

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

202293081

(13)

A1

(12)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

(51) Int. Cl. *A61K 31/573* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

НОВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

(31) 63/017,199

(32) 2020.04.29

(33) US

(86) PCT/US2021/029608

(87) WO 2021/222385 2021.11.04

(71) Заявитель:

АВМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС
(US)

(72) Изобретатель:

Дейшер Тереза, Маккей Скот Уэйн
(US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к новым лекарственным средствам и связанным с ними способом лечения, основанным на предложенных недавно терапевтических механизмах, опосредованных связыванием глюкокортикоидов с молекулами межклеточной адгезии (ICAM).

CUSTAL 0(1,2,4), выражающее множественные последовательности: A. C2209_HELDER; B. ИСТОКНЕД_САР2; C. CLOC_HELDER;

D. ИСТОКНЕД_СН2А

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A. -----
B. -----
C. -----
D. -----

A1

202293081

202293081

A1

НОВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Область техники

В настоящем изобретении предложены новые лекарственные средства, основанные на предложенных недавно терапевтических механизмах. В частности, авторы изобретения
5 обнаружили, что глюкокортикоиды могут действовать через ранее неизвестный механизм, включающий связывание с молекулами межклеточной адгезии (ICAM). Это открывает возможности для новых терапевтических подходов к лечению жизнеугрожающих заболеваний, таких как тяжелое острое респираторное заболевание COVID-19, вызванное SARS-COV-2.

10 Уровень техники

Молекулы адгезии представляют собой гликопротеины, экспрессируемые на клеточных поверхностях, которые опосредуют контакт между двумя клетками (как гомотипические, так и гетеротипические взаимодействия) или между клетками и внеклеточным матриксом (источник: Hua *et al*, 2013, который включен в настоящий документ полностью
15 посредством ссылки). ICAM представляют собой трансмембранные гликопротеины типа I суперсемейства иммуноглобулинов, которые являются лигандами для антигенов, экспрессируемых на поверхности иммунных клеток, таких как лейкоцитарные интегрины.

Известно, что ICAM-1 является основным поверхностным рецептором для риновирусов (источники: Staunton *et al*, 1989; Bhella, 2015; оба включены в настоящий документ
20 полностью посредством ссылки). В то время как ICAM-1 являлся основным объектом многих исследований (Hua *et al*), существует четыре других члена семейства ICAM, обозначенных ICAM2, 3, 4 и 5.

ICAM3 (также известный как CD50) экспрессируется лимфоцитами, моноцитами, эозинофилами и нейтрофилами (а также клетками лимфомы и некоторыми клетками
25 меланомы, саркомы и другими раковыми клетками, а также клетками бронхиального эпителия). Информация о соответствующем гене *ICAM3* доступна в интернете, например, в базе данных Ensemble; см. запись ENSG00000076662. ICAM3-опосредованная передача сигналов происходит посредством рекрутирования Src мотивом YLPL во внутриклеточном домене ICAM3, что приводит к каскадам фосфорилирования PI3K-AKT (источник: Shen *et al*, 2018, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).
30

Экспрессия ICAM3 на эозинофилах снижается при воздействии умеренных концентраций дексаметазона (от 100 пМ до 1 мкМ) (источник: Juan *et al*, 1999, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). ICAM3 представляет собой потенциальный рецептор для проникновения в клетку для вирусов. Например, было
35 высказано предположение, что ICAM3 играет роль в проникновении ВИЧ-1, поскольку некоторые антитела, специфичные к ICAM3, в значительной степени ингибируют ранние события в жизненном цикле этого вируса (источники: Sommerfelt and Asjo, 1995; Barat *et*

al, 2004; оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Как более подробно обсуждается ниже, сообщается, что некоторые варианты гена белка ICAM3 ассоциированы с патогенезом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) (источник: Chan *et al*, 2007, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Первоначально ICAM4 назывался «гликопротеином LW», и считалось, что его экспрессия в основном ограничена эритроцитами, хотя более новые исследования показали, что он экспрессируется также макрофагами (источник: Choi *et al*, 2017, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Информация о соответствующем гене *ICAM4* доступна в интернете, например, в базе данных Ensemble; см. запись ENSG00000105371. ICAM4 представляет собой потенциальный рецептор для проникновения в клетку для некоторых патогенов, таких как *Mycobacterium tuberculosis* и *Plasmodium falciparum* (Bhalla *et al*, 2015).

Коронавирус представляет собой семейство вирусов с одноцепочечной РНК. Существует четыре типа коронавирусов: α-коронавирус (α-COV), β-коронавирус (β-COV), γ-коронавирус (γ-COV) и δ-коронавирус (δ-COV) (источник: Chan *et al*, 2013, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Известно, что несколько коронавирусов вызывают заболевания у людей. После смертоносных эпидемий SARS и MERS, вызванных β-коронавирусами SARS-CoV (также называемым в этом документе SARS-CoV-1 или «CoV1») и MERS-CoV соответственно, другой β-коронавирус стал причиной масштабной пандемии заболевания, названного COVID-19, которое распространилось по всему миру в 2020 году. Причиной COVID-19 является вирус SARS-CoV-2, который примерно на 79 % гомологичен исходному SARS-CoV по последовательности генома (источник: Wang *et al*, 2020, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки) и еще в большей степени родственен SARS-подобному коронавирусу (MG772933), который инфицирует летучих мышей (источник: Wu *et al*, 2020, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Считалось, что коронавирусы в основном распознают соответствующий рецептор на клетке-мишени через шиповидный (S) гликопротеин на их поверхности и проникают в клетку, вызывая затем инфекцию (Wang *et al*, 2020). Некоторые анализы показали, что SARS-CoV-2 использует ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) в качестве рецептора для проникновения в клетку, так же как и SARS-CoV-1; а анализ структурных моделей показал, что SARS-CoV-2 связывается с ACE2 с аффинностью, более чем в 10 раз превышающей таковую у SARS-CoV, что выше порога, необходимого для вирусной инфекции (Wrapp *et al*, 2020). Тем не менее, подробный механизм, объясняющий, инфицирует ли SARS-CoV-2 людей посредством связывания S-белка с ACE2, насколько сильным должно быть взаимодействие для влияния на передачу вируса от человека к человеку и как SARS-CoV-2 вызывает патологическое заболевание и повреждение органов, остается неизвестным, и для его выяснения необходимы дополнительные

исследования (Wang *et al*, 2020). По состоянию на апрель 2020 г. для COVID-19 не существовало вакцины или специфического противовирусного лечения, и ведение пациентов с заболеванием заключалось в симптоматическом и поддерживающем лечении.

- 5 Исследования вспышки SARS, вызванной SARS-CoV-1, показали, что, помимо связывания с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), дополнительно лектины C-типа L-SIGN (специфичный для печени ICAM3-захватывающий неинтегриновый рецептор) и DC-SIGN (специфичный для дендритных клеток ICAM3-захватывающий неинтегриновый рецептор), как сообщалось, представляют собой «вторые» или
- 10 «поддерживающие» рецепторы, которые также играют роль в облегчении проникновения вирусов в клетки (источники: Jia *et al*, 2005; Kuba *et al*, 2006; оба из которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылки). Позднее сообщалось, что L-SIGN и DC-SIGN представляют собой рецепторы для SARS-CoV-1, которые не зависят от ACE2, но что N-связанное гликозилирование по нескольким остаткам аспарагина в S-
- 15 гликопротеине вируса SARS-CoV-1 имеет решающее значение для L-SIGN/DC-SIGN-опосредованного проникновения в клетку (источник: Han *et al*, 2017, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). L-SIGN присутствует в печени, лимфатическом узле и легком (Han *et al*, 2017).

- N-гликозилирование также важно для функции ICAM3. ICAM3 представляет собой
- 20 наиболее сильно гликозилированный белок в семействе ICAM, имеющий пять сайтов N-связанного гликозилирования на лиганд-связывающем домене (источник: Song *et al*, 2005, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

- В ранних исследованиях предполагают, что SARS-CoV-2 в основном проникает в клетки человека через ACE2. Однако сообщалось, что клетки легочных альвеол типа II (AT2),
- 25 которые, как полагали, являются основной мишенью SARS-CoV-2, экспрессируют низкие уровни ACE2; в настоящее время исследуются несколько других возможных рецепторов для проникновения SARS-CoV-2 в клетки AT2 (источник: Qi *et al*, 2020, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

- 30 Авторы настоящего изобретения ранее обнаружили, что высокие концентрации глюкокортикоидов можно применять для индукции у пациентов лимфодеплеции, например, для лечения заболеваний, опосредованных лимфоцитами (как описано в WO2020/072713A1, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), или для повышения эффективности клеточной иммунотерапии,
- 35 такой как адоптивная Т-клеточная терапия (описанная в WO2018/183927, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Однако до настоящего времени не было высказано предположения о том, что высокие дозы

глюкокортикоидов могут действовать в точках проникновения вирусов путем блокировки рецепторов, используемых вирусами для проникновения в клетки.

Существует потребность в дополнительных способах лечения вирусных инфекций, таких как COVID-19. Особенно желательны способы лечения, которые являются простыми, сопровождаются низкой токсичностью и имеют невысокую стоимость.

Настоящее изобретение было разработано с учетом вышеизложенных соображений.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что после введения высокой дозы молекулы глюкокортикоида могут связывать и блокировать молекулы межклеточной адгезии, такие как ICAM3. Указанное связывание является кооперативным, и с первым Ig-доменом ICAM3 связываются до 26 молекул. Авторы изобретения также обнаруживают существенную функциональную гомологию между шиповидным (S) гликопротеином SARS-CoV-2 и DC-SIGN и L-SIGN, указывающую на то, что, подобно DC-SIGN и L-SIGN, S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 должен связываться с ICAM3, а также потенциально связывающимися L-SIGN и DC-SIGN. Затем авторы изобретения провели исследования с применением молекулярного моделирования и обнаружили, что энергия связывания между рецептор-связывающим доменом (RBD) у SARS-CoV-2 и белком ICAM3 является более благоприятной, чем энергия связывания между RBD у SARS-CoV-2 и белком ACE2. Аналогичным образом, предварительные эксперименты по микроскопическому термофорезу, проведенные авторами изобретения, свидетельствуют, что аффинность связывания (KD) рецептор-связывающего домена (RBD) у SARS-CoV-2 с ICAM3 ниже, чем таковая для связывания RBD у SARS-CoV-2 с ACE2. Эти результаты привели авторов изобретения к поразительному выводу, что лечение высокими дозами глюкокортикоидов может запускать множественные, кооперативные действия, которые должны ингибировать инфицирование клеток-мишеней вирусом SARS-CoV-2. Это важный новый подход к лечению COVID-19.

При введении в высоких дозах глюкокортикоиды могут быть «поглощены» ICAM3, который экспрессируется в значительных количествах на таких клетках, как лимфоциты, моноциты и нейтрофилы, а также экспрессируется на бронхиолярных клетках; и, таким образом, не происходит воздействия через глюкокортикоидные рецепторы. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что это связывание с ICAM3 может привести к продукции новых естественных киллерных Т-клеток (NKT) и их мобилизации из селезенки, тимуса или костного мозга в кровотоки. Эти новые NKT-клетки могут идентифицировать инфицированные вирусом SAR-CoV-2 клетки и нацеливаться на них для уничтожения. Связывание глюкокортикоидов с ICAM3 также может привести к тому, что клетка станет маркированной для атаки лимфоцитами, такими как NKT-клетки и CD8+ Т-клетки. После связывания глюкокортикоидов также может происходить шеддинг

ICAM3, дополнительно стимулируя иммунный ответ, а также предотвращая попадание вируса SARS-CoV-2 в организм через дыхательные пути, если ICAM3 является основным рецептором для проникновения в клетки. ICAM3 представляет собой один из наиболее сильно гликозилированных по Asp белков в организме человека, что может

- 5 способствовать его действию при блокировке проникновения SARS-CoV-2 в клетки, например, после солюбилизации. Дополнительно, связывание молекул глюкокортикоидов, таких как дексаметазон, с ICAM3 может усиливать его связывание с L-SIGN и DC-SIGN, тем самым вытесняя SARS-CoV-2 из связывания с этими белками.

- Кроме того, как описано выше, авторы изобретения рассматривают ICAM3 как важную
- 10 точку проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетки, в частности, в иммунные клетки, которые имеют высокие уровни экспрессии ICAM3. Таким образом, занятость ICAM3 глюкокортикоидами ингибирует проникновение SARS-CoV-2 в эти клетки, обеспечивая важный способ защиты иммунной системы пациента от ее компроментации вирусом. Дополнительно, если клетка действительно становится инфицирована SARS-CoV-2,
- 15 занятость ICAM3 глюкокортикоидами помечает инфицированную клетку для разрушения, например, посредством механизмов, описанных выше. Таким образом, связывание ICAM3 этим классом агентов представляет собой потенциально синергетический способ сдерживания распространения вируса SARS-CoV-2 в организме индивидуума. Отсюда следует, что описанные в настоящем документе способы лечения представляют собой
- 20 потенциально важный способ сдерживания распространения COVID-19.

- Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку-хозяина, при этом способ включает приведение указанной клетки в контакт с модулирующим глюкокортикоидные
- 25 рецепторы (GR) агентом. GR-модулирующий агент может действовать путем связывания с молекулой межклеточной адгезии 3 (ICAM3), присутствующей на поверхности клетки-хозяина, например, в качестве агониста или антагониста ICAM3. Таким образом, GR-модулирующий агент может ингибировать связывание шиповидного (S) гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ICAM3, присутствующим на поверхности клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации указанный GR-модулирующий агент вызывает шеддинг
- 30 ICAM3 с поверхности клетки-хозяина во внеклеточное пространство. В дыхательных путях этот шеддинг ICAM3 может препятствовать проникновению вируса SARS-CoV-2 в организм. В некоторых вариантах реализации указанный GR-модулирующий агент контактирует с дополнительной клеткой и вызывает шеддинг ICAM3 с поверхности дополнительной клетки во внеклеточное пространство. ICAM3, который в результате
- 35 шеддинга попадает во внеклеточное пространство, может ингибировать связывание вируса SARS-CoV-2 с поверхностью клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации ICAM3, который в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство, ингибирует связывание вируса SARS-CoV-2 с L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации ICAM3, который в результате

шеддинга попадает во внеклеточное пространство, сам связывается с вирусом SARS-CoV-2, тем самым ингибируя его связывание с ICAM3, L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки-хозяина.

В некоторых вариантах реализации GR-модулирующий агент действует путем связывания вируса SARS-CoV-2 для блокировки его связывания с его рецептором для проникновения вируса на клетке-хозяине.

В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин представляет собой иммунную клетку, например, лимфоцит, моноцит, эозинофил, нейтрофил или дендритную клетку. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин представляет собой клетку легкого, например, альвеолярную клетку типа 2 или бронхиолярную клетку, такую как клетка бронхиолярного эпителия.

Как описано в настоящем документе, указанный GR-модулирующий агент может представлять собой глюкокортикоид. В некоторых вариантах реализации указанный глюкокортикоид выбран из группы, состоящей из: дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолон, преднизона, преднизолон, преднилизона, кортизона, будесонида, бетаметазона, флуметазона и беклометазона. Предпочтительно, глюкокортикоид представляет собой дексаметазон, например, основание дексаметазона или дексаметазона натрия фосфат.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения COVID-19 у пациента, при этом способ включает введение модулирующего глюкокортикоидные рецепторы (GR) агента в достаточно высокой дозе для ингибирования инфицирования частицами вируса SARS-CoV-2 клетки пациента и/или в достаточно высокой дозе для поддержания или инициирования эффективного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 у пациента. В некоторых вариантах реализации указанный GR-модулирующий агент может оказывать прямое уничтожающее действие на клетки, экспрессирующие ICAM3, которые могут быть инфицированы вирусом SARS-CoV-2.

В близком аспекте настоящее изобретение относится к модулирующему глюкокортикоидные рецепторы (GR) агенту для применения в способе лечения COVID-19 у пациента, при этом указанный способ включает введение GR-модулирующего агента в достаточно высокой дозе для ингибирования инфицирования частицами вируса SARS-CoV-2 клетки пациента и/или в достаточно высокой дозе для поддержания или инициирования эффективного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 у пациента.

В близком аспекте в настоящем изобретении предложено применение модулирующего глюкокортикоидные рецепторы (GR) агента для получения лекарственного средства для лечения COVID-19 у пациента, при этом указанное лечение включает введение лекарственного средства в достаточно высокой дозе для ингибирования инфицирования частицами вируса SARS-CoV-2 клетки пациента и/или для поддержания или инициирования эффективного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 у пациента.

В некоторых вариантах реализации указанный GR-модулирующий агент представляет собой глюкокортикоид, например, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон, преднизолон, преднилиден, кортизон, будесонид, бетаметазон, флуметазон и беклометазон. Предпочтительно, указанный глюкокортикоид представляет собой

- 5 соединение дексаметазона или состав на основе дексаметазона, раскрытые в настоящем документе. Доза GR-модулирующего агента представляет собой эквивалентную дозу для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона по меньшей мере примерно 12 мг/кг, по меньшей мере примерно 15 мг/кг, по меньшей мере примерно 18 мг/кг, по меньшей мере примерно 24 мг/кг, по меньшей мере примерно 30 мг/кг или по меньшей мере примерно
- 10 45 мг/кг. Пациент предпочтительно представляет собой пациента-человека. Таким образом, если связанные с лечением аспекты настоящего изобретения применяют в отношении пациентов-людей, и если для лечения применяют соединение дексаметазона, то доза дексаметазона может составлять по меньшей мере примерно 12 мг/кг, по меньшей мере примерно 15 мг/кг, по меньшей мере примерно 18 мг/кг, по меньшей мере примерно 24 мг/кг, по меньшей мере примерно 30 мг/кг или по меньшей мере примерно
- 15 45 мг/кг.

В некоторых вариантах реализации происходит ингибирование частиц вируса SARS-CoV-2, не позволяющее им инфицировать иммунную клетку пациента путем связывания с молекулой межклеточной адгезии 3 (ICAM3), присутствующей на поверхности иммунной

20 клетки. GR-модулирующий агент может действовать в качестве агониста или антагониста ICAM3. GR-модулирующий агент может действовать, ингибируя связывание шиповидного (S) гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ICAM3, присутствующим на поверхности иммунной клетки. Иммунная клетка может представлять собой лимфоцит, моноцит, эозинофил, нейтрофил или дендритную клетку.

- 25 В некоторых вариантах реализации происходит ингибирование частиц вируса SARS-CoV-2, не позволяющее им инфицировать клетки легких пациента. Высокодозовый GR-модулирующий агент может вызывать шеддинг ICAM3 (с поверхности клеток легких и/или других клеток) во внеклеточное пространство, и этот ICAM3, который в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство, может ингибировать связывание
- 30 SARS-CoV-2 с поверхностью клетки легкого. ICAM3, который в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство, может ингибировать связывание SARS-CoV-2 с L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки легкого. В некоторых вариантах реализации клетка легкого представляет собой альвеолярную клетку типа 2 и/или бронхиолярную клетку. В некоторых вариантах реализации клетка легкого представляет собой
- 35 альвеолярную клетку типа 2. В некоторых вариантах реализации клетка легкого представляет собой бронхиолярную клетку, такую как клетка бронхиолярного эпителия.

В некоторых вариантах реализации GR-модулирующий агент действует путем связывания частицы SARS-CoV-2, в результате чего происходит ее ингибирование, не

позволяющее ей связываться с ее рецептором для проникновения вируса на клетке пациента.

В некоторых вариантах реализации лечение COVID-19 у пациента инициирует или поддерживает эффективный иммунный ответ. (Термин «инициирует или поддерживает»

5 охватывает способы лечения, которые как инициируют, так и поддерживают этот иммунный ответ; таким образом, термин «инициирует или поддерживает» может быть заменен термином «инициирует и/или поддерживает»). Эффективный иммунный ответ может быть инициирован или поддержан, поскольку высокодозовый GR-модулирующий агент может индуцировать и/или мобилизовать иммунные клетки для борьбы с

10 вирусом:

Высокодозовый GR-модулирующий агент может инициировать или поддерживать эффективный иммунный ответ путем индукции и/или мобилизации популяции NKT-клеток, характеризующихся тем, что они экспрессируют CD3, и:

- 15 а. экспрессируют CD4, CD8, CD45, CD49b (CD56 у человека), CD62L, NK1.1, Ly6G, Sca1 и/или TCR гамма/дельта; и/или
- б. не экспрессируют: C-kit, B220, FoxP3 и/или TCR альфа/бета.

Высокодозовый GR-модулирующий агент может инициировать или поддерживать эффективный иммунный ответ путем индукции и/или мобилизации популяции Т-клеток, которые экспрессируют CD3 до очень высокого уровня («очень высокий уровень CD3»).

20 Высокодозовый GR-модулирующий агент может инициировать или поддерживать эффективный иммунный ответ путем индукции и/или мобилизации популяции дендритных клеток (ДК), которые экспрессируют CD11b до очень высокого уровня («дендритные клетки с очень высоким уровнем CD11b»).

25 Изобретение включает комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или специально исключена.

Краткое описание чертежей

30 Варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы изобретения, далее обсуждаются со ссылкой на прилагаемые графические материалы, на которых представлено следующее:

Фиг. 1. Выравнивание последовательностей человеческих DC-SIGN, L-SIGN, шиповидных гликопротеинов вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2. Указаны области гомологии между шиповидным гликопротеином вируса SARS-CoV-2 и белками DC/L-SIGN. Эта гомология

35 отсутствует у шиповидного гликопротеина вируса SARS-CoV.

Фиг. 2. Аминокислотная последовательность ICAM3. Подчеркнутые остатки представляют собой подвергаемые N-связанному гликозилированию остатки аспарагина в положениях 52, 84, 87, 101, 110, 134, 206, 264, 295, 308, 320, 363, 389, 453 и 457.

Фиг. 3. Жизнеспособность спленоцитов после 4 часов инкубации с основанием дексаметазона (от 1 нМ до 250 мкМ).

Фиг. 4. Модель ClusPro докинга ACE2 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 (левая панель). График оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta (Rosetta Interference Score) для моделей докинга (правая панель).

Фиг. 5. Модель ClusPro докинга ICAM3 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 (левая панель). График оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta (Rosetta Interference Score) для моделей докинга (правая панель).

Фиг. 6. Модель ClusPro докинга ICAM3 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-1 (левая панель). График оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta (Rosetta Interference Score) для моделей докинга (правая панель).

Фиг. 7. Результаты независимого повторения моделирования на сервере ClusPro и прогнозируемые энергетические характеристики связывания. На фиг. 7А показан график оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta для повторного моделирования докинга ACE2 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-2. На фиг. 7В показан график оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta для повторного моделирования докинга ICAM3 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-2. На фиг. 7С показан график оценок поверхности взаимодействия по методу Rosetta для повторного моделирования докинга ICAM3 с рецептор-связывающим доменом (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-1.

Фиг. 8. Модель ClusPro взаимодействия связывания рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2, ICAM3 и DC-SIGN. Когда RBD ШИПОВИДНОГО БЕЛКА вируса SARS-CoV-2 (нижняя левая молекула) связывается с ICAM3 (верхняя молекула), то DC-SIGN (нижняя правая молекула) не может связаться, и наоборот.

Подробное описание изобретения

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее обсуждаются со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Дополнительные аспекты и варианты

реализации будут понятны специалистам в данной области техники. Все документы, упомянутые в данном тексте, включены в настоящую заявку посредством ссылки.

SARS-CoV-2

Ранние симптомы инфекции вируса SARS-CoV-2 (CoV2) отличаются от гриппоподобных
 5 симптомов, которые приводят к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС),
 являющемуся отличительной чертой инфекции вируса SARS-CoV (CoV1). Ранние
 симптомы инфекции вируса CoV2 включают опосредованную бронхиолами молчащую
 гипоксемию, а не ОРДС, в котором основную роль играют альвеолы. Для
 инфицирования/патогенеза ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК вируса CoV1 использовал ACE2, L-
 10 SIGN (синусоидальные эндотелиальные клетки) и DC-SIGN (дендритные клетки). Белки
 SIGN связываются с ШИПОВИДНЫМ БЕЛКОМ вируса CoV1 за пределами RBD (Jeffers,
 2004; Marzi, 2004). Лимфоцитарная инфекция, вызванная CoV1, была нечастой (Panesar
 2008), в то время как лимфоцитарная инфекция (Shih 2020; Feng 2020) и моноцитарная
 инфекция (Zhang 2020), вызванные CoV2, наблюдаются часто. ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК
 15 вируса CoV2, но не ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК вируса CoV1, может инфицировать Т-
 лимфоциты, которые не экспрессируют или экспрессируют малое количество ACE2
 (Wang 2020). Эти данные свидетельствуют о том, что CoV2 может использовать другие
 рецепторы для проникновения в клетки. ICAM3 является наиболее сильно
 маннозилированным (что имеет решающее значение для связывания вируса); его
 20 экспрессия ограничена лимфоцитами, моноцитами, гранулоцитами, альвеолярными
 клетками и клетками бронхиального эпителия (Human Proteome Project; ATTC), и была
 установлена ее связь со степенью тяжести ОРДС (Chan 2007), что позволяет
 предположить, что этот белок является кандидатом на связывание с ШИПОВИДНЫМ
 БЕЛКОМ вируса CoV2. Клетки HEK293, часто применяемые для скрининга на
 25 взаимодействия с CoV2, не экспрессируют ICAM3.

