



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.04.08

(21) Номер заявки  
201792447

(22) Дата подачи заявки  
2016.05.09

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)

### (54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ПАЦИЕНТОВ, ИМЕЮЩИХ ПОВЫШЕННЫЕ УРОВНИ CXCL9 И ДРУГИХ БИОМАРКЕРОВ

(31) 62/158,153; 62/221,393; 62/246,949

(32) 2015.05.07; 2015.09.21; 2015.10.27

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/EP2016/060360

(87) WO 2016/177913 2016.11.10

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

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

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

(56) M.B. JORDAN ET AL.: "How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis", BLOOD, vol. 118, no. 15, 13 October 2011 (2011-10-13), pages 4041-4052, XP055288710, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-03-278127 p 4050, rhc, last par before acknowledgements

M.B. JORDAN: "An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder", BLOOD, vol. 104, no. 3, 8 April 2004 (2004-04-08), pages 735-743, XP055288776, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2003-10-3413 abstract

JANA PACHLOPNIK SCHMID ET AL.: "Neutralization of IFN[gamma] defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice", EMBO MOLECULAR MEDICINE, vol. 1, no. 2, 4 May 2009 (2009-05-04), pages 112-124, XP055288706, Weinheim ISSN: 1757-4676, DOI: 10.1002/emmm.200900009 abstract

WO-A1-2013078378  
Anonymous: "NCT01818492 on 2015\_03 08: ClinicalTrials.gov Archive", 8 March 2015 (2015-03-08), XP055288703, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/archive/NCT

01818492/2015\_03\_08 [retrieved on 2016-07-14] the whole document

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

Anonymous: "Novimmune -- NEWS: New drug begins testing as first-line treatment for fatal childhood disease", 16 March 2015 (2015-03-16), XP055288715, Retrieved from the Internet: URL:http://www.novimmune.com/news/pr150316.html [retrieved on 2016-07-14] the whole document

Anonymous: "Novimmune -- NEWS: European Commission awards EUR 6 million FP7 grant to support clinical development of NI-0501 to 'FIGHT HLH'", 15 October 2012 (2012-10-15), XP055288746, Retrieved from the Internet: URL:http://www.novimmune.com/news/pr121015.html [retrieved on 2016-07-15] the whole document

WO-A2-2006109191

Brady Miller ET AL: "Hemophagocytosis in adults (Hemophagocytic Syndrome)", 2 November 2009 (2009-11-02), XP055288749, Retrieved from the Internet: URL:http://depts.washington.edu/hemeweb/seminars-conferences/HemophagocyticSyndromeF inal.pdf [retrieved on 2016-07-15] the whole document

G.V. DUARTE ET AL: "Osteopontin, CCL5 and CXCL9 are independently associated with psoriasis, regardless of the presence of obesity", CYTOKINE, vol. 74, no. 2, 1 August 2015 (2015-08-01), pages 287-292, XP055289042, US ISSN: 1043-4666, DOI: 10.1016/j.cyt.2015.04.015

JAMIE HARDEN: "Humanized anti-IFN-g (HuZAF) in the treatment of psoriasis", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 135, no. 2, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 553-556.e1, XP055289046, AMSTERDAM, NL ISSN: 0091-6749 the whole document

(57) В изобретении представлены способы и композиции для лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ). Изобретение также относится, главным образом, к способам и композициям для диагностирования и лечения заболеваний, ассоциированных с повышенными уровнями CXCL9, повышенными уровнями общего IFNγ и других биомаркеров. Изобретение также относится к способам лечения, замедления прогрессирования или иным образом ослабления

симптома заболевания у пациентов, имеющих повышенные уровни CXCL9, повышенные уровни общего IFN $\gamma$ , а также других биомаркеров, с использованием средств, которые препятствуют или являются антагонистами сигнализации интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ), включая нейтрализующие анти-IFN $\gamma$  антитела.

### Родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/158153, поданной 7 мая 2015 г., предварительной патентной заявки США № 62/221393, поданной 21 сентября 2015 г., и предварительной патентной заявки США № 62/246949, поданной 27 октября 2015 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, главным образом, к способам и композициям для лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ). Также предложены способы и композиции для диагностирования и лечения заболеваний, ассоциированных с повышенными уровнями CXCL9, повышенными уровнями общего IFN $\gamma$  и других биомаркеров. Изобретение также относится к способам лечения, замедления прогрессирования или иным образом ослабления симптома заболевания у пациентов, имеющих повышенные уровни CXCL9, повышенные уровни общего IFN $\gamma$ , а также других биомаркеров, с использованием средств, которые препятствуют или являются антагонистами сигнализации интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ), включая нейтрализующие анти-IFN $\gamma$  антитела.

### Предпосылки создания изобретения

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

IFN $\gamma$  вовлечен в целый ряд заболеваний; и были разработаны лекарственные препараты на основе анти-IFN $\gamma$  средств. Соответственно существует потребность в композициях и способах, используемых для идентификации биомаркеров продуцирования IFN $\gamma$  в IFN $\gamma$ -опосредованных заболеваниях.

### Сущность изобретения

В композициях и способах, описанных в настоящем документе, предложено использование полностью человеческого моноклонального антитела (мАт) IgG1 против интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ), называемого в настоящем документе NI-0501, которое связывает и нейтрализует IFN $\gamma$ . NI-0501 связывает растворимую и связанную с рецептором (IFN $\gamma$ R1) формы IFN $\gamma$ . Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ).

Анти-IFN $\gamma$  антитело, называемое в настоящем документе NI-051, содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AISGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWY-VPWHFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность EDNQRP (SEQ ID NO: 5); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6). NI-0501 содержит варибельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47 и варибельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48.

