части: скрининг, лечение и последующее наблюдение. Общая схема приведена на фиг. 12.

Подходящие для данного исследования пациенты включают пациентов, не получавших ранее лечение HLH (в настоящем документе также называемых "пациенты первой линии"), либо пациентов, которые ранее получали общепринятую терапию для HLH (в настоящем документе также называемых "пациенты второй линии"), но удовлетворительный ответ на терапию достигнут не был, например, согласно мнению лечащего врача, или налицо были признаки непереносимости терапии. Пациенты, получавшие NI-0501 после неудовлетворительных результатов или непереносимости общепринятой терапии HLH, представляют собой ключевую группу исследования для демонстрации эффективности NI-0501 в качестве терапии второй линии для первичного HLH. Не получавшие ранее лечение пациенты включены в исследование для сбора данных по эффективности и безопасности в условиях терапии первой линии.

Из исследования исключают следующих пациентов: пациентов, которым был поставлен диагноз вторичного HLH вследствие подтвержденного ревматического или неопластического заболевания; пациентов, ранее получавших лечение любыми средствами, истощающими Т-клетки (такими как, например, глобулин против тимоцитов (ATG), анти-CD52 терапевтические средства), в течение предшествующих 2 недель до скрининга, либо получавших лечение любым другим биологическим лекарственным средством в пределах 5-кратного определенного для него периода полувыведения (за исключением ритуксима-

ба в случае документированной инфекции В-клеток вирусом EBV); пациентов с активными инфекциями, вызываемыми микобактериями, Histoplasma Capsulation, Shigella, Salmonella, Campylobacter и Leishmania; пациентов с признаками перенесенного туберкулеза или латентного туберкулеза; пациентов с положительными результатами серологического анализа на антитела к ВИЧ, антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В или гепатита С; пациентов с наличием злокачественного новообразования; пациентов, имеющих другое сопутствующее заболевание или врожденный порок с серьезным влиянием на функцию сердечно-сосудистой системы, легких, печени или почек; пациентов с историей гиперчувствительности или аллергии на любой компонент, используемый при проведении исследования; пациентов с отметкой о вакцинации живой или ослабленной живой (включая BCG) вакциной в течение предшествующих 12 недель до скрининга; и/или беременных или кормящих грудью пациентов женского пола.

В исследовании, описанном в настоящем документе, используют антитело NI-0501 против интерферона-гамма, полностью человеческое моноклональное антитело (мАт) IgG1, направленное против человеческого IFN γ . NI-0501 предоставляют в виде стерильного концентрата для инфузии (на мл), как показано ниже в табл. 4.

Таблица 4. Препарат NI-0501

Ингредиент	Количество (на мл)
NI-0501	5 мг
L-гистидин	1,55 мг
L-гистидина моногидрохлорид, моногидрат	3,14 мг
Хлорид натрия (NaCl)	7,31 мг
Полисорбат 80	0,05 мг
pH	6,0 $\pm$ 0,2

В данном исследовании NI-0501 вводят путем в/в инфузии в течение 1 ч в начальной дозе 1 мг/кг. Данная доза предположительно будет ингибировать в течение 3 дней по меньшей мере 99% эффекта IFN γ у пациентов с исходными концентрациями IFN γ , которые меньше или равны 3400 пг/мл. Инфузии выполняют каждые 3 дня до дня 15 исследования (SD15) (инфузия №6), а затем два раза в неделю. Дозу NI-0501 увеличивают до 3 мг/кг, если возможно, в соответствии с заранее определенными критериями, руководствуясь клиническими и лабораторными результатами у каждого пациента (как описано в табл. 5, ниже), в любой момент на протяжении исследования. После минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг, если после повторной оценки установлено, что клинические и лабораторные критерии, квалифицирующие пациента для получения дозы 3 мг/кг NI-0501, остаются в силе, доза NI-0501 может быть увеличена до 6 мг/кг на период вплоть до четырех инфузий, с регулярным мониторингом клинических и лабораторных показателей HLH. В зависимости от изменения этих параметров доза NI-0501 может быть или i) уменьшена вновь до 3 мг/кг или ii) оставлена на уровне 6 мг/кг для дополнительных в/в инфузий (или быть увеличена до значения, превышающего 6 мг/кг), если ФК и ФД показатели свидетельствуют об избыточно высоком продуцировании IFN γ и, следовательно, быстрой элиминации NI-0501. Дозу можно увеличивать в любой момент на протяжении исследования, если показатели соответствуют клиническим и лабораторным критериям, изложенным в настоящем документе.

Таблица 5. Клинические и лабораторные критерии для принятия решения об увеличении дозы

День исследования (SD)	Доза NI-0501	
В SD0	Начальная доза 1 мг/кг	
В SD3	Увеличение до 3 мг/кг	Необходимые критерии: - если лихорадка продолжается или повторно возникает (если имела место в начале исследования) <u>или</u> - если значительно ухудшается клиническое состояние
С SD6 и далее ^a	Увеличение до 3 мг/кг ^b	Необходимые критерии: - если отсутствует удовлетворительное улучшение клинического состояния <u>и</u> - имеет место по меньшей мере 1 из следующего: <i>Количество тромбоцитов ($\times 10^3$/мкл)</i> если исх. количество $<50 \rightarrow$ нет улучшения до >50 исх. количество 50-100 $\rightarrow$ улучшение менее 30% исх. количество $>100 \rightarrow$ любое уменьшение до <100 <i>АКН (количество/мкл)</i> если исх. количество $<500 \rightarrow$ нет улучшения до >500 исх. количество 500-1000 $\rightarrow$ любое уменьшение до <500 исх. количество $>1000 \rightarrow$ любое уменьшение до <1000 <i>Ферритин (нг/мкл)</i> если исх. уровни $\geq 3000 \rightarrow$ нет улучшения (уменьшение $<20\%$) исх. уровни $<3000 \rightarrow$ любое изменение до >3000 <i>Спленомегалия $\rightarrow$ ухудшение (при клиническом осмотре или УЗИ)</i> <i>Коагулопатия (следует учитывать и D-димер,</i>
		<i>и фибриноген)</i> D-димер если аномалии в начале исследования $\rightarrow$ нет улучшения Фибриноген если исх. уровни $\leq 100 \rightarrow$ нет улучшения исх. уровни $\geq 100 \rightarrow$ любое уменьшение до <100
С SD9 или SD12 и далее ^c	Увеличение до 3 мг/кг ^d	Необходимые критерии: - в случае, если после минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг проведена повторная оценка и установлено, что соответствие вышеприведенным критериям по-прежнему имеет место

^a Доза NI-0501 должна быть увеличена с 1 до 3 мг/кг, если соответствие критериям имеет место после SD6.

^b Если доза NI-0501 уже была увеличена в день SD3, должны быть выполнены по меньшей мере две инфузии в дозе 3 мг/кг перед повторной оценкой соответствия критериям.