Исходя из симптомов у пациентов с COVID-19 и обнаруженных биологических
 характеристик, показывающих, что это заболевание достаточно сильно отличается от
 вызываемого вирусом SARS-CoV-1, авторы изобретения искали потенциальные
 рецепторы для проникновения SARS-CoV-2, помимо hACE2. У пациентов с COVID-19 в
 30 качестве ранних симптомов отмечается молчащая гипоксемия, которая является
 патологией, опосредованной бронхиолами, а не ОРДС, который опосредуется
 альвеолами. Клетки бронхиол экспрессируют ICAM3, а не ACE2. Дополнительно, в
 отличие от SARS-CoV-1, который инфицировал дендритные клетки посредством
 связывания с DC-SIGN и L-SIGN, SARS-CoV-2 инфицирует лимфоциты, моноциты и
 35 нейтрофилы, которые на высоком уровне и селективно экспрессируют ICAM3. DC-SIGN и
 L-SIGN представляют собой природные лиганды для ICAM3, рецептора, селективно
 экспрессируемого на лимфоцитах, моноцитах, нейтрофилах, клетках бронхиол и раковых
 клетках (Human Proteome Project).

Сообщаемая информация также позволяет предположить, что у пациентов, применяющих ингаляционные стероиды, имеется 80 % защита от инфекции, в то время как люди, применяющие ингибиторы ACE или блокаторы рецепторов ACE, не имеют защиты. Следует ожидать, что ингаляционный дексаметазон расщепляет ICAM3: *in vitro* дексаметазон расщепляет ICAM3, удаляя его с поверхности клеток, и дексаметазон, как сообщалось, снижает смертность у тяжелобольных пациентов с COVID-19 (Horby et al, 2021).

N-связанное гликозилирование

ICAM3 является одним из наиболее сильно гликозилированных по Asp белков в организме человека. К остаткам аспарагина (Asp) прикрепляются гликаны, связанные с азотом амидной боковой группы. Это биологически важная посттрансляционная модификация, которая начинается в эндоплазматическом ретикулуме с переноса корового гликана, содержащего три маннозные субъединицы. Дальнейшие модификации могут происходить в аппарате Гольджи и/или на плазматической мембране, где может происходить секреция гликопротеинов.

Низкие уровни маннозосвязывающего лектина преобладают в определенных этнических группах, таких как европеоидные популяции (источник: *Siljan et al*, 2018, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки). Это может быть ассоциировано с пониженной восприимчивостью к развитию тяжелых симптомов или осложнений, вызываемых определенными вирусными заболеваниями, такими как COVID-19.

Фармакологическое действие

Антагонист рецептора представляет собой лиганд, который связывается с рецептором, занимая таким образом сайт связывания на рецепторе, но без активации рецептора. Напротив, агонист рецептора связывается с рецептором и активирует его, что в типичном случае вызывает передачу сигнала внутри клетки. Таким образом, антагонисты могут оказывать биологически значимое действие, конкурируя с агонистами и другими рецептор-связывающими агентами за связывание. Поэтому антагонисты часто называют «блокаторами».

Глюкокортикоидные модулирующие агенты по настоящему раскрытию в типичном случае действуют как агонисты глюкокортикоидных рецепторов. Однако в настоящей заявке раскрыта неожиданная способность модулирующих глюкокортикоидные рецепторы агентов (таких как дексаметазон и другие глюкокортикоиды) связываться с молекулой межклеточной адгезии 3 (ICAM3). Не ограничиваясь какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что модулирующие глюкокортикоидные рецепторы агенты могут связываться с ICAM3 и оказывать антагонистическое действие на ICAM3 без запуска нормальных сигнальных каскадов, которые вызываются активацией ICAM3.

Другие механизмы

Высокие дозы глюкокортикоидов оказывают мощное биологическое воздействие, которое будет способствовать лечению COVID-19.

В дополнение к механизмам, описанным выше, авторы настоящего изобретения считают, что связывание высоких доз модулирующих глюкокортикоидные рецепторы агентов с

5 ICAM3 может позволять модулирующим глюкокортикоидные рецепторы агентам оказывать зависимое от концентрации прямое уничтожающее действие на клетки, экспрессирующие ICAM3, которые могут быть клетками, экспрессирующими ICAM3, которые инфицированы вирусом SARS-CoV-2.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации GR-модулирующие агенты могут
10 индуцировать клеточную гибель клеток, экспрессирующих ICAM3, после связывания с ICAM3. В некоторых вариантах реализации GR-модулирующие агенты индуцируют апоптоз клеток, экспрессирующих ICAM3, путем связывания с ICAM3. В некоторых вариантах реализации GR-модулирующий агент инициирует или поддерживает эффективный иммунный ответ против клеток, экспрессирующих ICAM3. В некоторых
15 вариантах реализации GR-модулирующий агент вызывает шеддинг ICAM3 с поверхности клетки во внеклеточное пространство. В некоторых вариантах реализации GR-модулирующий агент вызывает маркирование клеток, экспрессирующих ICAM3, для атаки иммунными клетками. В некоторых вариантах реализации GR-модулирующий агент непосредственно инициирует (активирует) апоптотические сигнальные пути клеток.

20 Биологическое действие путем маркировки клеток для иммунной атаки

Моноциты и макрофаги представляют собой фагоцитарные лейкоциты, которые принимают участие как в неспецифических, так и в специфических защитных механизмах у позвоночных. Их роль заключается в фагоцитировании (поглощении и затем
25 переваривании) мертвых и умирающих клеток, клеточного дебриса и патогенов, действуя как стационарные или мобильные клетки, а также в стимулировании лимфоцитов и других иммунных клеток к ответу на патоген. Считается, что молекулярные механизмы, лежащие в основе рекрутирования фагоцитарных лейкоцитов, включают распознавание молекулярных «флажков» на поверхности умирающей клетки, с которыми связываются и которые обеспечивают, чтобы умирающая клетка была съедена и разрушена (источник:
30 Gregory & Pound, 2010, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Было показано, что ICAM3 действует как такой молекулярный «флажок» после изменения функции на умирающих клетках (источник: Moffat et al 1999, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Не ограничиваясь какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что
35 прямое уничтожающее действие острых высоких доз глюкокортикоидов на клетки, экспрессирующие ICAM3, может быть опосредовано связыванием глюкокортикоидов с ICAM3, в результате чего клетки, экспрессирующие ICAM3, становятся маркированными для атаки макрофагами и/или лейкоцитами, такими как NKT-клетки и CD8+ T-клетки.

Сюда могут относиться иммунные клетки, которые, как показали авторы настоящего изобретения, индуцируются/мобилизируются высокими концентрациями глюкокортикоидов, как более подробно описано ниже.

Шеддинг ICAM3 после связывания с глюкокортикоидами может дополнительно стимулировать иммунный ответ против этих типов клеток, действуя в качестве хемоаттрактантного сигнала, способствующего рекрутированию макрофагов/фагоцитов в область расположения клеток, с которых в результате шеддинга был удален ICAM3 (описано, например, в источнике: *Torr et al/ 2012*, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки). Клетки, рекрутированные в область расположения клеток, с которых в результате шеддинга был удален ICAM3, могут включать иммунные клетки, которые, как показали авторы настоящего изобретения, индуцируются/мобилизируются высокими концентрациями глюкокортикоидов, как более подробно описано ниже. Авторы настоящего изобретения предполагают, что шеддинг ICAM3 после связывания с дексаметазоном может способствовать мобилизации этих новых иммунных клеток после введения сверхвысоких концентраций глюкокортикоидов. Шеддинг ICAM3 также может предотвращать проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетки через ICAM3, который представляет собой рецептор для проникновения в клетку.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации способов по раскрытию GR-модулирующий агент вызывает шеддинг ICAM3 с поверхности клетки во внеклеточное пространство. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 35, 40, 45 50, 55, 60, 65, 70, 75 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 99 % от общего количества ICAM3, экспрессируемого клеткой, в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство. В некоторых вариантах реализации ICAM3 вызывает по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 99 % снижение поверхностной экспрессии ICAM3 на клетке. В некоторых предпочтительных вариантах реализации по меньшей мере примерно 30 или 40 % от общего количества ICAM3, экспрессируемого клеткой, в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство. В некоторых предпочтительных вариантах реализации ICAM3 вызывает по меньшей мере примерно 35 или 40 % снижение поверхностной экспрессии ICAM3 на клетке. Подходящие способы определения степени экспрессии и шеддинга ICAM3 и изменений в экспрессии и шеддинге ICAM3 хорошо известны специалистам в данной области техники, например, способы, описанные в источнике *Juan et al/* (который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Биологическое действие посредством индукции иммунных клеток

Высокие дозы глюкокортикоидов оказывают мощное биологическое воздействие, которое будет способствовать лечению COVID-19. AVM0703 в эквивалентной дозе для человека (дозы ЭДЧ) 18 мг/кг и выше мобилизует очень активные естественные киллерные Т-клетки, которые экспрессируют CD3 на очень высоких уровнях (клетки AVM_NKT) и которые в иных случаях не обнаруживаются в кровотоке без этого воздействия высокой

дозы. Этот тип клеток более подробно обсуждается ниже. Таким образом, связывание глюкокортикоида с ICAM3 может привести к продукции новых естественных киллерных Т-клеток (NKT) и их мобилизации из селезенки, тимуса или костного мозга в кровотока. Эти новые NKT-клетки могут идентифицировать инфицированные вирусом SAR-CoV-2 клетки и нацеливаться на них для уничтожения.

При ЭДЧ дексаметазона 18 мг/кг и выше, помимо мобилизации вышеупомянутых клеток AVM_NKT, также происходит индукция новых Т-клеток с очень высоким уровнем CD3 и дендритных клеток с очень высоким уровнем CD11b. Примечательно, что эти дозы глюкокортикоидов, по-видимому, не активируют GR, поскольку они не обладают активностью в отношении клеток цельной крови или спленоцитов в эквивалентных концентрациях *in vitro* (см. пример 2 ниже), и *in vivo* не наблюдалось никакого воздействия на толстую кишку, поджелудочную железу или кости, которое можно было бы ожидать, если бы GR были активированы. В системе *in vivo* были уничтожены только лимфоциты, моноциты, некоторые нейтрофилы и раковые клетки. Почти полное уничтожение наблюдается всего через 6 часов после введения дексаметазона, что демонстрирует быстрое начало действия, которое может быть предпочтительным по сравнению с альтернативными способами лечения COVID-19 с более медленным действием, достижение которого может занять несколько дней. Что наиболее важно, Т-лимфоцитарный компонент новых популяций NKT, описанных в настоящем документе, может обеспечивать пациенту долгосрочный иммунитет, который будет служить защитой при повторном воздействии вируса.

Поскольку у пациентов с тяжелым течением COVID-19, как сообщается, уже имеется лимфопения (исследование, проведенное при поддержке Фонда естественных наук Гуанчжоу; S2018010009732, автор не раскрыт; и Xu *et al* 2020), авторы изобретения не предвидят какого-либо ухудшающего состояния воздействия на количество лимфоцитов, вызванного высокими дозами глюкокортикоидов по настоящему изобретению. Кроме того, посредством мобилизации естественных киллерных (NK) клеток с очень высоким уровнем CD3, Т-клеток с очень высоким уровнем CD3 и дендритных клеток с очень высоким уровнем CD11b этот способ лечения инициирует механизм для прямого уничтожения и поглощения вируса. В том же исследовании, в котором сообщалось о лимфопении, не наблюдалось снижения количества типичных NKT-клеток у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Клетки AVM-NKT не присутствовали в крови ни одного пациента с COVID-19, поскольку не наблюдалось клеток, экспрессирующих CD3 со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) на 1–1,5 порядка выше, чем у типичной NKT-клетки, что указывает на то, что эндогенного кортизола, присутствующего у пациентов с COVID-19, недостаточно для мобилизации этой популяции AVM_NKT-клеток.