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

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, для лечения, предотвращения и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления ассоциированного симптома ГЛГ. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в течение одного часа в начальной дозе 1 мг/кг. В некоторых популяциях пациентов, например пациентов с низкой массой тела и/или очень молодых



дели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

[illegible]

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

после первоначальной в/в инфузии, через 9 дней после первоначальной в/в инфузии, через 12 дней после первоначальной инфузии и через 15 дней после первоначальной инфузии, и вторую серию дополнительных в/в инфузий выполняют через 3 недели после первоначальной в/в инфузии, через 4 недели после первоначальной в/в инфузии, через 5 недель после первоначальной в/в инфузии, через 6 недель после первоначальной инфузии, через 7 недель после первоначальной инфузии и через 8 недель после первоначальной инфузии.

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

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

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, для лечения, предотвращения и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления ассоциированного симптома ГЛГ. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, путем в/в инфузии в дозе, превышающей 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, путем в/в инфузии после введения начальной дозы во второй дозе, превышающей 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет по меньшей мере 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение 1 недели. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет 10 мг/кг, при этом ее вводят ежедневно в течение более 2 недель.

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

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

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

В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, NI-0501 вводят субъекту, который нуждается в этом, для лечения, предотвращения и/или отсрочки начала или прогрессирования, либо ослабления ассоциированного симптома ГЛГ в случаях, когда субъекту ранее вводили дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом, который ранее не получал лечение (то

есть который ранее не получал лечение от ГЛГ), и дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере  $10 \text{ мг/м}^2$ . В некоторых вариантах осуществления субъект получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при ГЛГ, и дексаметазон вводят в дозе, находящейся в диапазоне от 10 до  $5 \text{ мг/м}^2$ . В некоторых вариантах осуществления субъект получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при ГЛГ, и дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере  $5 \text{ мг/м}^2$ . В некоторых вариантах осуществления субъект получает NI-0501 в качестве терапии второй линии при ГЛГ, и дексаметазон вводят в дозе менее  $5 \text{ мг/м}^2$ .

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

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

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

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

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

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

Данное изобретение также относится к композициям и способам, полезным для идентификации или более точного определения группы пациентов, страдающих заболеванием, при котором пациент имеет повышенный уровень CXCL9, отдельно или в сочетании с одним или более дополнительными связанными с интерфероном  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) биомаркерами. В частности, изобретение относится к композициям и способам для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ). В частности, изобретение относится к композициям и способам для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, синдромом активации макрофагов (СМ). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, СМ в контексте аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, СМ в контексте системного аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно стра-

дающих, САМ в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы используют для определения уровней CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  у пациентов, страдающих, или предположительно страдающих, САМ в контексте системной красной волчанки (СКВ).

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

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

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

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

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

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

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

Заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов по изобретению, включают любое заболевание, при котором имеет место аберрантная, например повышенная, экспрессия и/или активность IFN $\gamma$ , в частности ГЛГ, включая вторичный ГЛГ, САМ и/или сЮИА.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит область VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); область VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и область VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); область VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность EDNQRPS (SEQ ID NO: 5); и область VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую сочетание последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2 и последовательности VH CDR3, при этом сочетание представляет собой сочетание трех последовательностей CDR тяжелой цепи (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), приведенных в одном ряду в табл. 1A.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит легкую цепь, содержащую сочетание последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, при этом сочетание представляет собой сочетание трех последовательностей CDR легкой цепи (VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3), приведенных в одном ряду в табл. 1B.



бранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102, и аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 и 102, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100 и 104.

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитело или его иммунологически активный

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

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

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

#### Краткое описание чертежей

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ем NI-0501.

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

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

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

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

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

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

### Подробное описание изобретения

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

Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, полезны для лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ). ГЛГ представляет собой синдром, характеризующийся сильным нарушением или отсутствием цитотоксической функции NK и CD8+ Т-клеток с резкой активацией иммунной системы.

ГЛГ включает первичный (генетический/семейный) ГЛГ и вторичный ГЛГ, оба клинически характеризуются нарушением регуляции иммунной системы, приводящим к сильно выраженной гиперцитокинемии с пагубными последствиями для различных тканей и органов (Henter J.I., Elinder G., Soder O. et al. "Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis", Blood 1991; 78: 2918-2922). Классификация ГЛГ приведена ниже в табл. 9:

Таблица 9

Классификация ГЛГ

|               | Семейный ГЛГ (СЛГ)                                       |                 |              |  |
|---------------|--|-----------------|--------------|--|
|               | Ген  | Белок           | Функция      |  |
| Первичный ГЛГ | FLH-1  | Неизвестен      | Неизвестен   |  |
|               | FLH-2  | PRF1            | Перфорин     | Порообразующий белок                       |
|               | FLH-3  | UNC13D          | Munc13-4     | Стимуляция везикул                         |
|               | FLH-4  | STX11           | Синтаксин 11 | Транспорт и слияние везикул                |
|               | FLH-5  | STXBP2 (UNC18B) | Munc18-2     | Транспорт и слияние везикул                |
|               | Синдромы иммунодефицита                                  |                 |              |  |
|               | Ген  | Белок           | Функция      |  |
|               | CHS  | LYST            | Lyst         | Транспорт везикул                          |
|               | GS-2   | RAB27A          | Rab27a       | Стыковка везикул                           |
|               | XLP-1, XLP-2   | SH2D1A, BIRC4   | SAP, XIAP    | Трансдукция сигнала и активация лимфоцитов |
| Вторичный ГЛГ | Инфекции   |                 |              |  |
|               | Ревматические заболевания (синдром активации макрофагов) |                 |              |  |
|               | Метаболические заболевания                               |                 |              |  |
|               | Злокачественные новообразования                          |                 |              |  |