^c В зависимости от того, произошло ли увеличение дозы до 3 мг/кг в SD3 или SD6.

^d Для максимум четырех инфузий.

Сокращения: исх.=исходное(ые);

АКН=абсолютное количество нейтрофилов; УЗИ=ультразвуковое исследование.

В этих исследованиях NI-0501 вводят в течение 8 недель и период лечения будет разделен на 2 от-

дельных периода: периоды лечения 1 и 2, как показано на фиг. 12.

После того, как NI-0501 вводят в течение 8 недель, может быть начат кондиционирующий процесс подготовки к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Ожидаемая продолжительность лечения может быть уменьшена, хотя до срока не менее 4 недель, если состояние пациента и наличие донора позволяют проводить трансплантацию. В случае, если подходящий донор не найден к неделе 8, или в случае необходимости отсрочки трансплантации по причинам, не связанным с введением NI-0501, лечение NI-0501 может быть продолжено в контексте долгосрочного последующего исследования, при условии установления благоприятного соотношения польза/риск для пациента.

В данных исследованиях NI-0501 вводят на фоне дексаметазона, доза которого может быть уменьшена в зависимости от состояния пациента. Пациентам, ранее не получавшим лечение, NI-0501 будут вводить на фоне дексаметазона в дозе 10 мг/м². Пациенту, получающему NI-0501 в качестве терапии второй линии для HLH, дексаметазон следует вводить в дозе по меньшей мере 5 мг/м² или в дозе, которую вводили до скрининга, если она выше. Пациенты должны получать дексаметазон, начиная с SD-1.

Дозы дексаметазона могут быть уменьшены в зависимости от состояния пациентов по решению лечащего врача. Схема сокращения доз может быть выбрана лечащим врачом при условии, что дозу дексаметазона на каждом этапе уменьшают не более чем наполовину, и частота изменения не превышает одного раза в неделю.

В случае усугубления заболевания после уменьшения дозы дексаметазона дозу дексаметазона можно увеличивать и поддерживать до тех пор, пока не будет достигнут удовлетворительный ответ по мнению лечащего врача.

Как рекомендовано в руководстве по лечению HLH, пациенты получают профилактическое лечение против *Pneumocystis jiroveci*, грибковой инфекции и *Herpes zoster*, начиная со дня, предшествующего началу лечения NI-0501, до окончания исследования. Пациенты получают профилактическое лечение, начиная со дня, предшествующего началу лечения NI-0501 (то есть, SD-1), до окончания исследования. Например, для предотвращения инфекции *Pneumocystis jiroveci* пациенты могут получать, например, 750 мг/м²/сутки сульфаметоксазола с 150 мг/м²/сутки триметоприма, принимаемые перорально в равно разделенных дозах два раза в сутки в течение 3 последовательных дней в неделю. Для предотвращения грибковой инфекции пациенты могут получать, например, 12 мг/кг флуконазола в сутки с максимальной суточной дозой 400 мг. Для предотвращения инфекции HZ пациенты могут получать, например, 200 мг ацикловира четыре раза в сутки для детей старше двух лет, для детей младше двух лет 100 мг четыре раза в сутки. Эти терапевтические средства будут введены перорально, когда это возможно, в остальных случаях внутривенно.

Пациенты также могут получать любое из множества сопутствующих терапевтических средств, такое как, например, циклоспорин А, вводимые интратекально метотрексат и глюкокортикостероиды, а также другие. Введение циклоспорина А (CsA) можно продолжать в случае его введения пациенту до процедуры скрининга. Введение CsA можно прекращать в любое время. Введение CsA не следует начинать de novo на протяжении исследования после того, как начато введение NI-0501.

Если пациент получает интратекально метотрексат и глюкокортикоиды в момент начала лечения NI-0501, это лечение будет продолжено по мере необходимости. Если проявление симптомов нарушения функций ЦНС имеет место до начала лечения NI-0501, терапию вводимыми интратекально метотрексатом и глюкокортикоидами следует начинать до первого введения NI-0501.

В/в введение иммуноглобулинов (в/в IG) разрешено только в качестве заместительной терапии в случае подтвержденной иммуноглобулиновой недостаточности. Например, в случае подтвержденной иммуноглобулиновой недостаточности, оправдывающей заместительную терапию, в/в IG можно вводить в дозе 0,5 г/кг каждые 4 недели, или более часто, для поддержания адекватных уровней IgG. Любая инфузия в течение 4 недель, предшествующих скринингу, а также любая инфузия во время лечения NI-0501 является приемлемой.

Лечение анальгетическими препаратами, переливание препаратов крови, инфузии электролитов и глюкозы, прием антибиотиков, противогрибковых и противовирусных препаратов, а также общеукрепляющих препаратов допустимы. Применение дополнительных препаратов против HLH может быть разрешено в случае нестабильного или ограниченного ослабления HLH после достижения максимального уровня дозы NI-0501. Используемый в настоящем документе термин "нестабильное ослабление HLH" относится к пациентам, у которых не сохраняется улучшение по меньшей мере на 50% от исходного уровня 3 показателей HLH (см. табл. 6, ниже). По меньшей мере два последовательных измерения должны подтвердить отсутствие ослабления HLH. Используемый в настоящем документе термин "ограниченное ослабление HLH" означает менее чем 50% изменение от исходного состояния минимум 3 клинических и лабораторных показателей HLH. Этопозид следует вводить в качестве дополнительного препарата против HLH, если только из анамнеза не известно об отсутствии ответа на препарат или о непереносимости лекарственного средства пациентом.

Следующие терапевтические препараты нельзя использовать одновременно с введением NI-0501: этопозид, средства, питающие Т-клетки, или любые другие биологические лекарственные средства, как правило, не допустимы, за исключением следующих: G-CSF в случае продолжительной нейтропе-

нии; ритуксимаба в случае документированной инфекции В-клеток вирусом EBV и дополнительных терапевтических препаратов против HLH в случае нестабильного или ограниченного ослабления HLH (как определено в настоящем документе) при использовании максимального уровня дозы NI-0501. Этопозид следует вводить, если только из анамнеза не известно об отсутствии ответа на препарат или о непереносимости лекарственного средства пациентом. Вакцинации живой или ослабленной (включая BCG) вакциной следует избегать на протяжении всего исследования, включая 4 недели периода последующего наблюдения. В случае, если концентрации NI-0501 остаются на терапевтических уровнях после завершения исследования, период времени без вакцинаций следует продлевать до тех пор, пока не перестанет поддаваться измерению концентрация NI-0501.