Клетки AVM_NKT являются NKp46+ и Ly6G-положительными, что указывает на возможность прямого уничтожения мишеней, а также их поглощения. Типичные клетки AVM_NKT, кратко описанные выше, которые являются CD1d-рестрицированными, не

- экспрессируют Ly6G. Дендритные клетки с очень высоким уровнем CD11b также активируются этими дозами AVM0703. *In vivo* глюкокортикоиды уничтожают лимфоциты, отличные от NK- и NKT-клеток, и моноциты в течение 6 часов после перорального введения доз наивным мышам. В моделях опухолей новые NKT- и Т-клетки в крови не наблюдаются. Однако в течение 48 часов после введения доз препарата NKp46+ клетки и Ly6G+ клетки, которые не являются макрофагами, поскольку они отрицательны по F4/80, могут быть обнаружены в образованиях внутри опухолей, окружающих области оставшейся жизнеспособной опухоли. Это указывает на функциональную активность этих клеток.
- Помимо известных свойств NKT-клеток и преимуществ иммунотерапии, направленной на NKT-клетки, новые клетки AVM_NKT обеспечивают дополнительное преимущество, поскольку они могут добавлять прямое поглощение клеток-мишеней к известным свойствам уничтожения, характерным для других индуцированных NKT-клеток (iNKT). Эта функция связана с уникальной для клеток AVM_NKT экспрессией Ly6G и TCR $\gamma\delta$. Кроме того, клетки AVM_NKT индуцируются высокодозовыми глюкокортикоидами и, таким образом, по существу, доступны в большом количестве, в отличие от ограниченного количества природных NKT (и клеток iNKT), которых недостаточно для аутологичной терапии у пожилых людей, которые наиболее уязвимы к COVID-19.

Модулирующие глюкокортикоидные рецепторы агенты

- В настоящем документе термин «модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент» включает глюкокортикоиды, агонисты глюкокортикоидных рецепторов и любое соединение, которое связывается с глюкокортикоидным рецептором. Модулирующие глюкокортикоидные рецепторы (GR) агенты, такие как глюкокортикоиды, оказывают свое действие как через мембранные GR, так и через цитоплазматические GR, которые активируют или подавляют экспрессию генов. Полагают, что некоторые из желательных лимфодеплетивных эффектов глюкокортикоидов и GR-модулирующих агентов опосредованы мембранными GR или другими воздействиями, не затрагивающими геном, наряду с их воздействиями на геном. Сообщалось, что глюкокортикоиды оказывают разнообразные эффекты на уровне лимфоцитов, в зависимости от концентрации введенного глюкокортикоида и продолжительности лечения. В целом, в низких дозах, как правило, применяемых для длительной терапии, глюкокортикоиды, как сообщалось, перераспределяют лимфоциты из периферической крови в костный мозг, в умеренных дозах глюкокортикоиды, как сообщалось, вызывают лейкоцитоз, предположительно представляющий собой результат перераспределения лейкоцитов из костного мозга, селезенки и тимуса в периферическую кровь, а в высоких дозах глюкокортикоиды оказывают лимфотоксическое действие на лимфоциты, инициируя апоптоз и некроптоз. Продолжительность эффекта также зависит от уровня дозы; например, в источнике Fauci *et al* (1976) сообщается, что однократная пероральная доза дексаметазона 0,24 мг/кг на 80 % подавляет Т- и В-лимфоциты периферической крови, при этом восстановление

начинается через 12 часов, а нормальные уровни достигаются через 24 часа. Авторы настоящего изобретения ранее продемонстрировали (в международной заявке на патент PCT/US2019/054395), что острые пероральные дозы дексаметазона 3 мг/кг или выше необходимы для снижения уровней Т- и В-клеток периферической крови через 24–
 5 48 часов после введения, с возвращением к исходным уровням примерно через 5–14 дней после введения препарата.

В некоторых вариантах реализации раскрытых здесь способов указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент представляет собой глюкокортикоид. Согласно некоторым таким вариантам реализации указанный глюкокортикоид может быть выбран
 10 из группы, состоящей из: дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолон, преднизона, преднизолон, преднилизон, кортизон, будесонид, бетаметазон, флуметазон и беклометазон. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации указанный глюкокортикоид может быть выбран из группы, состоящей из: дексаметазона, бетаметазона и метилпреднизона. Согласно некоторым особенно
 15 предпочтительным вариантам реализации указанный глюкокортикоид может представлять собой дексаметазон или бетаметазон.

Согласно некоторым вариантам реализации раскрытых здесь способов указанный глюкокортикоид может представлять собой дексаметазон, например, основание дексаметазона, дексаметазона натрия фосфат, дексаметазона гемисукцинат,
 20 дексаметазона натрия сукцинат, дексаметазона сукцинат, дексаметазона изоникотинат, дексаметазон-21-ацетат, дексаметазона фосфат, дексаметазон-21-фосфат, дексаметазона тебутат, дексаметазон-17-валерат, дексаметазона ацетата моногидрат, дексаметазона пивалат, дексаметазона пальмитат, дексаметазон-21-пальмитат, дексаметазона дипропионат, дексаметазона пропионат, безводный дексаметазона
 25 ацетат, дексаметазон-21-фенилпропионат, дексаметазон-21-сульфобензоат, дексаметазона гемисульфат, дексаметазона сульфат, дексаметазона белоксил, дексаметазоновую кислоту, дексаметазона ацефурат, дексаметазона карбоксимид, дексаметазона ципецилат, динатриевую соль дексаметазон-21-фосфата, дексаметазона мезилат, дексаметазона линолеат, дексаметазона глюкозид, дексаметазона глюкуронид,
 30 дексаметазона йодацетат, дексаметазона оксетанон, карбоксиметилтиодексаметазон, дексаметазонбисэтоксимы, дексаметазонэпоксид, дексаметазонлинолелаидат, дексаметазона метилортовалерат, дексаметазона спермин, 6-гидроксидексаметазон, дексаметазона трибутилацетат, дексаметазон-аспарагиновую кислоту, дексаметазонгалактопиранозу, дексаметазона гидрохлорид, гидроксидексаметазон,
 35 карбоксидексаметазон, дезоксидексаметазон, дексаметазона бутазон, дексаметазона циклодекстрин, дигидродексаметазон, оксодексаметазон, пропионилоксидексаметазон, дексаметазона галактозид, дексаметазона изоникотинат, дексаметазона натрия гидрофосфат, альдегид дексаметазона, дексаметазона пивалат, дексаметазона тридецилат, дексаметазона кротонат, дексаметазона метансульфонат, дексаметазона

бутилацетат, дегидродексаметазон, простой изотиоцианат-этиловый тиоэфир дексаметазона, дексаметазона бромацетат, дексаметазона гемиглютарат, дезоксидексаметазон, дексаметазона хлорамбуцилат, дексаметазона мелфаланат, формилоксидексаметазон, дексаметазона бутират, дексаметазона лаурат, дексаметазона ацетат и любое комбинированное лечение, которое включает форму дексаметазона. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации указанный глюкокортикоид может представлять собой основание дексаметазона или дексаметазона натрия фосфат.

Модулирующие глюкокортикоидные рецепторы (GR) агенты, которые могут применяться в раскрытых способах, включают, например, селективные модуляторы глюкокортикоидных рецепторов (SEGRM) и селективные агонисты глюкокортикоидных рецепторов (SEGRA). Глюкокортикоиды, селективные модуляторы глюкокортикоидных рецепторов и селективные агонисты глюкокортикоидных рецепторов (SEGRA), которые могут быть применены в раскрытых способах, хорошо известны специалистам в данной области техники.

Некоторые такие глюкокортикоиды включают, не ограничиваясь перечисленными, дексаметазон, дексаметазон-содержащие агенты, гидрокортизон, метилпреднизон, преднизон, кортикон, будесонид, бетаметазон и беклометазон. Другие глюкокортикоиды включают преднизолон, мометазона фуроат, триамцинолона ацетонид и метилпреднизолон.

В некоторых вариантах реализации модулирующий глюкокортикоидные рецепторы агент может не представлять собой один или более из указанных выше агентов.

Составы глюкокортикоидов в высоких дозах

Авторы изобретения ранее показали, что стабильные составы высококонцентрированных глюкокортикоидов могут быть получены, даже если состав содержит уменьшенные количества консервантов (например, антиоксидантов) или не содержит их вообще. Одним из аспектов составов высококонцентрированных глюкокортикоидов, который обеспечивает хорошую стабильность, является отношение объема парофазного пространства (мл) к глюкокортикоиду (мг). Например, авторы изобретения продемонстрировали в международной заявке на патент PCT/US2019/061363, что раствор дексаметазона натрия фосфата под названием AVM0703 является особенно предпочтительным. AVM0703 содержит 26,23 мг/мл дексаметазона натрия фосфата (эквивалентно 24 мг/мл дексаметазона фосфата, ДФ), 10 мг/мл натрия цитрата, 0,5 мг/мл динатрия эдетата и 0,035 мг/мл натрия сульфита (безводного). Эти составы высококонцентрированных глюкокортикоидов находят применение в некоторых вариантах реализации способов и способов лечения по настоящему изобретению.

Расчет дозировки глюкокортикоида

В раскрытых в настоящем документе способах модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент вводят в высокой дозе, предпочтительно в дозе, которая эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно 18 мг/кг. Эквивалентные дозы другого глюкокортикоида или модулирующего глюкокортикоидные рецепторы агента могут быть легко и просто рассчитаны с применением общедоступных алгоритмов для пересчета доз кортикоидов, предпочтительно <http://www.medcalc.com>. Например, 18 мг/кг дексаметазона при пересчете дает 112,5 мг/кг преднизона. Поскольку биологическое время полужизни преднизона составляет примерно 20 часов, а биологическое время полужизни дексаметазона составляет примерно 36–54 часа, для биологически эквивалентного дозирования преднизон следует вводить в дозах примерно 112,5 мг/кг каждые 24 часа. В частности, доза дексаметазона 18 мг/кг соответствует дозе преднизолон 112,5 мг/кг, что требует многократного дозирования с введением от примерно двух до примерно трех доз каждые 24 часа. Доза бетаметазона 10 мг/кг соответствует примерно 12 мг/кг дексаметазона и имеет фармакодинамическое (биологическое) время полужизни, аналогичное таковому дексаметазона.

Дозы дексаметазона в настоящей заявке указаны в виде эквивалентных доз для человека (ЭДЧ). Способы вычисления эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ) известны специалистам в данной области техники. Например, Центр экспертизы и изучения лекарственных средств (CDER) FDA (Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами) выпустил в 2005 г. широко цитируемый методический документ (U.S Department of Health CDER, 2005), где в таблице 1 на стр. 7 указанного документа изложен установленный алгоритм пересчета доз для животных в ЭДЧ на основании площади поверхности тела (общепринятый способ экстраполяции доз между разными биологическими видами). Таблица 1 воспроизведена ниже в качестве справочной информации. Специалисту в данной области техники понятно, что исходя из дозы для животного в мг/кг, как описано ниже, легко вычислить ЭДЧ с применением стандартных коэффициентов пересчета, указанных в правых столбцах таблицы 1:

		Для пересчета дозы для животного (мг/кг) в ЭДЧ ^а (мг/кг) сделать одно из следующего:	
Биологический вид	Для пересчета дозы для животного, выраженной в мг/кг, в дозу, выраженную в мг/м ² , умножить на K_m	разделить дозу для животного на:	умножить дозу для животного на:
Человек	37	---	---
Ребенок (20 кг) ^б	25	---	---
Мышь	3	12,3	0,08
Хомяк	5	7,4	0,13
Крыса	6	6,2	0,16
Хорек	7	5,3	0,19
Морская свинка	8	4,6	0,22
Кролик	12	3,1	0,32
Собака	20	1,8	0,54
<i>Приматы:</i>			
Низшие обезьяны ^с	12	3,1	0,32
Мармозетка	6	6,2	0,16
Беличья обезьяна	7	5,3	0,19
Бабуин	20	1,8	0,54
Микросвинья	27	1,4	0,73
Минисвинья	35	1,1	0,95

Таблица 1. Пересчет доз для животных в эквивалентные дозы для человека на основании площади поверхности тела

^а При условной массе тела человека 60 кг. Для видов, не перечисленных в таблице, или при массе тела за пределами стандартных диапазонов ЭДЧ может быть рассчитана по следующей формуле:

ЭДЧ = доза для животного в мг/кг × (масса тела животного в кг/масса тела человека в кг)^{0,33}.

^b Это значение k_m приведено исключительно в качестве справочной информации, поскольку здоровые дети редко становятся добровольцами в исследованиях 1-й фазы.

^c Например, яванский макак, макак-резус и медвежий макак.

- 5 В некоторых вариантах реализации способов по раскрытию указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в дозе, которая эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 6 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг, 18 мг/кг, 24 мг/кг, 30 мг/кг или
- 10 реализации указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в дозе, которая эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно 6 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг, 18 мг/кг, 24 мг/кг, 30 мг/кг или примерно 45 мг/кг, или в дозе, равной *по меньшей мере* значению дозы, которая эквивалентна ЭДЧ основания дексаметазона примерно 6 мг/кг, примерно 12 мг/кг,
- 15 примерно 15 мг/кг, примерно 18 мг/кг, примерно 24 мг/кг, примерно 30 мг/кг или примерно 45 мг/кг. В некоторых предпочтительных вариантах реализации указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в дозе, которая эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 6 мг/кг. В некоторых других предпочтительных вариантах
- 20 реализации указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в дозе, которая эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 18 мг/кг.