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

Нарушение цитотоксической функции, имеющее место при ГЛГ, приводит к гиперцитокинемии и гемофагоцитозу. Это, в свою очередь, вызывает все типичные симптомы ГЛГ (Dhote R., Simon J., Papo T. et al. Reactive hemophagocytic syndrome in adult systemic disease: report of twenty-six cases and literature review. *Arthritis Rheum.* 2003; 49: 633-639; Risdall R.J., McKenna R.W., Nesbit M.E. et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer* 1979; 44: 993-1002; и Risdall R.J., Brunning R.D., Hernandez J.I., Gordon D.H.. Bacteria-associated hemophagocytic syndrome. *Cancer* 1984; 54: 2968-2972). Типичные симптомы ГЛГ включают, например, длительную лихорадку, спленомегалию, гепатомегалию, цитопению, гиперферритинемию, гипертриглицеридемию, гипоплазию костного мозга, менингеальную инфильтрацию.

Цитокины, уровень которых повышен у пациентов с ГЛГ, включают IFN $\gamma$ , интерлейкин 6 (IL-6), IL-10, фактор некроза опухолей (TNF) $\alpha$ , IL-8, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

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

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

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

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

В настоящее время не существует одобренных терапевтических средств для лечения ГЛГ. Однако эксперты в данной области разработали руководство для оказания медицинской помощи пациентам с ГЛГ (Henter J.I., Home A.C., Arico M., Egeler R.M., Filipovich A.H., Imashuku S., Ladisch S., McClain K.,

Webb D., Winiarski J. and Janka Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Blood Cancer 2007; 48: 124-13.1; Henter J.I., Samuelsson-Horne A., Arico M. et al. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. Blood 2002; 100: 2367-2373 и Jordan M.B., Allen C.E., Weitzman S., Filipovich A.H., McClain K.L. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood 2011; 118: 4041-4052).

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

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

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

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

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

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

Мыши с нокаутом гена перфорины (КО) считаются релевантной моделью заболевания человека. Действительно, у этих мышей после инфицирования LCMV развиваются все диагностические и многие из клинических и лабораторных характеристик человеческого заболевания, и без лечения эти животные погибают. Вследствие этого КО мышей с дефицитом перфорины стали использовать для изучения патофизиологии ГЛГ. ГЛГ-подобная патология, которая развивается у этих животных, зависит от CD8 $^{+}$  Т-клеток и IFN $\gamma$ , продуцируемого в ответ на стимуляцию антигеном.

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

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

Для исследования патофизиологии вторичного ГЛГ, имеющего место в контексте ревматических

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

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

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

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

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

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

Множество доказательств, полученных в моделях на животных, указывают на ключевую патогенную роль IFN $\gamma$  в первичном гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе (ГЛГ). Высокие уровни IFN $\gamma$  также обнаружены у людей, страдающих ГЛГ. Ранее сообщалось о том, что высокие уровни IFN $\gamma$  и трех связанных с IFN $\gamma$  хемокинов, CXCL9, CXCL10 и CXCL11, наблюдались у пациентов с активным САМ, формой вторичного ГЛГ, которая развивается в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА) (смотри, например, Bracaglia C., Caiello I., De Graaf K., et al. *Pediatric Rheumatology* 2014, 12 (Suppl 1): O3). Результаты, полученные на мышах, косвенно указывают на то, что IFN $\gamma$  преимущественно продуцируется в периферических тканях, и концентрации в крови могут быть относительно низкими.

Термин "синдром активации макрофагов (САМ)" означает тяжелое потенциально смертельное осложнение хронических воспалительных ревматических заболеваний. Как правило, он возникает в контексте системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), у 10-20% пациентов развивается данный синдром в ходе заболевания. Он также может иметь место, хотя более редко, при системной красной волчанке, болезни Кавасаки, а также при других аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях. При сЮИА САМ, как правило, возникает во время активных стадий заболевания, включая начало заболевания. Инфекционный триггер можно идентифицировать у большей части пациентов. Типичные признаки САМ включают лихорадку, спленомегалию, кровотечения и признаки нарушения работы печени, центральной нервной системы и почек, что может приводить к полиорганной недостаточности. Аномалии лабораторных показателей включают уменьшение количества белых клеток крови, тромбоцитов и гемоглобина, гипертрансаминаземию, заметное повышение уровня ферритина и свидетельства внутрисо-

судистой активации системы свертывания крови (Ravelli, A., et al., Macrophage activation syndrome as part of systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, genetics, pathophysiology and treatment. *Genes Immun.* 13(4): p. 289-98). CAM приводит к серьезным осложнениям и смерти, являясь причиной существенной части смертных случаев вследствие сЮИА (Minoia, F., et al., Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients. *Arthritis Rheumatol.* 2014. 66(11): p. 3160-9; Hashkes, P.J., et al., Mortality outcomes in pediatric rheumatology in the US. *Arthritis Rheum.* 2010. 62(2): p. 599-608). Лучшее понимание патогенеза заболевания с последующей идентификацией новых терапевтических мишеней и возможная разработка методов направленной терапии могут привести к существенному улучшению контроля заболевания и исхода CAM.