Изменение клинических признаков (лихорадка, спленомегалия, ЦНС симптомы) и лабораторных показателей (уровни СВС, фибриногена, ферритина, sCD25), характеризующих заболевание, используют для оценки достижения ответа и времени до ответа. Основным критерий эффективности включает общую степень ответа, то есть, достижение либо полного, либо частичного, ответа или ослабления HLH в конце периода лечения (ЕоТ), что определено в табл. 6, ниже. Вторичные критерии эффективности включают время до ответа в любой момент времени на протяжении исследования; устойчивость ответа, то есть, сохранение достигнутого ответа в любой момент времени на протяжении исследования до и после ЕоТ (включая данные, полученные в любом долгосрочном последующем исследовании); количество пациентов, для которых стало возможно снижение дозы глюкокортикоидов на 50% или более от дозы в начале исследования; количество пациентов, которые смогли перейти к ТГСК, если им это было предписано; выживаемость к неделе 8 (или ЕоТ) и к моменту окончания исследования; сывороточная концентрация NI-0501 для определения фармакокинетического (ФК) профиля NI-0501; определение фармакодинамических (ФД) эффектов, включая уровни циркулирующего общего IFN γ и маркеров его нейтрализации, а именно, CXCL9 и CXCL10; и определение других биомаркеров, например, sCD25, IL-10.

Таблица 6. Определение ответа

Общая степень ответа	
Полный ответ	Ответ считают полным, если: - отсутствует лихорадка=температура тела $<37,5^{\circ}\text{C}$ - селезенка имеет нормальный размер, что определяют методом 3D УЗИ брюшной полости - отсутствует цитопения=абсолютное количество нейтрофилов $\geq 1,0 \times 10^9/\text{л}$ и количество тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$ [отсутствие G-CSF и поддерживающего переливания крови должно быть документировано по меньшей мере за 4 дня до решения об отсутствии цитопении] - отсутствие гиперферритинемии=сывороточный уровень <2000 мкг/л - отсутствие признаков коагулопатии, то есть, нормальные уровни D-димера и/или нормальные уровни (>150 мг/дл) фибриногена - отсутствие неврологических и CSF аномалий, связанных с HLH - отсутствие устойчивого ухудшения показателей sCD25 (о чем свидетельствуют по меньшей мере два последовательных измерения, с показателями, >2-кратно превышающими исходные показатели)
Частичный	Ответ считают частичным, если:

ответ	- по меньшей мере 3 из аномальных, характерных для HLN клинических и лабораторных показателей (включая аномалии ЦНС) соответствуют вышеуказанным критериям для «полного ответа». В случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 3 аномальными, характерными для HLN показателями, по меньшей мере 2 показателя должны удовлетворять указанным критериям - отсутствует прогрессирование других патологических признаков HLN (таких как, например, желтушность, размер печени, отек, клинические изменения в ЦНС)
Ослабление HLN	- уменьшение (>50% изменение от исходного значения) по меньшей мере 3 аномальных, характерных для HLN клинических и лабораторных показателей (включая аномалии ЦНС). В случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 2 аномальными, характерными для HLN показателями, изменение от исходного значения, превышающее 50%, для обоих показателей позволяет констатировать ослабление HLN.
Ограниченное ослабление/Отсутствие ослабления/Отсутствие ответа	
- менее чем 50% изменение от исходного значения 3 или более из вышеуказанных аномальных, характерных для HLN клинических и лабораторных показателей [в случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 2 аномальными, характерными для HLN показателями, изменение от исходного значения менее, чем на 50%, для обоих показателей будет достаточным для констатации ограниченного ослабления заболевания] И - отсутствие явного ослабления других патологических аспектов заболевания	
Реактивация	
- ухудшение двух или более клинических и лабораторных показателей HLN со следующими спецификациями: 1. количественные лабораторные показатели* должны стать аномальными и ухудшаться более, чем на 30%, относительно предыдущего измерения при двух последовательных оценках, выполняемых с интервалом минимум 1 день и максимум 1 неделю 2. ухудшение клинических показателей должно быть подтверждено соответствующими наблюдениями ухудшения в течение трех последовательных дней - развитие новых, или повторное возвращение, ЦНС симптомов считают монокритерием для реактивации. <i>* Следующие лабораторные показатели особо учитывают при определении реактивации:</i> - тромбоциты - нейтрофилы - фибриноген - ферритин - растворимый CD25 (sCD25; то есть, растворимый рецептор IL-2). Оценку функции NK, уровней эритроцитов/гемоглобина и триглицеридов нельзя рассматривать при определении реактивации.	

Показатели безопасности, которые следует собирать и оценивать, включают частоту возникновения, тяжесть, причинную обусловленность и исход нежелательных явлений (НЯ) (серьезных и несерьезных), с особым вниманием, уделяемым инфекциям; изменение лабораторных показателей, таких как

полное количество клеток крови (СВС), особенно красных клеток (гемоглобин), нейтрофилов и тромбоцитов, анализы печени, анализы функции почек и свертываемость крови; количество пациентов, выведенных из исследования по соображениям безопасности; а также другие показатели, такие как уровень (в случае их наличия) циркулирующих антител против NI-0501 для определения иммуногенности (ADA).

Основной критерий эффективности (общую степень ответа) оценивают с использованием точного одностороннего биномиального критерия с уровнем значимости 0,025. Время до ответа, устойчивость ответа и время выживания оценивают на основании кривых Каплана-Мейера с рассчитанными медианами, по возможности. 95% доверительные интервалы рассчитывают для медианы для каждого из этих критериев. Дополнительные критерии, основанные на бинарных исходах, включая количество пациентов, для которых доза глюкокортикоидов была снижена на 50% или более, и количество пациентов, которые смогли перейти к ТГСК, будут преобразованы в пропорции и будут рассчитаны соответствующие 95% доверительные интервалы. Статистическая значимость в терминах р-значений будет определена только для основного критерия эффективности. Все другие критерии рассматривают как поддерживающие основной критерий эффективности и, вследствие этого, не заявлена формальная иерархия критериев.

Введение NI-0501 пациентам приводит к быстрой нормализации лихорадочного состояния в течение нескольких часов после первой инфузии NI-0501. На фиг. 13А и 13В показан эффект инфузии NI-0501 на температуру тела у двух пациентов, имеющих температуру тела $>37,5^{\circ}\text{C}$ в момент начала лечения NI-0501. На фиг. 14 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество нейтрофилов у пациентов. На фиг. 15 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество тромбоцитов у пациентов. На фиг. 16 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на сывороточные уровни ферритина у пациентов. На фиг. 17 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на снижение дозы глюкокортикоидов у пациентов. На фиг. 18 приведен график, показывающий, что введение NI-0510 поддерживает нейтрализацию IFN γ до времени проведения ТГСК. Изменение показателей HLN в ответ на введение NI-0501 также сохраняется до трансплантации. Пациенты также были оценены на любые признаки вовлеченности ЦНС после введения NI-0501. Сводные исходные показатели вовлеченности ЦНС и состояние на момент окончания исследования (ЕОТ) приведены ниже в табл. 10.