- В некоторых вариантах реализации способов по раскрытию модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в дозе, которая
- 25 эквивалентна эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 6–45 мг/кг; эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 15–24 мг/кг; эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 6–12 мг/кг; или эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей
- 30 мере 12–15 мг/кг; или эквивалентной дозе для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона примерно по меньшей мере 18–30 мг/кг.

- В способах по раскрытию указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент может быть введен в виде разовой острой дозы или в виде суммарной дозы, вводимой на протяжении периода примерно 24, 48 или 72 часа. В некоторых
- 35 предпочтительных вариантах реализации указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент вводят в виде разовой острой дозы. В других предпочтительных вариантах реализации указанный модулирующий глюкокортикоидные рецепторы (GR) агент вводят в виде суммарной дозы, вводимой на протяжении периода примерно 72 часа.

Пути введения

При использовании в настоящем документе термин «введение» относится к физическому введению агента субъекту с применением любых из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Примеры путей введения

5 агентов, раскрытых в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Выражение «парентеральное введение» в настоящем документе означает способы введения, не относящиеся к энтеральному и местному введению, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения,

10 внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in*

15 *vivo* электропорацию. В некоторых вариантах реализации агенты, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены непарентеральным путем, например, перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, введение интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

20 Выражение «системное введение» при использовании в настоящем документе неисключительным образом относится, в том числе, к внутривенному, внутрибрюшному, подкожному, через подслизистую оболочку носа, лингвальному, посредством бронхоскопии, внутривенному, внутриартериальному, внутримышечному, интраокулярному, интрастриарному, подкожному, внутрикожному, через дермальный

25 пластырь, через кожный пластырь, через пластырь, в спинномозговую жидкость, в воротную вену, в головной мозг, в лимфатическую систему, внутриплевральному, ретроорбитальному, внутрикожному введению, введению в селезенку, внутрилимфатическому введению.

Термин «место введения» при использовании в настоящем документе неисключительным

30 образом относится, в том числе, к введению внутрь опухоли или внутрь органа, например, внутрь почки, или печени, или поджелудочной железы, или сердца, или легкого, или головного мозга, или селезенки, или глаза, внутримышечно, интраокулярно, интрастриарно, внутрикожно, через дермальный пластырь, через кожный пластырь, через пластырь, в спинномозговую жидкость, в головной мозг. В некоторых предпочтительных

35 вариантах реализации раскрытия модулирующие глюкокортикоидные рецепторы агенты могут быть введены перорально.

В некоторых вариантах реализации раскрытия путь введения модулирующих глюкокортикоидные рецепторы агентов, раскрытых в настоящем документе, может не представлять собой один или более из указанных выше путей.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции могут быть получены с применением фармацевтически приемлемого «носителя», состоящего из материалов, которые считаются безопасными и эффективными. Термин «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным

- 5 объектам и композициям, которые «обычно считаются безопасными», например, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают аллергическую или аналогичную неблагоприятную реакцию, такую как расстройство желудка и т. п., при введении человеку. В некоторых вариантах реализации этот термин относится к молекулярным объектам и композициям, одобренным регулирующим органом
- 10 федерального правительства США или правительства штата США, в качестве элемента списка GRAS в соответствии с разделом 204(s) и 409 Федерального закона о пищевых продуктах, лекарственных средствах и косметике, который подлежит предпродажному рассмотрению и утверждению FDA, или аналогичных списков, Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных, и в частности у людей.
- 15 Термин «носитель» относится к разбавителям, связующим веществам, смазывающим веществам и разрыхлителям. Специалисты в данной области техники знакомы с такими фармацевтическими носителями и способами приготовления фармацевтических композиций с применением таких носителей.

- Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут содержать
- 20 одно или более вспомогательных веществ, например, растворителей, усилителей растворимости, суспендирующих агентов, буферных агентов, агентов изотоничности, антиоксидантов или противомикробных консервантов. В случае их применения вспомогательные вещества указанных композиций не будут оказывать нежелательное воздействие на стабильность, биодоступность, безопасность и/или эффективность
- 25 активных ингредиентов, т. е. глюкокортикоидов, применяемых в композиции. Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, что в настоящем документе предложены композиции, в которых отсутствует несовместимость между любым из компонентов лекарственной формы. Вспомогательные вещества могут быть выбраны из группы, состоящей из буферных агентов, солюбилизующих агентов,
- 30 агентов тоничности, хелатирующих агентов, антиоксидантов, противомикробных агентов и консервантов.

Типы клеток

- Дендритные клетки (ДК) представляют собой происходящие из костного мозга лейкоциты и являются наиболее активными антигенпрезентирующими клетками иммунной системы
- 35 млекопитающих. ДК осуществляют иммунный надзор за экзогенными и эндогенными антигенами и последующую активацию наивных Т-лимфоцитов, запуская различные иммунологические ответы. ДК представляют собой сторожевые клетки, отвечающие за распознавание патогенов и сигналов повреждения тканей, которое индуцирует их

миграцию в лимфоидные органы для осуществления активации разных подгрупп Т-, естественных киллерных (NK-), NKT- и В-лимфоцитов. Имеющие зрелый фенотип сДК характеризуются повышенной экспрессией MHCII, CD80, CD86 и CD40. Дендритные клетки часто подразделяют на подгруппы стандартных дендритных клеток (сДК) и плазмоцитоидных дендритных клеток (пДК). Дендритные клетки существуют преимущественно в двух основных функциональных состояниях: «незрелые» и «зрелые». Активация (созревание) дендритных клеток запускает метаболические, клеточные программы и программы транскрипции генов, позволяющие ДК мигрировать из периферических тканей в Т-зависимые области во вторичных лимфоидных органах, где может происходить активирующая Т-лимфоциты презентация антигена (источник: Patente et al, 2018; включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Главная функция дендритных клеток заключается в процессинге материала антигенов и презентации его на клеточной поверхности Т-клеткам, с инициацией таким образом адаптивных иммунных ответов. Дендритные клетки также продуцируют поляризующие цитокины, которые способствуют дифференцировке и активации патоген-специфических эффекторных Т-клеток, и могут способствовать ауто толерантности, секретируя толерогенные цитокины, которые индуцируют дифференцировку регуляторных Т-клеток. ДК, индуцированные способами по настоящему изобретению, могут экспрессировать CD11b до очень высокого уровня («дендритные клетки с очень высоким уровнем CD11b»).

Т-клетки представляют собой тип лимфоцитов, которые играют ключевую роль в иммунном ответе. Т-клетки отличаются от других типов лимфоцитов присутствием на их поверхности Т-клеточных рецепторов. Т-клеточные рецепторы (TCR) отвечают за распознавание фрагментов антигена, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), и представляют собой гетеродимеры из двух разных белковых цепей. У человека в 95 % Т-клеток TCR состоит из цепи альфа (α) и цепи бета (β) (кодируемых генами TRA и TRB соответственно), тогда как в 5 % Т-клеток TCR состоит из цепей гамма и дельта (γ/δ) (кодируемых генами TRG и TRD соответственно). Указанное соотношение меняется при болезненных состояниях (таких как лейкоз). В отличие от рестрицированных по ГКГС альфа-бета-Т-клеток, гамма-дельта-Т-клеткам для активации не требуется процессинг антигенов и презентация пептидных эпитопов на главном комплексе гистосовместимости (ГКГС), хотя некоторые из них распознают молекулы ГКГС класса Ib. Некоторые гамма-дельта-Т-клетки распознают маркеры клеточного стресса, которые появляются в результате инфекции или туморогенеза. Считается, что гамма-дельта-Т-клетки также играют роль в распознавании липидных антигенов. Т-клетки, индуцированные способами по изобретению, могут экспрессировать CD3 до очень высокого уровня («с очень высоким уровнем CD3»).

Естественные киллерные Т-клетки (NKT) представляют собой гетерогенную группу Т-клеток, которые одновременно обладают свойствами Т-клеток и естественных киллерных (NK) клеток. В отличие от стандартных Т-клеток, NKT являются функционально зрелыми,

когда покидают тимус, примированными для быстрого продуцирования цитокинов. NKT могут непосредственно уничтожать экспрессирующие CD1d раковые клетки и макрофаги микроокружения опухоли, быстро продуцировать и высвобождать иммуноактивирующие цитокины, такие как ИФН-гамма и ИЛ-4, и активировать другие иммунные клетки, такие как дендритные клетки (ДК), NK-клетки и В- и Т-лимфоциты.

Авторы изобретения обнаружили новый тип NKT-клеток, обозначенный AVM_NKT, который удивительно хорошо населяет пораженные ткани, такие как опухоли, в моделях уничтожения опухолей, применяемых для демонстрации эффективности ингибиторов контрольных точек. Клетки AVM_NKT мобилизуются только после введения AVM0703, в отличие от других NK и NKT, которые циркулируют постоянно, поэтому количество клеток AVM_NKT практически не ограничено. Было показано, что эти клетки снижают опосредованное вирусом гриппа А воспаление и степень тяжести заболевания, и была обнаружена вовлеченность CD11b⁺ ДК в защиту от респираторно-синцитиального вируса и вируса гриппа А (H1N1). Таким образом, известно, что клетки с более низкими уровнями CD3 и CD11b являются эффективными, AVM0703 должен быть более эффективным из-за NKT и гамма/дельта Т-клеток с очень высоким уровнем CD3, которые он мобилизует, и поскольку он не только увеличивает количество обычных CD11b ДК, но также мобилизует ДК с очень высоким уровнем CD11b, которые обычно не наблюдаются.

Считается, что альвеолярные клетки типа II (AT2) являются мишенью для SARS-CoV-2 в легком человека. Клетки A2T являются единственными легочными клетками, синтезирующими, хранящими и секретирующими все компоненты легочного сурфактанта, важного для регуляции поверхностного натяжения, предотвращения ателектаза и поддержания баланса альвеолярной жидкости в альвеолах (Henry *et al*, 2017).

Определение уровней экспрессии клеточных маркеров

Маркеры, экспрессируемые NKT-клетками, Т-клетками или ДК, индуцированными способами по настоящему изобретению, могут быть определены посредством сравнения с уровнем экспрессии маркеров типичной популяцией NKT-клеток, Т-клеток или ДК (соответственно), например, взятой у пациента до лечения. Когда говорится, что уровень экспрессии «очень высокий», это может означать на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 100 % более высокий уровень экспрессии маркера по сравнению с уровнем у соответствующей типичной популяции клеток. Уровни экспрессии могут быть определены с помощью проточной цитометрии.

Признаки, раскрытые в предшествующем описании, или в нижеследующей формуле изобретения, или на прилагаемых графических материалах, выраженные в их конкретных формах или с точки зрения средства для выполнения раскрытой функции, или способа или процесса получения раскрытых результатов, в зависимости от обстоятельств, могут

быть применены, отдельно или в любой комбинации таких признаков, для реализации изобретения в его различных формах.

Несмотря на то, что изобретение описано в сочетании с примерами вариантов реализации, описанными выше, многие эквивалентные модификации и вариации будут очевидны специалистам в данной области техники при рассмотрении данного раскрытия. Соответственно, приведенные выше примеры вариантов реализации изобретения считаются иллюстративными и не имеющими ограничительного характера. В описанные варианты реализации изобретения могут быть внесены различные изменения, не отклоняясь от сущности и объема изобретения.

Во избежание каких-либо сомнений, любые теоретические объяснения, представленные в настоящей заявке, представлены с целью улучшения понимания читателем. Авторы изобретения не желают ограничиваться какими-либо из этих теоретических объяснений.

Заголовки любых разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены только для целей упорядочения и не должны рассматриваться как ограничивающие описанный объект.

Во всем тексте описания изобретения, включая нижеследующую формулу изобретения, если контекст явно не требует иного, слова «содержать» и «включать» и их вариации, такие как «содержит», «содержащий» и «включающий», будут подразумевать включение указанного целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий.

Необходимо отметить, что в контексте описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если из контекста явно не следует иное. Диапазоны могут быть выражены в настоящем описании в виде от «примерно» одного конкретного значения и/или до «примерно» другого конкретного значения. При таком обозначении диапазона другой вариант реализации включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражены в виде приблизительных значений при помощи ранее упомянутого термина «примерно», то следует понимать, что конкретное значение составляет другой вариант реализации. Термин «примерно» по отношению к числовому значению является необязательным и означает, например, +/- 10 %.

Примеры

ПРИМЕР 1: выравнивание последовательностей человеческих DC-SIGN, L-SIGN, шиповидных гликопротеинов вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2

Инструмент для выравнивания множественных последовательностей Clustal O (1.2.4) (uniprot.org) применяли для выравнивания продуктов человеческих генов CD209 (DC-

SIGN), CLEC4M (L-SIGN) с шиповидными гликопротеинами вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2. Результаты показаны на фиг. 1. Шиповидные гликопротеины демонстрируют явную гомологию с ICAM3-связывающими областями DC-SIGN и L-SIGN.