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

Результаты исследований пациентов, страдающих п-ГЛГ, а также животных моделей п-ГЛГ подтверждают гипотезу о том, что дефектная цитотоксическая активность и аномалии взаимодействия антигенпредставляющих клеток (АПК)-CD8<sup>+</sup> Т-клеток приводят к дефектам затухания иммунного ответа и аномальной активации Т-клеток. Результатом этого является неконтролируемая иммунная активация и продуцирование провоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами и макрофагами, приводящее к повреждению органов. Результаты исследований на животной модели п-ГЛГ, проводимых с использованием мышей с дефицитом перфорины и Rab27, указывают на важную роль интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ), продуцируемого активированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками. У мышей с дефицитом перфорины нейтрализация IFN $\gamma$  позволяет животным выживать при этом, как правило, летальном синдроме с возвращением к норме аномальных биохимических и гематологических показателей (Jordan, M.B., et al., An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8<sup>+</sup> T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood.* 2004. 104(3): p. 735-43; Pachlopnik Schmid, J., et al., Neutralization of IFN $\gamma$  defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. *EMBO Mol Med.* 2009. 1(2): p. 112-24). У мышей с дефицитом Rab27, у которых заболевание не приводит к гибели, нейтрализация IFN $\gamma$  вызывает заметное улучшение состояния периферических органов, включая центральную нервную систему (Pachlopnik 2009). Высокие уровни циркулирующего IFN $\gamma$  также обнаружены у пациентов с ГЛГ, диагностированным в соответствии с руководством по диагностике ГЛГ 2004 г. (My, L.T., et al., Comprehensive analyses and characterization of haemophagocytic lymphohistiocytosis in Vietnamese children. *Br J Haematol.* 2010. 148(2): p. 301-10; Takada, H., et al., Increased serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and monokine induced by gamma interferon in patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Exp Immunol.* 2003. 133(3): p. 448-53; Tang, Y., et al., Early diagnostic and prognostic significance of a specific Th1/Th2 cytokine pattern in children with haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol.* 2008. 143(1): p. 84-91; Xu, X.J., et al., Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J Pediatr.* 2012. 160(6): p. 984-90 e1) и, следовательно, не обязательно на основании наличия генетической мутации. Следует отметить, что эти исследования включали значительную, хотя и вариативную, часть пациентов без очевидной генетической причины заболевания (там же).

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

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

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

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

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

Таблица 1A  
Последовательности VH CDR из клонов антител,  
которые связывают и нейтрализуют IFN $\gamma$

| Название клона | VH CDR1                  | VH CDR2                              | VH CDR3                          |
|----------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| NI-0501        | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DGSSGWYVPHWFDP<br>(SEQ ID NO: 3) |
| AC1.2R3P2_A6   | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DGSSGWYVPHWFDP<br>(SEQ ID NO: 3) |
| AC1R3P2_B4     | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DHSSGWYVISGMDV<br>(SEQ ID NO: 9) |
| AD14R4P1_B9    | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DLTVGGPWYFDY<br>(SEQ ID NO: 11)  |
| AD14R4P2_C9    | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DGWNALGWLES<br>(SEQ ID NO: 14)   |
| AC1.4R4P2_C10  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1)  | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | DGSSGWYVPHWFDP<br>(SEQ ID NO: 3) |
| AC1.2R3P7_D3   | SNAMS<br>(SEQ ID NO: 20) | TLTGSGGTAYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 21) | GTELVGGLDN<br>(SEQ ID NO: 22)    |

|               |                         |                                     |                                  |
|---------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| AD1R2P2_D6    | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | DGWNALGWLES<br>(SEQ ID NO: 14)   |
| AC1.2R3P2_D8  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | DGSSGWYVPHWFDP<br>(SEQ ID NO: 3) |
| AD1.3R3P6_E1  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | RSFDSGGSFEY<br>(SEQ ID NO: 28)   |
| AD1.3R3P5_F8  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | VGSWYLEDFDI<br>(SEQ ID NO: 31)   |
| AD1.3R3P6_F9  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | GGNYGDYFDYFDY<br>(SEQ ID NO: 34) |
| AD14R4P2_G7   | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | DGWNALGWLES<br>(SEQ ID NO: 14)   |
| AD1.1R3P3_G9  | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | DFWVITSGNDY<br>(SEQ ID NO: 39)   |
| AD1.3R3P6_G10 | SYAMS<br>(SEQ ID NO: 1) | AISGSGGSTYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 2) | DGWNALGWLES<br>(SEQ ID NO: 14)   |

**Таблица 1В**  
**Последовательности VL CDR из клонов антител,**  
**которые связывают и нейтрализуют IFN $\gamma$**

| Название клона | VL CDR1                          | VL CDR2 | VL CDR3                        |
|----------------|----------------------------------|---------|--------------------------------|
| NI-0501        | TRSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 4)  | EDNQRP  | QSYDGSNRWM<br>(SEQ ID NO: 6)   |
| AC1.2R3P2_A6   | TRSSGSIVSNYVQ<br>(SEQ ID NO: 7)  | EDNRRPS | QSYDGSNRWM<br>(SEQ ID NO: 6)   |
| AC1R3P2_B4     | TRSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 4)  | EDNQRP  | QSNDSNVV<br>(SEQ ID NO: 10)    |
| AD14R4F1_B9    | TRSSGSIVSNYVQ<br>(SEQ ID NO: 7)  | DDQRP   | QSYDSSNVV<br>(SEQ ID NO: 13)   |
| AD14R4P2_C9    | TRSGSIGSYVQ<br>(SEQ ID NO: 15)   | DDKKRP  | QSYDSNNLVV<br>(SEQ ID NO: 17)  |
| AC1.4R4P2_C10  | TRSSGTIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 18) | EDNQRP  | QSYDNSHHV<br>(SEQ ID NO: 19)   |
| AC1.2R3P7_D3   | TGSGGSIATNYVQ<br>(SEQ ID NO: 23) | EDNQRP  | QSYDSNHHV<br>(SEQ ID NO: 24)   |
| AD1R2P2_D6     | TGSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 25) | EDNQRP  | QSYDSSNQEVV<br>(SEQ ID NO: 26) |
| AC1.2R3P2_D8   | TRSSGSIVSNYVQ<br>(SEQ ID NO: 7)  | EDNQRP  | QSYDSNNFV<br>(SEQ ID NO: 27)   |
| AD1.3R3P6_E1   | TRSGYIASSYVQ<br>(SEQ ID NO: 105) | EDDRPS  | QSYDDTTPV<br>(SEQ ID NO: 30)   |
| AD1.3R3P5_F8   | TRSSGSIASNYVH<br>(SEQ ID NO: 32) | EDNRRPS | QSSDTTYHGGV<br>(SEQ ID NO: 33) |
| AD1.3R3P6_F9   | TRSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 4)  | EDNQRP  | QSYEGF<br>(SEQ ID NO: 35)      |
| AD14R4P2_G7    | TGRNGNIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 36) | EDTQRP  | QSSDSNRVL<br>(SEQ ID NO: 38)   |
| AD1.1R3P3_G9   | TRSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 4)  | EDNRRPS | QSFDSNVLV<br>(SEQ ID NO: 40)   |
| AD1.3R3P6_G10  | AGSSGSIASNYVQ<br>(SEQ ID NO: 41) | EDNQRP  | QSYSYNNQV<br>(SEQ ID NO: 42)   |