Таблица 10. Ответ на введение NI-0501 - вовлеченность ЦНС

	Начало исследования (SDO)	ЕОТ
Пациент № 6	Притупление чувствительности; гемипарез	Устранено
	Нарушение темпов развития	Полностью восстановлено
	Повышенное содержание белка и неоптерина в CSF; Плеоцитоз	Устранено
	Аномальная активация на MPT	Скорректировано
Пациент № 3	Повышенное содержание белка в CSF; Плеоцитоз	Устранено
Пациент № 15	Потеря способности к ходьбе	Восстановлено
	Повышенное содержание белка и неоптерина в CSF; Плеоцитоз	Устранено
Пациент № 18*	Плеоцитоз; Повышенное содержание белка в CSF	Скорректировано
	Аксиальная гипотония	Скорректировано
Пациент № 20 [§]	Повышенное содержание белка и неоптерина в CSF; Плеоцитоз	Начальная коррекция
	Парез 6-го нерва; клонус голеностопа	Начальная коррекция
Пациент № 4 [^]	Повышенное содержание белка в CSF; Плеоцитоз	Не поддается оценке
	Аномальные инфильтраты при MPT	Не поддается оценке

Примечание: пациенты получали и/т терапию, за исключением пациента № 4, в случае которого регулярную медикаментозную ЛП не проводили

*Лечение продолжается

§Лечение начато после 2 недель

^Контроль в момент ЕОТ не проводили

Из десяти пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), у всех трансплантация прошла успешно; 1 пациенту потребовалась дополнительная пересадка CD34 стволовых клеток вследствие смешанного химеризма в D+145 после ТГСК. Вторичное отторжение трансплантата произошло у 1 пациента, с последующей реактивацией HLN. Этот пациент умер в D+68 после ТГСК вследствие острой респираторной недостаточности и бактериальных инфекций. Другой пациент умер в D+47 после ТГСК (септический шок в контексте тяжелой формы GvHD). Умеренная реакция GvHD имела место у других 3 пациентов и была устранена/устраняется.

Нейтрализующие сывороточные концентрации NI-0501 во время ТГСК были обнаружены у 8 из 10 пациентов, получающих трансплантаты, о чем свидетельствовали уровни CXCL9 (хемокина, индуцируемого исключительно IFN γ) ниже предела количественной оценки. Таким образом, эти данные показывают, что NI-0501 позволяет избежать краткосрочной или долгосрочной токсичности, наблюдаемой при использовании схем лечения на основе этопозида. Это означает уменьшение риска осложнений, связанных с алло-ТГСК.

Данные результаты демонстрируют, что лечение NI-0501 приводит к ослаблению и/или может приводить к устранению соответствующих клинических и лабораторных аномалий, характерных для HLH, включая признаки и симптомы нарушения функций ЦНС. Ответ на NI-0501 не зависит от наличия и вида вызывающих заболевание мутаций и/или от наличия и вида инфекционного триггера. Препарат NI-0501 хорошо переносился. Никаких проблем с безопасностью не возникло до настоящего времени (например, никакой миелотоксичности, никакой общей иммуносупрессии). Не было обнаружено никаких вызываемых патогенами инфекций, которые, как известно, стимулируются при нейтрализации IFN γ . Нейтрализация IFN γ с помощью NI-0501 может явиться инновационным и направленным подходом к контролю HLH.

Пример 8. Безопасность, переносимость, фармакокинетика и эффективность краткосрочных внутривенных введений NI-0501, моноклонального антитела против интерферона-гамма (анти-IFN γ), у пациентов с системным ювенильным идиопатическим артритом (sJIA), сопровождающимся синдромом активации макрофагов/вторичным HLH (MAS/ в-HLH)

Исследование, описанное в настоящем документе, разработано для демонстрации эффективности и безопасности NI-0501 для лечения MAS/b-HLH у пациентов с sJIA и разделено на две части (i) пилотное исследование для оценки ФК профиля NI-0501 и стратегии дозирования, а также для предварительной оценки соотношения польза/риск для NI-0501 в данной популяции пациентов; и (ii) основное исследование для демонстрации эффективности и безопасности NI-0501 (исследование будет продолжено после утверждения режима дозирования и подтверждения положительного соотношения польза/риск для NI-0501). На фиг. 19 схематически представлен дизайн данного исследования.

Главными целями пилотного исследования являются: (i) определение соответствующего терапевтического режима доз NI-0501 для пациентов, страдающих sJIA с MAS/в-HLH; (ii) оценка соотношения польза/риск для применения NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/b-HLH; и (iii) определение фармакокинетического (ФК) профиля NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/b-HLH. Главными целями основного исследования являются: (i) определение эффективности NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/b-HLH; (ii) оценка профиля безопасности и переносимости краткосрочных внутривенных (в/в) введений NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/b-HLH; (iii) подтверждение положительного соотношения польза/риск для применения NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/в-HLH; (iv) проведение пробной оценки хемокинов CXCL9 и CXCL10 в качестве диагностических биомаркеров MAS/b-HLH и в качестве предикторов ответа на лечение NI-0501 и (v) оценка иммуногенности NI-0501 у пациентов, страдающих sJIA с MAS/в-HLH.

Популяция, вошедшая в исследование, включает пациентов, страдающих sJIA с MAS/в-HLH, которые продемонстрировали неадекватный ответ на лечение глюкокортикоидами в высоких дозах. Критерии включения в исследование являются следующими: (i) пол: мужчины и женщины; (ii) возраст: <16 лет на момент постановки диагноза sJIA; (iii) диагноз активного MAS/b-HLH подтвержден лечащим врачом-ревматологом, с наличием по меньшей мере 2 из следующих лабораторных и клинических критериев: (a) лабораторные критерии: количество тромбоцитов $<262 \times 10^9/\text{л}$, количество белых клеток крови (WBC) $<4,0 \times 10^9/\text{л}$, уровни AST >59 Ед/л и/или уровни фибриногена $\leq 2,5$ г/л; (b) клинические критерии: гепатомегалия, признаки кровотечений и/или дисфункция ЦНС; (iv) пациент, демонстрирующий неадекватный ответ на лечение высокими в/в дозами глюкокортикоидов в течение по меньшей мере 3 дней (включая, но без ограничения, импульсное введение 30 мг/кг mPDN в течение 3 последовательных дней), в соответствии с местным стандартом медицинской помощи; (v) высокая в/в доза глюкокортикоидов не должна быть ниже чем 2 мг/кг/сутки эквивалента mPDN в 2 отдельных суточных дозах, вплоть до 60 мг/сутки. В случае быстрого ухудшения состояния здоровья и/или лабораторных показателей пациента он может быть включен в исследование в течение менее 3 дней от начала введения высокой в/в дозы глюкокортикоидов; (vi) согласие пациента (или согласие его законного представителя(ей)) и (vii) принятие мер контрацепции, если пациент достиг половой зрелости.