ПРИМЕР 2: отсутствие эффекта *ex vivo* высокой концентрации дексаметазона на клетки цельной крови или спленоциты

- Клетки цельной крови или выделенные спленоциты *ex vivo* не отвечали на AVM0703 или основание дексаметазона в концентрациях от 100 мкМ до 500 мкМ, эквивалентных пиковым концентрациям, которые достигались *in vivo* при введении дозы около эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ) 6 мг/кг и выше. Эти данные демонстрируют, что в дозах, предпочтительных для лечения онкологических и инфекционных заболеваний (ЭДЧ от 6 мг/кг до 30 мг/кг), AVM0703 не активирует ни глюкокортикоидные рецепторы, ни рецептор, непосредственно экспрессируемый на лимфоцитах, моноцитах или нейтрофилах. Выраженная активность *in vivo*, которую мы наблюдаем у наивных мышей и в моделях онкологических заболеваний, должна быть опосредована через мобилизованные после воздействия AVM0703 в ЭДЧ 6 мг/кг и выше супернагруженные естественные киллерные Т-клетки, Т-клетки и дендритные клетки.

Были исследованы условия инкубации, показанные в таблице 2.

№ исследования	Тип клеток	Объем (мкл)	Контейнер	Температура (°C)	CO ₂ (%)	Перемешивание	Временная точка (ч)
6	Цельная кровь	300	Микроцентрифужная пробирка 1,5 мл.	Комнатная температура	Атмосферный	Нет	16
24	Цельная кровь	400	24-луночный планшет	Комнатная температура	Атмосферный	Орбитальное	16
	Спленоциты	500	24-луночный планшет	37	3 %	Нет	4
Венетоклас 1	Цельная кровь	См. таблицу 2.	Микроцентрифужная	Комнатная температура	Атмосферный	Нет	2, 22

			пробирка 1,5 мл.				
Сравне- ние глюко- кортико- идов	Цельная кровь	См. табли- цу 4.	Микро- центри- фужная пробирка 1,5 мл.	Комнатная температура	Атмос- фер- ный	Нет	На ночь

Таблица 2. Условия инкубации

Результаты; цельная кровь (исследование 6)

- Образцы обрабатывали в трех повторностях 500 мкМ основанием дексаметазона, 50 мкМ RU486 (антагонистом стероидных рецепторов) или 1 % ДМСО в качестве контроля.
- Незначимое увеличение количества нейтрофилов, вызванное обработкой RU486. Прочие типы иммунных клеток; лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы; при обработке основанием дексаметазона или RU486 количество клеток не менялось. Данные указывают, что одно только основание дексаметазона не индуцирует в цельной крови
- активность уничтожения лимфоцитов, наблюдаемую в экспериментах *in vivo*. RU486 сам по себе также не обладает активностью уничтожения лимфоцитов и может быть введен в комбинации без влияния на уровни лимфоцитов.

Результаты; спленоциты (исследование 24)

- Спленоциты культивировали перед проведением анализа в течение 16 часов. Проточную цитометрию проводили через четыре часа после добавления основания дексаметазона, и результаты показаны на фиг. 3. Через 4 часа основание дексаметазона, по-видимому, проявляет прямую активность уничтожения при концентрациях ниже 100 мкМ, но не инициирует клеточную гибель в концентрациях выше 100 мкМ.

- Результаты исследований 6 и 24 позволяют предположить, что механизмы действия при низких и высоких концентрациях основания дексаметазона различаются, при этом высокие дозы не проявляют активности в отношении спленоцитов. Это противоречит предыдущим данным, полученным *in vivo*, согласно которым масса селезенки резко снижалась при введении AVM0703. (См. источники: WO2018/183927 и WO2020/072713; оба полностью включены посредством ссылки для обсуждения этих эффектов *in vivo*.)
- Несоответствие между данными, полученными *ex vivo* и *in vivo*, указывает на то, что *in vivo* реализуется иной механизм действия, чем *ex vivo*.

Результаты; венетоклас 1

При инкубации цельной крови с плацебо, ДМСО, AVM0703 в концентрации 500 мкМ — одним или в комбинации с венетоклаксом в концентрации 3 мкМ — не было обнаружено значимых различий ни для одного измеренного параметра общего анализа крови (CBC). В частности, не наблюдается значимого влияния на лейкоциты. Лимфоциты, моноциты и нейтрофилы не демонстрируют лимфодеплецию или уничтожение, наблюдаемые *in vivo*. Таким образом, эти результаты показывают, что клетки в цельной крови не подвергаются воздействию AVM0703 через активацию глюкокортикоидных рецепторов (GCR) (венетоклакс повышает чувствительность к глюкокортикоидам).

Результаты: сравнение глюкокортикоидов *ex vivo*

Чтобы определить, было ли отсутствие влияния *ex vivo* на моноциты, лимфоциты и нейтрофилы вызвано концентрацией основания дексаметазона от 100 мкМ до 500 мкМ, или различные вспомогательные вещества в составе AVM0703 могли внести свой вклад, мы провели сравнение обработки *ex vivo* препаратом AVM0703 и другим коммерчески доступным дексаметазона фосфатом с последующим анализом CBC. Между разными составами не наблюдалось заметных различий, и это указывает на то, что именно концентрации основания дексаметазона оказывают неожиданный эффект *ex vivo*, т. е. неожиданное отсутствие клеточной гибели *ex vivo*.

ПРИМЕР 3: моделирование режимов и энергий связывания рецептор-связывающих доменов вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV с белками ICAM3 и ACE2

Авторы изобретения применили ClusPro для поиска благоприятных режимов (моделей) связывания между рецептор-связывающим доменом (RBD) вируса SARS-CoV-2 и белками ICAM3 и ACE2. Затем авторы изобретения применили программное обеспечение Rosetta для прогнозирования энергетических характеристик каждого режима (модели) связывания.

На левой стороне фиг. 4 приведен пример режима связывания RBD вируса SARS-CoV-2 с белком ACE2. График в правой части фиг. 4 отображает среднеквадратичное отклонение положения (RMSD) на поверхности взаимодействия молекул в сравнении с оценкой поверхности взаимодействия, которая предсказывает энергию связывания (большее по модулю отрицательное значение означает более экзотермическое и, таким образом, более сильное взаимодействие связывания). «Воронкообразное схождение книзу» оценок поверхности взаимодействия по направлению к началу оси, на которой отложено RMSD на поверхности взаимодействия, указывает на благоприятные характеристики связывания между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ACE2.

На левой стороне фиг. 5 приведен пример режима связывания RBD вируса SARS-CoV-2 с белком ICAM3. ICAM3 стыкуется в кармане RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV-2, как и ACE2 (в отличие от режима связывания белка DC-SIGN или L-SIGN, которые

стыкуются за пределами RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV1). Режим связывания RBD CoV-2-ICAM3 прогнозирует наличие первого солевого мостика между Arg408 в RBD SARS-CoV-2 и Glu43 в ICAM3 и второго солевого мостика между Arg6 и Glu484, а также гидрофобных взаимодействий в центральной части поверхности связывания. График в правой части фиг. 5 отображает (RMSD) на поверхности взаимодействия CoV-2 и ICAM3 в сравнении с оценкой поверхности взаимодействия. Как и на фиг. 4, на фиг. 5 «воронкообразное схождение книзу» оценок поверхности взаимодействия по направлению к началу оси, на которой отложено RMSD на поверхности взаимодействия, указывает на благоприятные характеристики связывания между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ICAM3.

На левой стороне фиг. 6 приведен пример режима связывания RBD вируса SARS-CoV-1 с белком ICAM3. Режим связывания прогнозирует наличие единственного солевого мостика между Arg395 в RBD и Glu43 в ICAM3. В отличие от фиг. 4 и 5, график на правой стороне фиг. 6 не показывает выраженного «воронкообразного схождения книзу» оценок поверхности взаимодействия по направлению к началу оси, на которой отложено RMSD на поверхности взаимодействия. Таким образом, фиг. 6 демонстрирует, что характеристики связывания между RBD вируса SARS-CoV-1 и белком ICAM3 являются гораздо менее благоприятными, чем в случае связывания между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ICAM3, как показано на фиг. 5.

Результаты, представленные на фиг. 4–6, были подтверждены в независимом повторении экспериментов по моделированию с применением программного обеспечения Rosetta для прогнозирования энергетических характеристик каждого режима связывания. На фиг. 7 показаны результаты этой серии повторных экспериментов: на графиках показаны среднеквадратичные отклонения положения (RMSD) на поверхности взаимодействия молекул в сравнении с оценкой поверхности взаимодействия, которая предсказывает энергию связывания (большее по модулю отрицательное значение означает более экзотермическое и, таким образом, более сильное взаимодействие связывания). Как и на фиг. 4 и 5, «воронкообразное схождение книзу» оценок поверхности взаимодействия по направлению к началу оси, на которой отложено RMSD на поверхности взаимодействия, указывает на благоприятные характеристики связывания между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ACE2 (фиг. 7A, соответствующая правой стороне фиг. 4) и между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ICAM3 (фиг. 7B, соответствующая правой стороне фиг. 5). Аналогично тому, как это было на фиг. 6, не наблюдалось «воронкообразное схождение книзу» оценок поверхности взаимодействия по направлению к началу оси, на которой отложено RMSD на поверхности взаимодействия, и это указывает на то, что характеристики связывания между RBD вируса SARS-CoV-1 и белком ICAM3 значительно менее благоприятные, чем в случае связывания между RBD вируса SARS-CoV-2 и белком ICAM3 (фиг. 7C, соответствующая

правой стороне фиг. 6). Энергетические характеристики по данным Rosetta для CoV2 RBD-ICAM3 (RMSD на поверхности взаимодействия -12,7) столь же благоприятны, как и для ACE2 (-12,2), в отличие от неблагоприятных энергетических характеристик для CoV1-RBD-ICAM3 (-8,6). ICAM3 стыковался в кармане RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV2 (благоприятные электростатические и гидрофобные взаимодействия), как и ACE2, но отличался этим от белков DC- или L-SIGN, которые стыкуются за пределами RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV1.

Предварительные эксперименты по микроскопическому термофорезу показали, что аффинность связывания (KD) ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV2 с ICAM3 находится в диапазоне 5–10 нМ, в то время как для связывания ШИПОВИДНОГО белка вируса CoV2 с ACE2 она составляла около 10 нМ.

ПРИМЕР 4: моделирование взаимодействия связывания рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2, ICAM3 и DC-SIGN.

Моделируя взаимодействие связывания рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2, ICAM3 и DC-SIGN с применением ClusPro и программного обеспечения Rosetta, авторы изобретения обнаружили, что, когда RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса SARS-CoV-2 связывается с ICAM3, то DC-SIGN не может связаться, и наоборот (фиг. 8). Это указывает на то, что антитела, которые вырабатываются к RBD ШИПОВИДНОГО белка вируса SARS-CoV-2, потенциально способны к перекрестной реакции и связыванию с DC-SIGN, приводящим к непреднамеренным и нежелательным воздействиям на иммунную систему.

Список литературы

Выше цитируются ряд публикаций для более полного описания и раскрытия настоящего изобретения и уровня техники в той области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Полный список указанных источников приведен ниже. Полный текст каждой из этих публикаций включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Bhalla *et al*; Nat Commun 6, 6049 (2015)

Bhella; Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. (2015) Feb 5; 370; 1661

Barat *et al*, Journal of Virology May 2004, 78 (12) 6692-6697

Chan *et al*, The Journal of Infectious Diseases 2007; 196:271–80

Chan *et al*, Trends Microbiol, 21 (2013), pp. 544-555

Choi *et al*, Cytotherapy. (2017) Oct;19(10):1248-1250

Fauci A.S., Pratt K.R. & Whalen G. (1976) J. Immunol. 118, 598.