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

Иллюстративные антитела по изобретению включают, например, антитело, называемое в настоя-

шем документе NI-0501, которое связывает человеческий IFN $\gamma$ . Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) антитела NI-0501 приведены ниже, при этом последовательности CDR подчеркнуты в аминокислотных последовательностях VH и VL:

#### Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NI-0501

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC  
GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA  
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGACACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT  
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTACCGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG  
ACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG  
TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC  
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTACACATGCCCA  
CCGTGCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAGG  
ACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGA  
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG  
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTACGCTCTCACCCTCTGCACCCAGGACT  
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAA  
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGG  
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA  
TCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCT  
GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGCAGGTGGCAGCAG  
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCCGGGTAATAG (SEQ ID NO: 43)

#### Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NI-0501

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPWGQGLTVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVTVFPPSSSLGTQTYICNVNHKFSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCTPFCPELLEGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

#### Нуклеотидная последовательность легкой цепи NI-0501

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
CTCCTGCACTCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAACAGCGCCCG  
GGCAGTTCCCCCACCCTGTCTATGAGGATAACCAGAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAATTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGAAGACTGA  
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTATGATGGCAGCAATCGTTGGATGTTCCGGCGGAGGG  
ACCAAGCTGACCGTCTTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCTCCCTCCT  
CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC  
CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGAGTGGAGACCACCAACCC  
TCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG  
AGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGC  
CCCTACAGAATGTTTCATAG (SEQ ID NO: 45)

#### Аминокислотная последовательность легкой цепи NI-0501

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQORPGSSPTTVIYEDNQRFSGV  
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDGSNRWFMFGGKTLTVLGGPKAAPSVTLF  
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTP  
EQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 46)

#### Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи NI-0501

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 47)

#### Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи NI-0501

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQORPGSSPTTVIYEDNQRFSGV  
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDGSNRWFMFGGKTLTVL (SEQ ID NO:  
48)

Соответствующие анти-IFN $\gamma$  антитела включают антитела, описанные в патенте США 7700098, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Некоторые иллюстративные антитела включают антитела, названные в указанном документе ARC1.2R3P2\_A6 ("A6"),

ARC1.2R3P2\_B4 ("B4"), ARC1.2R3P2\_B9 ("B9"), ARC1.2R3P2\_C9 ("C9"), ARC1.2R3P2\_C10 ("C10"), ARC1.2R3P2\_D3 ("D3"), ARC1.2R3P2\_D6 ("D6"), ARC1.2R3P2\_D8 ("D8"), ARC1.2R3P2\_E1 ("E1"), ARC1.2R3P2\_F8 ("F8"), ARC1.2R3P2\_F9 ("F9"), ARC1.2R3P2\_G7 ("G7"), ARC1.2R3P2\_G9 ("G9") и ARC1.2R3P2\_G10 ("G10").

Последовательности этих антител приведены ниже.

Нуклеотидная последовательность A6 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC  
GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCGGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID  
NO: 49)

Аминокислотная последовательность A6 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWYVPHWFDPWGRGTLVTVSS  
(SEQ ID NO: 50)

Нуклеотидная последовательность A6 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
CTCCTGCAGCTCGCAGCAGTGGCAGCATTGTCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAACAGCGCCCG  
GGCAGTGGCCCCACCACTGTCTATCTATGAGGATAACCGGAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAATACTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGGAGGCTGA  
GGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATGGCAGCAATCGTTGGATGTTCCGGCGGAGGG  
ACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO: 51)

Аминокислотная последовательность A6 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIIVSNYVQWYQQRPGSAPTIVIEDNRPSGV  
PDRFSGSIDSSNTASLTISGLEAEDEADYYCQSYDGSNRWFMFGGKTLTVLG (SEQ ID  
NO: 52)

Нуклеотидная последовательность B4 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCATAGCAGTGGCTGGTAC  
GTAATCTCCGGTATGGACGTCTGGGGCCGAGGACAAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID  
NO: 53)

Аминокислотная последовательность B4 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHSSGWYVISGMDVWGRGTMVTVSS  
(SEQ ID NO: 54)

Нуклеотидная последовательность B4 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
CTCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCG  
GGCAGTTCGCCACCACTGTGATCTCTGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
TCTCTGGCTCCGTCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATTCTGGACTGAGGACTGA  
GGACGAGGCTGACTATTACTGTCTAGTCTAATGATTCCGACAAATGTGGTTTTCCGGCGGAGGGACC  
AAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO: 55)