Критерии исключения являются следующими: (i) диагноз подозреваемого или подтвержденного первичного HLH или HLH вследствие неопластического заболевания; (ii) пациенты, получавшие лечение: анакинрой, тоцилизумабом, канакинумабом, ингибиторами TNF, ритуксимабом или любым другим биологическим лекарственным средством в пределах 5-кратного определенного для него периода полувыведения; (iii) активные инфекции, вызванные микобактериями (типичные и нетипичные), *Histoplasma capsulatum*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* и *Leishmania*; (iv) признаки латентного туберкулеза; (v) положительные результаты серологического анализа на антитела к ВИЧ; (vi) наличие злокачественных новообразований; (vii) пациенты, имеющие другое сопутствующее заболевание или порок, серьезно влияющий на участие в исследовании.

яющие на функции сердечно-сосудистой системы, легких, ЦНС, печени или почек, которые по мнению исследователя могут серьезно повлиять на вероятность ответа на лечение и/или оценку безопасности NI-0501; (viii) история гиперчувствительности или аллергии на любой компонент, используемый при проведении исследования; (ix) отметка о вакцинации BCG вакциной в течение предшествующих 12 недель до скрининга; (x) отметка о вакцинации другими живыми или ослабленными живыми вакцинами в течение предшествующих 6 недель до скрининга и/или (xi) беременные или кормящие грудью пациенты женского пола.

Режим дозирования, частота введения и продолжительность лечения

В данном исследовании NI-0501 используют в препарате, описанном в примере 7. В части 1 исследования NI-0501 вводят в начальной дозе 6 мг/кг инфузией в течение 1 ч в день SD0. Введение NI-0501 продолжают в дозе 3 мг/кг каждые 3 дня в течение 4 недель (то есть, до дня SD27). Сроки введения NI-0501 могут быть сокращены после достижения полного клинического ответа (то есть, ремиссии MAS). После 4 недель введение NI-0501 может быть продолжено в течение дополнительного срока вплоть до 4 недель (то есть, до дня SD56) в качестве поддерживающей терапии, по мере необходимости, до достижения ремиссии MAS, с возможностью снижения дозы до 1 мг/кг и увеличения интервала между инфузиями до еженедельного введения. Если ФК профиль показывает непредвиденное мишень-опосредованное распределение препарата (TMDD) (что является сигналом чрезвычайно сильного продуцирования IFN γ), дозу NI-0501 можно увеличивать до 10 мг/кг, руководствуясь мнением лечащего врача и ФК показателями. Это увеличение дозы может быть одобрено только после тщательной оценки соотношения польза/риск для этого конкретного пациента.

В части 2 после подтверждения, что предложенный режим дозирования является подходящим и демонстрации положительного соотношения польза/риск для применения NI-0501, исследование будет продолжено. Могут быть использованы небольшие модификации режима дозирования, в случае необходимости, исходя из результатов, полученных в части 1.

Фоновая терапия и сопутствующие препараты

NI-0501 вводят на фоне метилпреднизолона (mPDN) по меньшей мере в дозе 2 мг/кг, эквивалентной дозе до 60 мг/сутки (у пациентов с массой тела 30 кг или более), которая может быть постепенно снижена в процессе лечения в зависимости от состояния пациента. Пациенты получают профилактическое лечение от инфекции Herpes zoster, начиная предпочтительно за день до (и в любом случае, до начала) введения NI-0501 и до тех пор, пока в сыворотке больше не будет обнаружен NI-0501. Введение циклосприна А (CsA) можно продолжать, если оно начато по меньшей мере за 3 дня до начала введения NI-0501. Допускается корректировка дозы CsA для поддержания терапевтических уровней. Введение CsA можно прекращать в любое время в процессе исследования по решению исследователя. Введение CsA нельзя начинать de novo после начала введения NI-0501. Если пациент получает интратекально метотрексат и глюкокортикоиды в момент начала введения NI-0501, это лечение можно продолжать по мере необходимости. Вакцинации живой или ослабленной (включая BCG) вакциной следует избегать в течение всего исследования и, в любом случае, до тех пор, пока в сыворотке больше не будет обнаружен NI-0501. Лечение анальгетическими препаратами, переливание препаратов крови, инфузии электролитов и глюкозы, прием антибиотиков, противогрибковых и противовирусных препаратов, а также общеукрепляющих препаратов, допустимы.

Размер выборки:

В части 1 исследования будут принимать участие по меньшей мере 5 подлежащих оценке пациентов. В части 2 продолжающегося исследования будут принимать участие по меньшей мере 10 подлежащих оценке пациентов для достижения общего количества 15 подлежащих оценке пациентов. Размер выборки 15 пациентов формально не утвержден, учитывая редкий характер заболевания и отсутствие какого-либо утвержденного метода лечения. Тем не менее, исходя из предположения, что по меньшей мере 50% пациентов неадекватно отвечают на системное введение одних только глюкокортикоидов, то есть у 50% пациентов, получающих глюкокортикоиды, наступает ремиссия MAS к неделе 8 после начала лечения, данное исследование будет иметь 70% мощность для обнаружения улучшения состояния от 50 до 77% с использованием одностороннего уровня значимости 5%.

Продолжительность исследования и определение окончания исследования:

Продолжительность исследования будет составлять 8 недель для каждого пациента (плюс период скрининга сроком до 1 недели). Окончанием исследования считают день последнего посещения последнего пациента. Всем пациентам, получившим по меньшей мере одну дозу NI-0501, будет предложено участие в исследовании NI-0501-05 на протяжении долгосрочного периода последующего наблюдения.

Критерии эффективности в исследовании

В части 1 (пилотной) исследования проводится оценка следующих показателей для подтверждения режима дозирования в данной популяции пациентов:

(i) соотношения польза/риск для NI-0501; (ii) ФК профиля NI-0501; (iii) уровней хемокинов, которые, как известно, индуцируются IFN γ (например, CXCL9, CXCL10, CXCL11); (iv) изменения характерных признаков MAS: цитопении, дисфункции печени и коагулопатии через 2, 4, 6 и 8 недель после нача-

ла введения NI-0501 и (v) доз и продолжительности введения NI-0501. В части 2 (основной) исследования критерии эффективности препарата в исследовании являются следующими: (a) основной критерий эффективности: количество пациентов, достигших ремиссии MAS к неделе 8 после начала введения NI-0501; и (b) вторичные критерии эффективности: время до ремиссии MAS; время до первоначального ответа по оценке исследователя; количество пациентов, для которых в любой момент на протяжении исследования доза глюкокортикоидов могла быть постепенно снижена до той же (или меньшей) дозы, которую им вводили до возникновения MAS; время до возможности снижения дозы глюкокортикоидов; выживаемость в конце исследования и количество пациентов, выведенных из исследования вследствие отсутствия эффективности. В части 2 (основной) исследования критерии безопасности являются следующими: (a) частота возникновения, тяжесть, причинная обусловленность и исход НЯ (серьезных и несерьезных), с особым вниманием, уделяемым инфекциям; изменение лабораторных показателей, в частности СВС (в первую очередь гемоглобина, нейтрофилов и тромбоцитов), результатов тестов на функцию печени (LFT) и показателей свертываемости крови; количество пациентов, выведенных из исследования по соображениям безопасности; а также уровни (в случае их наличия) циркулирующих антител против NI-0501 для определения иммуногенности (ADA).