- Feng et al, Mol Cancer. 2020 Jun 2;19(1):100
- Gregory & Pound, Apoptosis. 2010 Sep;15(9):1029-49;
- Juan *et al*, 1999, Allergy 54, 1293-1298
- Han *et al*, 2007, Journal of Virology, Vol. 81, No. 21; Nov. 2007 pp 12029–12039
- 5 Henry J. *et al*, Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition), 2017
- Horby et al, N Engl J Med. 2021 Feb 25;384(8):693-704
- Hua *et al*, Front. Pharmacol., 04 October 2013
- Jeffers et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 2;101(44):15748-53
- Marzi et al, J Virol. 2004 Nov;78(21):12090-5
- 10 Moffatt et al, J Immunol. 1999 Jun 1;162(11):6800-10;
- Panesar, Med Hypotheses. 2008 Aug;71(2):298-301
- Patente et al; Front Immunol. 2018; 9: 3176
- Qi, F. *et al*, Biochem. and Biophys. Res. Comm.,
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044>
- 15 Shen *et al*, Cancer letters vol. 422 (2018): 29-43. doi:10.1016/j.canlet.2018.02.034
- Shi et al, 2020 DOI: 10.1101/2020.03.12.20034736
- Siljan *et al*, 2018. DOI: 10.1093/ofid/ofy002
- Sommerfelt, M. A., and B. Asjo (1995) J. Gen. Virol. 76:1345-1352
- Song *et al*, 2005, PNAS; 102, 9, 3366-3371
- 20 Staunton *et al* (1989) Cell 56, 849–853
- Torr et al, Cell Death Differ. 2012 Apr; 19(4): 671–679;
- Wang *et al*, Int. J. of Antimicrobial Agents (2020), ANTAGE 105948
- Wang et al, Cell Mol Immunol. 2020 Apr 7: 1–3
- Wrapp *et al*, Science, 13 Mar 2020: 367, Issue 6483, pp. 1260-1263
- 25 Wu *et al*, Cell host & microbe (2020) 27, Issue 3, 11 March 2020, Pages 325-328
- Xu *et al*, 2020 Feb 18 doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X PMCID: PMC7164771 PMID: 32085846
- Zhang et al, Front Immunol. 2020; 11: 2033
- 30 Стандартные методы молекулярной биологии см. в источнике: Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Формула изобретения

1. Способ ингибирования проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку-хозяина, при этом способ включает приведение указанной клетки в контакт с модулирующим
5 глюкокортикоидные рецепторы (GR) агентом.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент действует путем связывания с молекулой межклеточной адгезии 3 (ICAM3), присутствующей на поверхности клетки-хозяина.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент
10 действует в качестве антагониста ICAM3.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент ингибирует связывание шиповидного (S) гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ICAM3, присутствующим на поверхности клетки-хозяина.
5. Способ по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что указанный GR-
15 модулирующий агент вызывает шеддинг ICAM3 с поверхности клетки-хозяина во внеклеточное пространство.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент контактирует с дополнительной клеткой и вызывает шеддинг ICAM3 с поверхности
20 дополнительной клетки во внеклеточное пространство.
7. Способ по п. 5 или 6, отличающийся тем, что ICAM3, который в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство, ингибирует связывание вируса SARS-CoV-2 с поверхностью клетки-хозяина.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что ICAM3, который в результате шеддинга
25 попадает во внеклеточное пространство:
 - i) ингибирует связывание вируса SARS-CoV-2 с L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки-хозяина; и/или
 - ii) связывается с вирусом SARS-CoV-2, тем самым ингибируя его связывание с ICAM3, L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки-хозяина.
9. Способ по п. 4, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой
30 иммунную клетку.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лимфоцит, моноцит, эозинофил, нейтрофил или дендритную клетку.
11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку легкого.
- 5 12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная клетка легкого представляет собой альвеолярную клетку типа 2 или бронхиолярную клетку.
13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент действует путем связывания вируса SARS-CoV-2 для блокировки его связывания с его рецептором для проникновения вируса на клетке-хозяине.
- 10 14. Способ по любому из пп. 1–13, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент представляет собой глюкокортикоид.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что глюкокортикоид выбран из группы, состоящей из: дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизона, преднизолона, преднилизона, кортизона, будесонида, бетаметазона, флуметазона и
15 беклометазона.
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что глюкокортикоид представляет собой дексаметазон.
17. Способ лечения COVID-19 у пациента, при этом способ включает введение модулирующего глюкокортикоидные рецепторы (GR) агента в достаточно высокой дозе
20 для ингибирования инфицирования частицами вируса SARS-CoV-2 клетки пациента и/или для инициирования или поддержания эффективного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 у пациента.
18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что происходит ингибирование частиц вируса SARS-CoV-2, не позволяющее им инфицировать иммунную клетку пациента путем
25 связывания с молекулой межклеточной адгезии 3 (ICAM3), присутствующей на поверхности иммунной клетки.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент действует в качестве антагониста ICAM3.
20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанный GR-модулирующий агент
30 ингибирует связывание шиповидного (S) гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ICAM3, присутствующим на поверхности иммунной клетки.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лимфоцит, моноцит, эозинофил, нейтрофил или дендритную клетку.
22. Способ по п. 17, отличающийся тем, что происходит ингибирование частиц вируса SARS-CoV-2, не позволяющее им инфицировать клетку легкого пациента, при этом
- 5 высокодозовый GR-модулирующий агент вызывает шеддинг ICAM3 во внеклеточное пространство, и при этом ICAM3, который в результате шеддинга попадает во внеклеточное пространство, ингибирует связывание SARS-CoV-2 с поверхностью клетки легкого.
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что ICAM3, который в результате шеддинга
- 10 попадает во внеклеточное пространство, ингибирует связывание SARS-CoV-2 с L-SIGN и/или DC-SIGN на поверхности клетки легкого.
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что клетка легкого представляет собой альвеолярную клетку типа 2 или бронхиолярную клетку.
25. Способ по п. 17, отличающийся тем, что GR-модулирующий агент действует путем
- 15 связывания частицы SARS-CoV-2 для блокировки ее связывания с рецептором для проникновения вируса на клетке пациента.
26. Способ по п. 17, отличающийся тем, что эффективный иммунный ответ включает индукцию и/или мобилизацию популяции NKT-клеток, характеризующихся тем, что они экспрессируют CD3, и:
- 20 а. экспрессируют CD4, CD8, CD45, CD49b (CD56 у человека), CD62L, NK1.1, Ly6G, Sca1 и/или TCR гамма/дельта; и/или
- б. не экспрессируют: C-kit, B220, FoxP3 и/или TCR альфа/бета.
27. Способ по п. 17, отличающийся тем, что эффективный иммунный ответ включает индукцию и/или мобилизацию популяции Т-клеток, которые экспрессируют CD3 до очень
- 25 высокого уровня («очень высокий уровень CD3»).
28. Способ по п. 17, отличающийся тем, что эффективный иммунный ответ включает индукцию и/или мобилизацию популяции дендритных клеток (ДК), которые экспрессируют CD11b до очень высокого уровня («дендритные клетки с очень высоким уровнем CD11b»).
29. Способ по любому из пп. 17–28, отличающийся тем, что доза GR-модулирующего
- 30 агента составляет эквивалентную дозу для человека (ЭДЧ) основания дексаметазона по меньшей мере примерно 12 мг/кг, по меньшей мере примерно 15 мг/кг, по меньшей мере

примерно 18 мг/кг, по меньшей мере примерно 24 мг/кг, по меньшей мере примерно 30 мг/кг или по меньшей мере примерно 45 мг/кг.

30. Способ по любому из пп. 17–29, отличающийся тем, что GR-модулирующий агент
- 5 представляет собой глюкокортикоид, например, дексаметазон.

Фиг. 1

CLUSTAL O(1.2.4), выравнивание множественных последовательностей: А. CD209_ЧЕЛОВЕК; В. ШИПОВИДНЫЙ_SARS2; С. CLC4М_ЧЕЛОВЕК; Д. ШИПОВИДНЫЙ_cvHSA

```

A. -----
B. MFVFLVLLPLVSSQCVNLTT--RTQLPPAY--TNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQS 116
C. -----
D. MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTLQDLFLPFYSNVTGFHTIN-----HTFGNPVPIPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQS 113

A. -----
B. LLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINIT 236
C. -----
D. VIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGT----QTHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINIT 229

A. -----
B. RFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRK 356
C. -----
D. NFRAILTAFS-----PAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPDGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERK 343

A. -----
B. RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAG 476
C. -----
D. KISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTVIADYNYKLPPDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPD 463

A. -----
B. STPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDITPCSFSGGVS 596
C. -----
D. GKPCTP-PALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVLSEFLLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPSCSFSGGVS 582

A. -----
B. KCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDITPCSFSGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHV 656
C. -----
D. QCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPSCSFSGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTAQAGCLIGAEHV 642

A. -----
B. NNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDK 776
C. -----
D. DTSYECDIPIGAGICASYHTVSL----LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFISISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQDR 758

A. -----MSDSKEPRLQQLGL-----LEEQL-----RGLGFRQTR-----GYKSLAGCLGHGPLVLQ-----LLSFTLLAGLL-----VQV-----SKV 63
B. NTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQI 896
C. -----MSDSKEPRVQQLGL-----LEEDPTTSGIRLFPRDFQFQQIH-----GHKSSTGCLGHGALVLQ-----LLSFMLLAGVLV-----AILVQV-----SKV 75
D. NTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTADAGFMKQYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQI 878
      .  *  *  ::  :*      :  :      ..:  *:      *  ***      :  ::  :*  :*      .      ::

```

Фиг. 1 (продолж.)

```

A. P-----SSISQEQSRQDAIYQNLTLQKAAVGELSEKSKLQEIYQELTQLKAAVGELPEKSKL--QEIYQELTRLKAAVGELPEKSKLQEIYQELTWLKAAGVPEKSKMQEIYQELTR 175
B. PFAMQMayRfNGIGVtQnVlyENQKLIANQFN-----SAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAI--SSVLNDILSRDLKVEAEVQ-----IDR 995
C. P-----SSLSEQSEQDAIYQNLTLQKAAVGELSEKSKLQEIYQELTQLKAAVGELPEKSKL--QEIYQELTRLKAAVGELPEKSKLQEIYQELTRLKAAVGELPEKSKLQEIYQELTR 187
D. PFAMQMayRfNGIGVtQnVlyENQKLIANQFN-----KAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAI--SSVLNDILSRDLKVEAEVQ-----IDR 977
*      :.      *:::* . :      . :      : * :.* :      :*:.* :      :      * :      :*:.* : . * :      . * *::* ..* :*: *      : *

A. LKAAVGELPEKSKQQEIYQELT---RLKAAVG---ELPE---KSKQQEIYQELTRLKAAVGELPEKSKQQEIYQELTQLK-----AAVERLCHPC----P----- 257
B. L--ITGRLQSL--QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCG---KGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFHTTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQR 1107
C. LKAAVGELPEKSKLQEIYQELT---ELKAAVG---ELPE---KSKLQEIYQELTQLKAAVGELPDQSKQQQIYQELTDLK-----TAFERLCRHC----P----- 269
D. L--ITGRLQSL--QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCG---KGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVFVFNGTSWFITQR 1089
*      .*. * .      : *:*      .::*:. .      :: *      :**      ::      : .:: : : : : : .:* :      ::      :*:      *

A. -----WEWTFFFQGNcyfMSNSQRNWH-DS----IT-----ACKEVGAQLVVIKSAAEQNFLQLQ--SSRSNRFTWMGLSDLNQEGTWQWVDGSPLLPSFK 340
B. NFYEPQIIITDNTFVSGNCDVVIgIvNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVvNIQK--EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLI 1225
C. -----KDWTFFQGNcyfMSNSQRNWH-DS----VT-----ACQEVRAQLVVIKTAEQNFLQLQ--TSRSNRFSWMGLSDLNQEGTWQWVDGSPSPSFQ 352
D. NFFSPQIIITDNTFVSGNCDVVIgIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVvNIQK--EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLI 1207
      : **..*** .: . . *      *      :      . : *:* *:. * : * :      . . . :      *.. : * . * *      : .:

A. QYWNRGEPNNVGEEDCAEFSGNGWNDKCNLAKFWICKKSAASCS---RDEEQFLSPAPATPNPPPA 404
B. AIVM-----VTIMLCMTSCCSCCLKGCCSCGSCCKFDEDD-SEPVLKGVKLHYT 1273
C. RYWNSGEPNNSGNEDCAEFSGSGWNDNRCDVDNYWICKKPA- CF----RDE----- 399
D. AIVM-----VTILLCCMTSCCSCCLKGACSCGSCCKFDEDD-SEPVLKGVKLHYT 1255
      .      * : .      * * .. *      **

```

Фиг. 2

Человеческая молекула межклеточной адгезии 3

10	20	30	40	50
MATMVPSVLW	PRACWTLLVC	CLLTPGVQGG	EFLLRVEPQN	PVLSAGGSLE
60	70	80	90	100
VNCSTDCPSS	EKIALETSLS	KELVASGMGW	AAFNLSNVTV	NSRILCSVYC
110	120	130	140	150
NGSQITGSSN	ITVYRLPERV	ELAPLPPWQP	VGQNFTLRCQ	VEDGSPRTSL
160	170	180	190	200
TVVLLRWEEE	LSRQPAVEEP	AEVTATVLAS	RDDHGAPFSC	RTELDMQPQG
210	220	230	240	250
LGLFVNVSAP	RQLRTFVLPV	TPPRLVAPRF	LEVETSWPVD	CTLDGLFPAS
260	270	280	290	300
EAQVYLALGD	QMLNATVMNH	GDTLTATATA	TARADQEGAR	EIVCNVTLGG
310	320	330	340	350
ERREARENLT	VFSFLGPIVN	LSEPTAHEGS	TVTVSCMAGA	RVQVTLDGVP
360	370	380	390	400
AAAPGQPAQL	QLNATESDDG	RSFFCSATLE	VDGEFLHRNS	SVQLRVLYGP
410	420	430	440	450
KIDRATCPQH	LKWKDKTRHV	LQCQARGNPY	PELRCLKEGS	SREVPVGIPF
460	470	480	490	500
FVNVTHNGTY	QCQASSSRGK	YTLVVMDIE	AGSSHFPVPF	VAVLLTLGVV
510	520	530	540	
TIVLALMYVF	REHQRSYSYH	VREESTYLPL	TSMQPTEAMG	EEPSRAE