Аминокислотная последовательность B4 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTIVISEDNRPSGV  
PDRFSGSVDSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSNDSNVVFGGKTLTVLG (SEQ ID NO:  
56)

Нуклеотидная последовательность B9 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAGGACCTAACAGTGGGTGGTCCC  
TGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:  
57)

Аминокислотная последовательность B9 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLTVGGPWYFDYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 58)

## Нуклеотидная последовательность B9 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
 CTCCTGCACCCGCGAGTCGGCAGCATTGTGAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCCG  
 GGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTTTGACGATGACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGGTCGGT  
 TCTCTGGCTCCCTCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGGCTGCAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCAGCAATGTGGTATTCGGCGGGGGGACC  
 AAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 59)

## Аминокислотная последовательность B9 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTTRSSGSIVSNYVQWYQQRPGSAPTTVIFDDQRPSCV  
 PGRFSGSLDSSSNSASLTISGLQTEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO:  
 60)

## Нуклеотидная последовательность C9 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAAGATGGATGGAACGGCTGGGA  
 TGGCTTGAATCCTGGGGCCGGGACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 61)

## Аминокислотная последовательность C9 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGWNALGWLESWGRGTLTVSS  
 (SEQ ID NO: 62)

## Нуклеотидная последовательность C9 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGATAACCAT  
 CTCCTGCACCCGCGAGTGGTGGCAGCTATGGCAGCTACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCCG  
 GGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTATGACGATAAAAAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTATTGTGAGTCTTATGATAGCAACAATCTTGTGGTTTTCGGCGGAGGG  
 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 63)

## Аминокислотная последовательность C9 VL

NFMLTQPHSVSESPGRTITISCTTRSGGSIGSYVQWYQQRPGTAPTTVIYDDKKRPSGV  
 PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSSNNLVVFGGGTKVTVLG (SEQ ID  
 NO: 64)

## Нуклеотидная последовательность C10 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC  
 GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCAGGGGAGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID  
 NO: 65)

## Аминокислотная последовательность C10 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSSGWVVPWFDPWGRGTMVTVSS  
 (SEQ ID NO: 66)

## Нуклеотидная последовательность C10 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
 CTCCTGCACCCGCGAGTCGGCACCATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCCG  
 GGCAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAACAGCAATCATTGGGTGTTGCGCGGAGGG  
 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 67)

## Аминокислотная последовательность C10 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTTRSSGTIASNYVQWYQQRPSSPTTVIYEDNORPSCV  
 PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSSNNHWVFGGGTKVTVLG (SEQ ID  
 NO: 68)

## Нуклеотидная последовательность D3 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGAAACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCAATGCCATGAGTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTCTTACTGGTAGTGGTGGTACCGCATACTACGCAGACT  
 CCGTGGAGGGCCGGTTCAGCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACACTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAGGGCACGGAACCTCGTGGGAGGA  
 GGACITGACAACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 69)

## Аминокислотная последовательность D3 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNAMSWVRQAPGKLEWVSTLTGSGGGTAY  
YADSVEGRFISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTELVGGLDNWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 70)

## Нуклеотидная последовательность D3 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTGACGAT  
 CTCCTGCACCGGAGCGGAGGAGCATTGCCACCACTATGTGAGTGGTATCAGCAGCGCCCC  
 GGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCCATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACGGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGCAGCCTGA  
 GGACGAGGCTGATTACTACTGTGAGTCTTATGATAGTGACAATCATCATGTGGTATTCGGCGGA  
 GGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO: 71)

## Аминокислотная последовательность D3 VL

NFMLTQPHSLSESPGKTVTISCTGSGGSIATNYVQWYQQRPGSAPTIVIHEDNQRPESGV  
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLQFEADYYCQSYDSDNHHVVFVGGGKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 72)

## Нуклеотидная последовательность D6 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA  
 TGGCTTGAATCCTGGGGCAAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 73)

## Аминокислотная последовательность D6 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAKDGWNALEWLESGWKGTMVTVSS  
 (SEQ ID NO: 74)

## Нуклеотидная последовательность D6 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
 CTCCTGCACCGGAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGAGTGGTACCAGCAGCGCCCC  
 GGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCAGCAATCAAGAGGTGGTATTCGGCGGA  
 GGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO: 75)

## Аминокислотная последовательность D6 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSGGSIASNYVQWYQQRPGSAPTIVIEDNQRPESGV  
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSSNQEVVFGGGKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 76)

## Нуклеотидная последовательность D8 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAAGATGGTAGCAGTGGCTGGTAC  
 GTACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID  
 NO: 77)

## Аминокислотная последовательность D8 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAKDGSSGWVPHWFDPWGQGLTLVTSS  
 (SEQ ID NO: 78)

## Нуклеотидная последовательность D8 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTACCAT  
 CTCCTGCACCGGAGCAGTGGCAGCATTGTGAGCAACTATGTACAGTGGTACCAGCAGCGCCCC  
 GGCAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCAACAATTTTGGGTGTTCCGGCGGAGGG  
 ACCAAGCTGACCGTCTTAGGT (SEQ ID NO: 79)

## Аминокислотная последовательность D8 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTIVIEDNQRPESGV  
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSNNFVFGGGKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 80)

## Нуклеотидная последовательность E1 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAAAGGTCCCTTGATAGTGGTGGG  
 TCCTTTGAGTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 81)

## Аминокислотная последовательность E1 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCVKRSFDSGGSEYWGQGTMTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 82)

## Нуклеотидная последовательность E1 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTCACCAT  
 CTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCTACATTGCCAGCTCCTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCCG  
 GGCAGTTCCCCCACCCTGTAATCTTTGAGGATGACCGGAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACGGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAGGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATGACACCCTCCCTGGGTGTTCCGGCGGAGGG  
 ACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 83)