Фармакокинетику и фармакодинамику оценивают на основании ФК профиля NI-0501; уровней циркулирующего свободного IFN γ до введения препарата, а также общего IFN γ (свободного и связанного с NI-0501 IFN γ) после начала введения NI-0501; уровней хемокинов, которые, как известно, индуцируются IFN γ (например, CXCL9, CXCL10, CXCL11); корреляции между уровнями хемокинов (CXCL9, CXCL10) и уровнями свободного NI-0501, свободного IFN γ (до введения препарата) и общего IFN γ ; корреляции уровней хемокинов и общего IFN γ , а также лабораторных показателей тяжести MAS, например уровней ферритина, количества тромбоцитов, результатов LFT (поисковый анализ); и уровней других потенциальных биомаркеров заболевания (например, sCD25, IL-10, IL-6, IL-18, TNF α , неоптерина).

Другие варианты осуществления

Хотя в настоящем документе приведено подробное описание изобретения, вышеуказанное описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения симптомов синдрома активации макрофагов (MAS) или вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) у индивида, включающий введение антитела, которое связывается с интерфероном гамма (IFN γ),

где антитело вводят

i) в первой дозе 6,0 мг/кг от массы тела индивида и

ii) во второй дозе от 3,0 до 10 мг/кг от массы тела индивида, и

где антитело содержит

определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1);

определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AISGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3);

определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4);

определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность EDNQRP (SEQ ID NO: 5); и

определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6).

2. Способ по п.1, где антитело вводят ii) во второй дозе 3,0 мг/кг от массы тела индивида.

3. Способ по п.1, где антитело содержит

аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и

аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 48.

4. Способ по п.1, где первую дозу антитела вводят в течение 1 ч или более.

5. Способ по п.1, где первую дозу антитела вводят в течение периода от 1 до 2 ч.

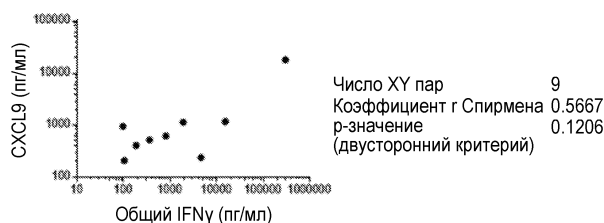
6. Способ по п.1, где вторую дозу вводят в течение первого периода лечения, где вторую дозу вводят каждые три дня после введения первой дозы во время первого периода введения.

7. Способ по п.6, где первый период лечения составляет около двух недель.

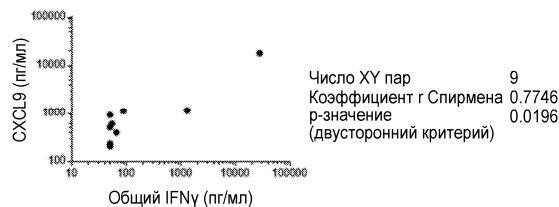
8. Способ по п.6, где вторую дозу вводят в течение второго периода лечения после завершения первого периода лечения.

9. Способ по п.8, где вторую дозу вводят два раза в неделю в течение второго периода введения.

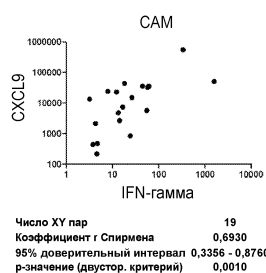
10. Способ по п.8, где второй период лечения составляет около двух недель.
11. Способ по п.5, где вторую дозу вводят не во второй период лечения после завершения первого периода лечения.
12. Способ по п.11, где первый период лечения составляет около двух недель.
13. Способ по п.1, где первую дозу и вторую дозу вводят внутривенно.
14. Способ по п.1, где антитело находится в фармацевтической композиции в концентрации 5 мг/мл.
15. Способ по п.1, где антитело находится в фармацевтической композиции в концентрации 25 мг/мл.
16. Способ по п.1, где антитело вводят в виде фармацевтического состава и где фармацевтический состав содержит L-гистидин, моногидрохлорид L-гистидина, моногидрат, хлорид натрия (NaCl) и полисорбат 80, где pH состава составляет от pH 5,8 до pH 6,2.
17. Способ по п.1, где у индивида имеется системный ювенильный идиопатический артрит (sLJIA).
18. Способ по п.17, где у индивида наблюдается неадекватный ответ на лечение глюкокортикоидами в высоких дозах.
19. Способ по п.1, где у индивида имеется связанное с иммунитетом расстройство, такое как ауто-иммунное заболевание или воспалительное заболевание.
20. Способ по п.1, где индивид страдает болезнью Стилла взрослых (AOSD).
21. Способ по п.1, где индивид страдает системной красной волчанкой (SLE).
22. Способ по п.1, где индивид является взрослым.
23. Способ по п.1, где индивид является ребенком.



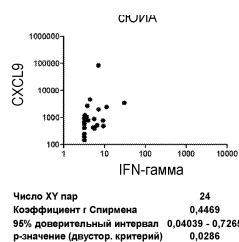
Фиг. 1



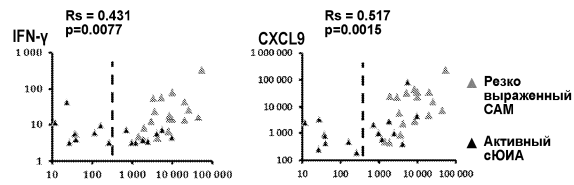
Фиг. 2



Фиг. 3А



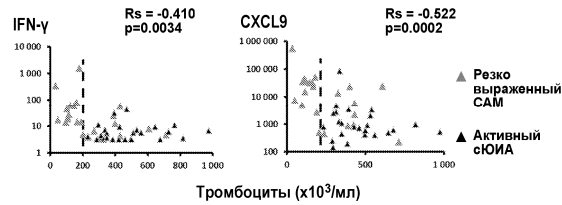
Фиг. 3В



Ферритин (нг/мл)

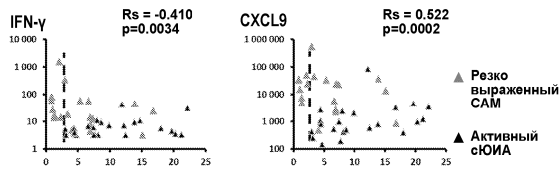
Фиг. 4А-1

Фиг. 4А-2

Тромбоциты ($\times 10^3/\text{мл}$)