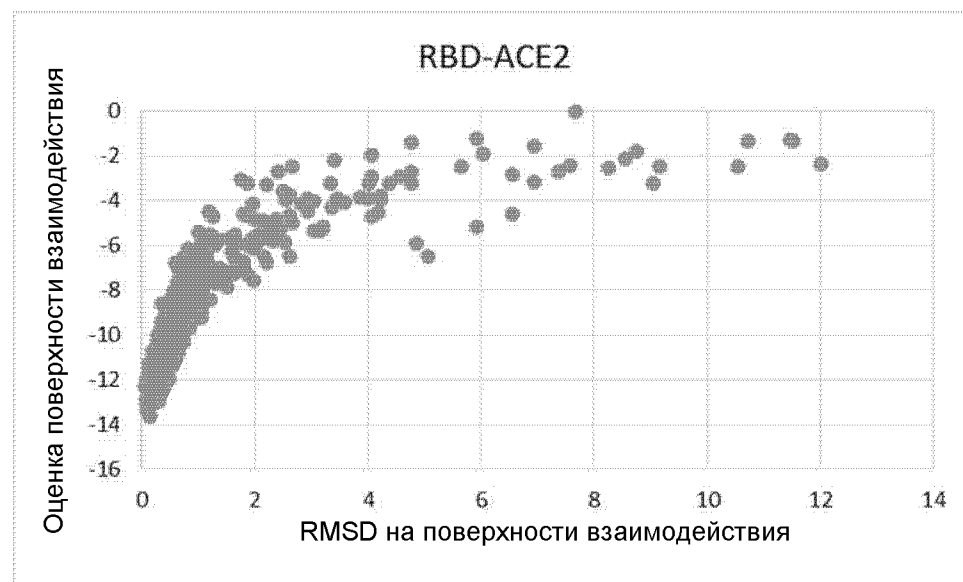
Фиг. 3



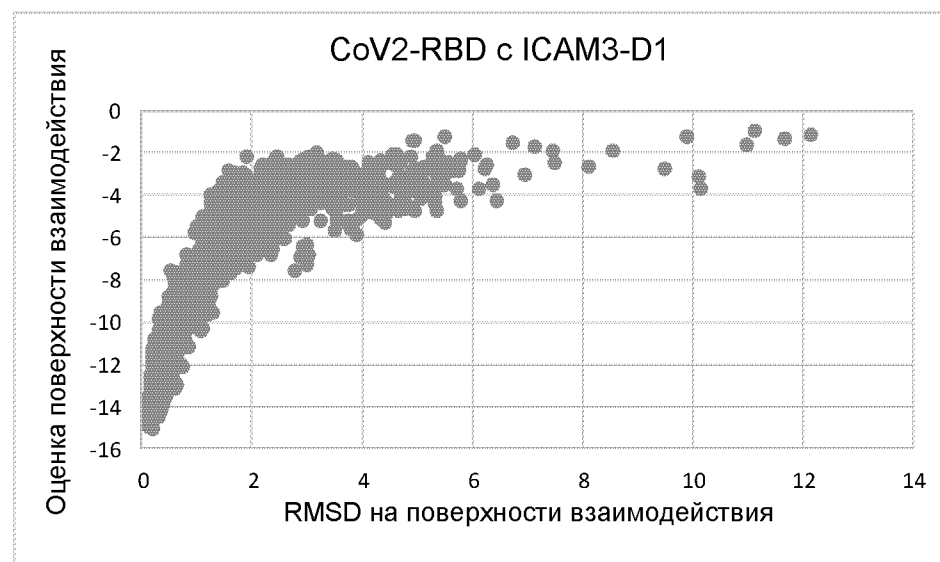
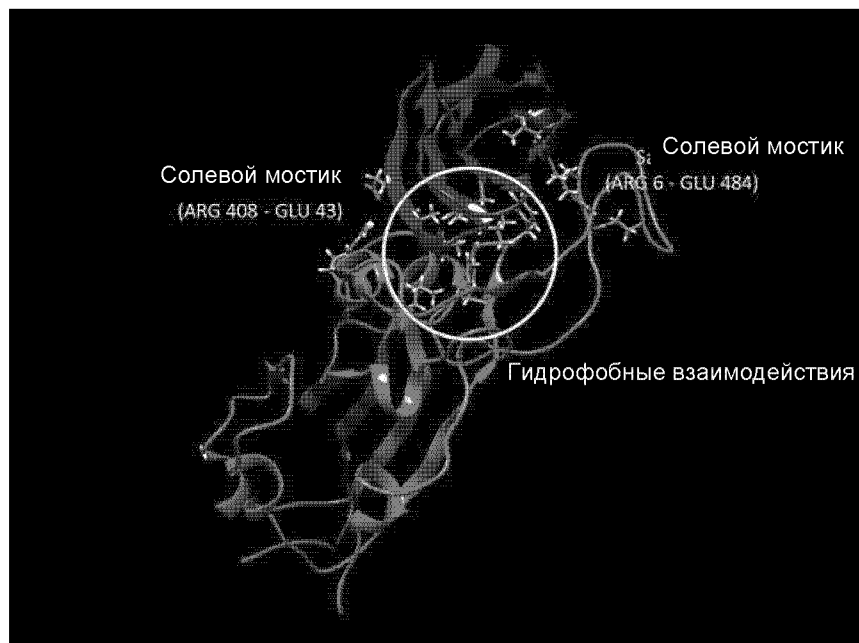
Фиг. 4



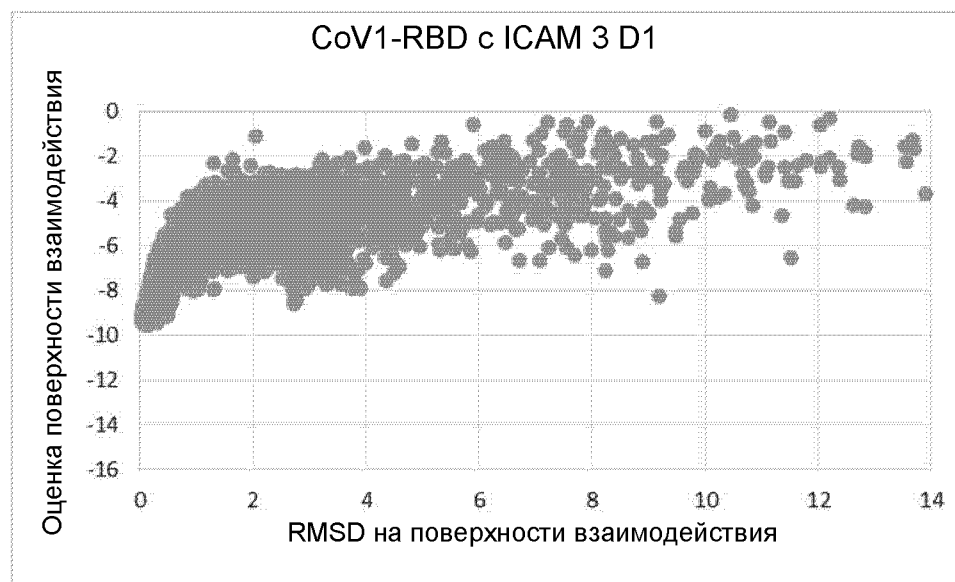
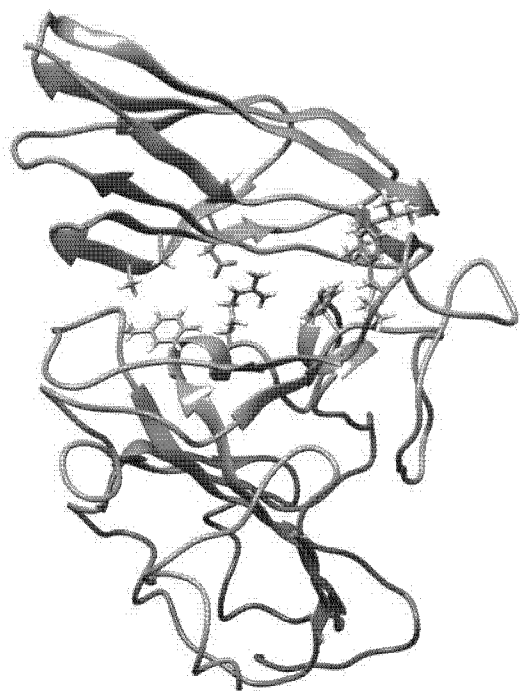
- ACE2
- RBD



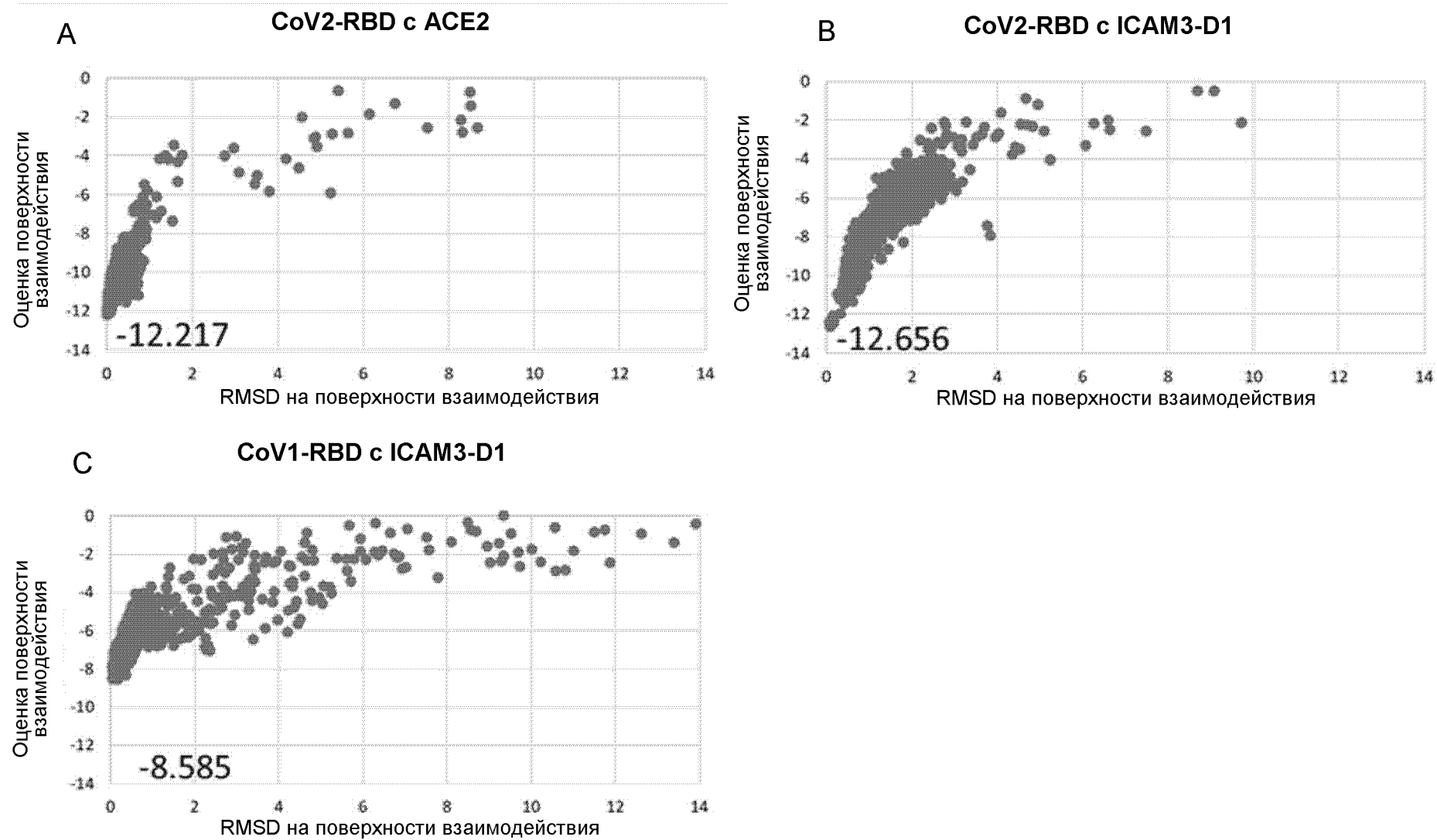
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