## Аминокислотная последовательность E1 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGYIASSYVQWYQQRPGSSPTTVIFEDDRPSGV  
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLRTEADYYCQSYDDTTPWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 84)

## Нуклеотидная последовательность F8 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCGGCAGCTGGTACCTGGAA  
 GATTTTGATATCTGGGGCCGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 85)

## Аминокислотная последовательность F8 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGSWYLEDFDIWGRGTMVTVSS  
 (SEQ ID NO: 86)

## Нуклеотидная последовательность F8 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTTACCAT  
 CTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTTCACTGGTATCAGCAGCGCCCCG  
 GGCAGTTTACCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCGAAGACCCTCTGGGGTCCCTGCTCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGGAGACTGA  
 CGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTCTGATACCACCTATCATGAGGTTGGTATTCGGC  
 GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 87)

## Аминокислотная последовательность F8 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVHWYQQRPGSSPTTVIYEDNRRPSGV  
 PARFSGSIDSSNSASLTISGLETDDEADYYCQSSDTTYHGGVVFVGGGKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 88)

## Нуклеотидная последовательность F9 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGCGGTAACCTACGGTGATTAC  
 TTCGACTACTTTGACTACTGGGGCAGAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO:  
 89)

## Аминокислотная последовательность F9 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGNYGDFDYFDYWGRGTMVTVSS  
 (SEQ ID NO: 90)

## Нуклеотидная последовательность F9 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
 CTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAATTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG  
 GGCAGTGCCCCCACCATTGTGATCTATGAAGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTCATCGGT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGAGGGGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC  
 CTAGGT (SEQ ID NO: 91)

## Аминокислотная последовательность F9 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTIVIYEDNQRPESGV  
 PHRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYEGEGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 92)

## Нуклеотидная последовательность G7 VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTACATATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA  
 TGCTTGAATCCTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 93)

**Аминокислотная последовательность G7 VH**

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSS~~SYAMSWVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTY  
~~YADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRA~~ЭДТАVYYCAKDGWNALGWLESWGQGTMTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 94)

**Нуклеотидная последовательность G7 VL**

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACGCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTGACCAT  
 TTCCTGCACCGGCAGAAATGGCAACATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG  
 GACAGTGGCCCCACCCCTTATAATCTTTGAAGATACCCAAAGACCCCTCTGGGGTCCCTACTCGGC  
 TCTCAGGCTCCATCGACACCTCCTCCAATTCTGCCTCCCTCATCATCTCTTCATTGAGGACTGA  
 GGACGAGGCTGATTACTACTGTCAATCTTCTGATTCCAACAGGGTGTGTTCGGCGGAGGGACC  
 AAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 95)

**Аминокислотная последовательность G7 VL**

NFMLTQPHAVSESPGKTVTISC~~TGRNGN~~IASNYVQWYQQRPD~~SAPT~~LIIFEDTORPSGV  
 PTRLSGSIDTSSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSSDSNRVLFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO:  
 96)

**Нуклеотидная последовательность G9 VH**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTACACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTACTGTGCGAAAGATTTTGGGTATTACGAGT  
 GGAATGACTACTGGGGCGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 97)

**Аминокислотная последовательность G9 VH**

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSS~~SYAMSWVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTY  
~~YADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRA~~ЭДТАVYYCAKDFWVITSGNDYWGRGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 98)

**Нуклеотидная последовательность G9 VL**

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTGACCAT  
 CTCCTGCACCGGCAGCAGTGGCAGCATTGCTAGCAATTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG  
 GGCAGTTCCCCCACCACTGTGATCTTTGAAGATAACCGAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT  
 TTTCTGGCTCCATCGACACCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCACTCTTTGATAGCACCAATCTTGTGGTGTTCGGCGGAGGG  
 ACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 99)

**Аминокислотная последовательность G9 VL**

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC~~TRSSGS~~IASNYVQWYQQRPGSSPTT~~VI~~FEDNRRPSGV  
 PDRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNLVVF~~FGGG~~TKLTVLG (SEQ ID  
 NO: 100)

**Нуклеотидная последовательность G10 VH**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTACACATACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAAAGATGGATGGAACGCGCTGGGA  
 TGGCTTGAATCCTGGGGGAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO: 101)

**Аминокислотная последовательность G10 VH**

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSS~~SYAMSWVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTY  
~~YADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRA~~ЭДТАVYYCAKDGWNALGWLESWGKGTITVTVSS  
 (SEQ ID NO: 102)

**Нуклеотидная последовательность G10 VL**

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCAT  
 CTCCTGCCCGGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG  
 GGCAGTGGCCCCACCGCTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGAT  
 TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGA  
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCAATCTTACTCTTACAACAATCAGGTCGTGTTCGGCGGAGGG  
 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT (SEQ ID NO: 103)

**Аминокислотная последовательность G10 VL**

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC~~AGSSGS~~IASNYVQWYQQRPGSAPTAVIYEDNORPSGV  
 PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYSNNQVVFGGGTKVTVLG (SEQ ID  
 NO: 104)

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитела имеют изотип IgG. В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитела имеют изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления анти-IFN $\gamma$  антитела по изобретению специфически связывают IFN $\gamma$  человека и/или яванского макака, при этом антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело NI-0501, антитело A6, антитело B4, антитело B9, антитело C9, антитело C10, антитело D3, ан-

титело D6, антитело D8, антитело E1, антитело F8, антитело F9, антитело G7, антитело G9 и/или антитело G10.