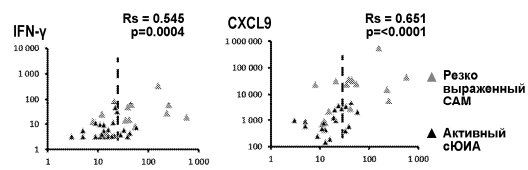
Фиг. 4В-1

Фиг. 4В-2

Нейтрофилы ($\times 10^3/\text{мл}$)

Фиг. 4С-1

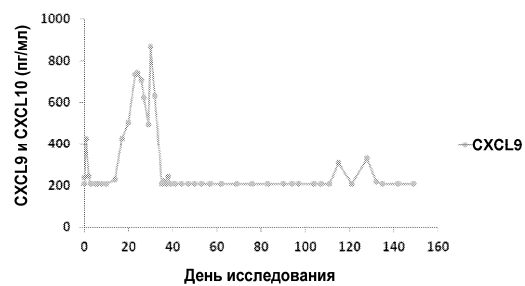
Фиг. 4С-2



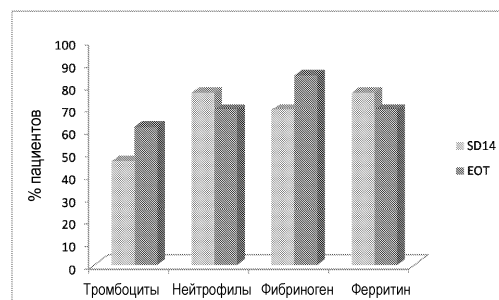
ALT (МЕ/мл)

Фиг. 4D-1

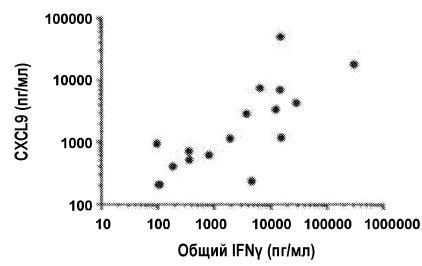
Фиг. 4D-2



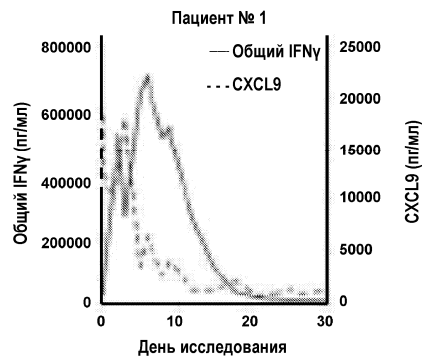
Фиг. 5



Фиг. 6

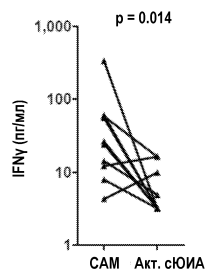


Фиг. 7А

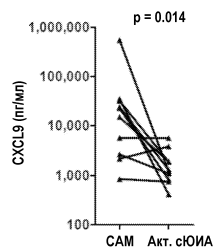


Число ХУ пар 17
Козффициент г Спирмена 0,7885
95% ДИ 0,4839 - 0,9227
р-значение (двустор. критерий) 0,0003

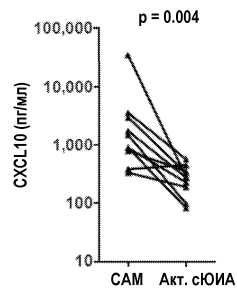
Фиг. 7В



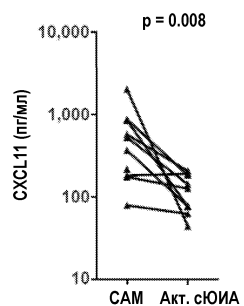
Фиг. 8А



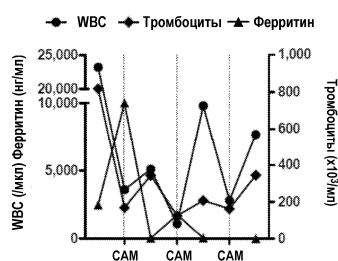
Фиг. 8В



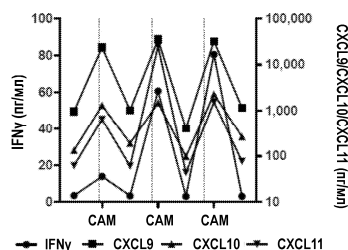
Фиг. 8С



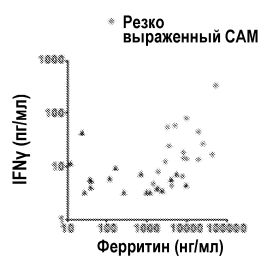
Фиг. 8D



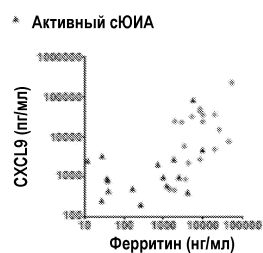
Фиг. 9A



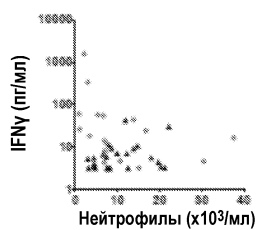
Фиг. 9B



Фиг. 10A

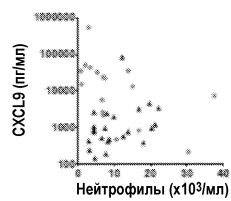


Фиг. 10B

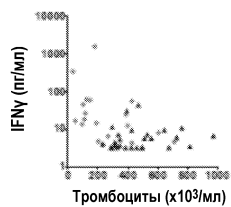


Фиг. 10C

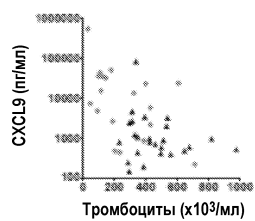
042261



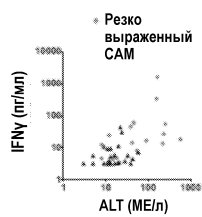
Фиг. 10D



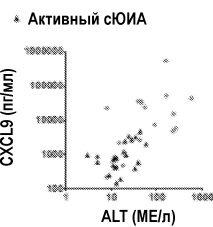
Фиг. 10E



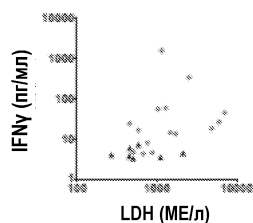
Фиг. 10F



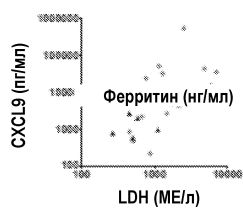
Фиг. 10G



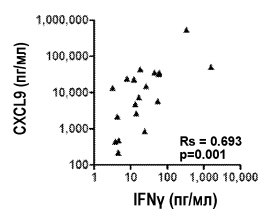
Фиг. 10H



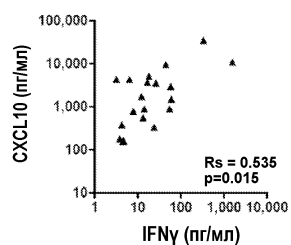
Фиг. 10I



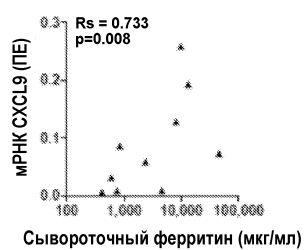
Фиг. 10J



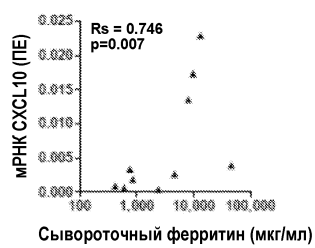
Фиг. 11А



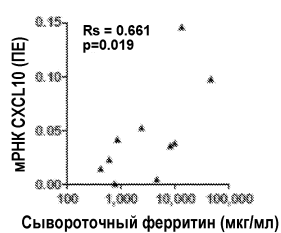
Фиг. 11В



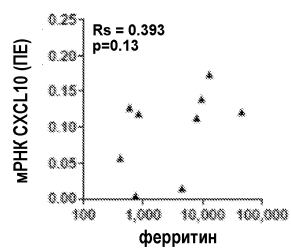
Фиг. 11С



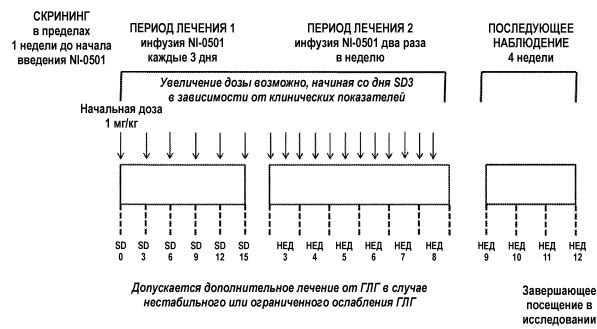
Фиг. 11D



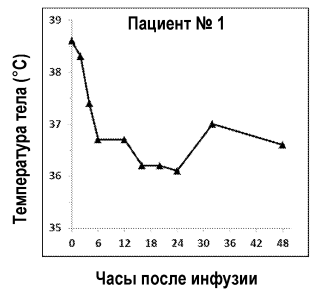
Фиг. 11Е



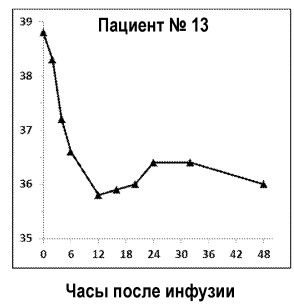
Фиг. 11F



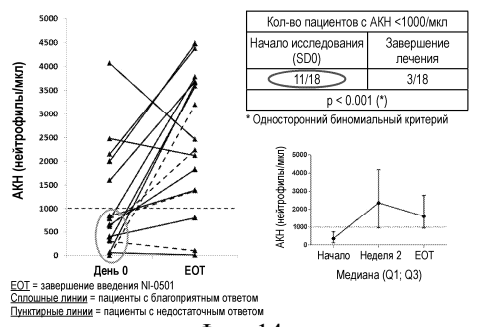
Фиг. 12



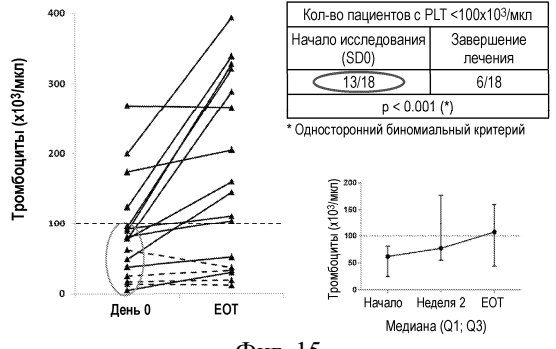
Фиг. 13А



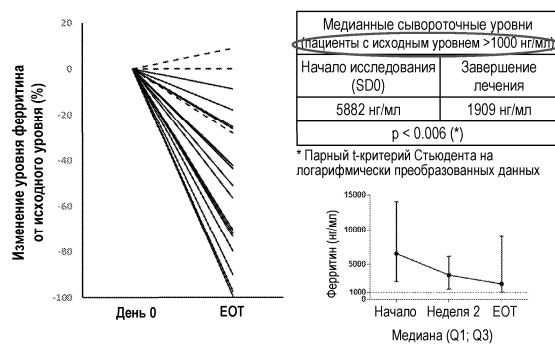
Фиг. 13В



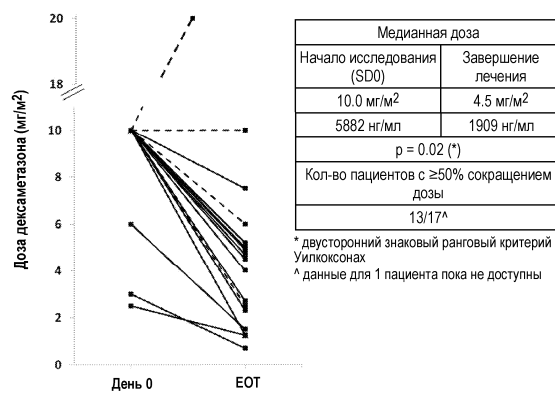
Фиг. 14



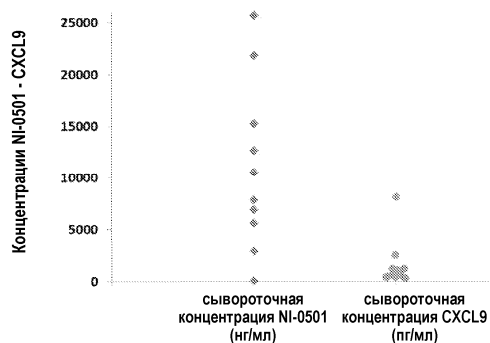
Фиг. 15



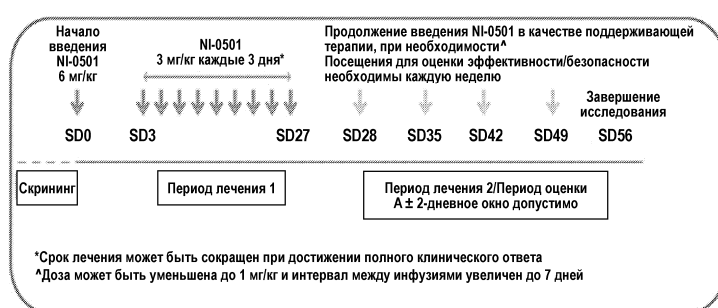
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