#### Определения.

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

#### Введение анти-IFN $\gamma$ антител.

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

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

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

"Терапевтически эффективное количество антитела" по изобретению означает, как правило, количество, необходимое для достижения терапевтической цели. Как отмечено выше, это может быть взаимодействие связывания между антителом и его антигеном-мишенью, что в некоторых случаях препятствует функционированию мишени. Количество, которое необходимо вводить, также будет зависеть от

аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном и, кроме того, будет зависеть от скорости, с которой вводимое антитело распространяется из свободного объема, введенного субъекту. Общепринятые диапазоны для терапевтически эффективной дозы антитела или фрагмента антитела по изобретению могут составлять, в качестве неограничивающего примера, от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг массы тела. Общепринятая частота введения доз может находиться в диапазоне, например, от двух раз в сутки до одного раза в неделю.

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

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

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

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

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

Уровни CXCL9 и других биомаркеров определяют с использованием любого из множества стандартных методов обнаружения. Можно использовать средства детекции для обнаружения присутствия конкретной мишени (или ее белкового фрагмента) в образце. В некоторых вариантах осуществления средство детекции содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления средство детекции представляет собой антитело (или его фрагмент) или зонд. В некоторых вариантах осуществления средство или зонд является меченым. Термин "меченые" применительно к зонду или антителу охватывает прямое мечение зонда или антитела путем связывания (то есть физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также не прямое мечение зонда или антитела путем проведения реакции с другим реагентом, который непосредственно является меченым. Примеры использования непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с помощью флуоресцентно-меченого вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда биотином, так что его можно обнаруживать с помощью флуоресцентно-меченого стрептавидина.

Термин "биологический образец" должен включать ткани, клетки и биологические жидкости, полу-

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

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

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

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

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

Композиции и способы по изобретению полезны для лечения вторичного ГЛГ. Композиции и способы по изобретению полезны для лечения синдрома активации макрофагов (САМ).

САМ является тяжелым, потенциально опасным для жизни осложнением ревматических заболеваний, которое вызывается избыточной активацией и экспансией Т-лимфоцитов и макрофагов. Неконтролируемая экспансия этих иммунных клеток приводит к выраженной гиперцитокинемии и гипервоспалительному состоянию, которое связано с лихорадкой, цитопениями, гепатоспленомегалией, дисфункцией

печени, аномалиями свертывания крови и гиперферритинемией, и может прогрессировать до полиорганной недостаточности и смерти (Schulert G.S., Grom A.A.: Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine-directed therapies. *Annu. Rev. Med.* 2015, 66: 145-159).

Из-за его сильного клинического и патологического сходства с ГЛГ САМ относят к вторичным или приобретенным формам ГЛГ. Действительно, недавно было установлено, что у большинства пациентов с САМ тесты показывают нарушение функции NK и перфорина, и у значительного числа пациентов с САМ наблюдаются полиморфизмы или гетерозиготные мутации в PRF1 и UNC13D (Zhang M., Behrens E.M., Atkinson T.P., Shakoory B., et al.: Genetic defects in cytotoxicity in macrophage activation syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2014, 16: 439).

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

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

Были предложены различные наборы критериев для диагностирования САМ у пациентов с сЮИА. Иногда рекомендуют для использования руководство по диагностике ГЛГ 2004 г. (Henter J., Horne A., Aricó M., Egeler R.M., et al.: HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007, 48: 124-131), в основном разработанное для первичных (генетических) форм ГЛГ. Однако эти критерии имеют некоторые ограничения и могут быть неприменимы к пациентам с сЮИА. Например, такие критерии, как цитопения и гипофибриногенемия на уровне ниже пороговых значений, которые должны иметь место согласно руководству ГЛГ-2004, становятся очевидными только на более поздних стадиях САМ, поскольку у этих пациентов часто наблюдаются повышенные количества белых клеток крови и тромбоцитов, а также повышенные сывороточные уровни фибриногена, как часть воспалительного ответа при сЮИА (Schulert G.S., Grom A.A.: Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine-directed therapies. *Annu. Rev. Med.* 2015, 66: 145-159). Гемофагоцитоз может отсутствовать в клинической картине у значительной части пациентов с САМ (Minoia F., Davi S., Horne A., Demirkaya E., et al.: Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 3160-3169). Кроме того, гемофагоцитоз, активность NK-клеток и sCD25 обычно не оценивают в контексте САМ.

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

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

Недавно была разработана диагностическая шкала оценки в баллах (HScore) и опробована в ретроспективной группе из 312 пациентов, из которых 162 были признаны имеющими реактивный гемофагоцитарный синдром (Fardet L., Galicier L., Lambotte O., Marzac C., Aumont C., Chahwan D., Coppo P., He-

jbllum G.: Development and validation of the HScore, a score for the diagnosis of reactive hemophagocytic syndrome. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2014, 66: 2613-2620). Девять переменных (3 клинических [то есть известная основополагающая иммуносупрессия, высокая температура, органоmegалия], 5 биологических [то есть уровни триглицеридов, ферритина, сывороточной глутаматоксалоацетаттрансаминазы, фибриногена и цитопения] и 1 цитологический [то есть признаки гемофагоцитоза в пунктате костного мозга]) были сохранены в HScore, и вероятность наличия гемофагоцитарного синдрома находится в диапазоне от <1% в случае HScore  $\leq 90$  до >99% в случае HScore  $\geq 250$ .

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

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

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

Полезность биологических соединений, ингибирующих пути IL-1, IL-6R или TNF $\alpha$ , для лечения САМ по-прежнему остается неясной. Хотя, как сообщалось, биологические соединения, ингибирующие эти пути, эффективны в отдельных случаях, также были сообщения о пациентах, у которых развился САМ в условиях такого лечения (Stern A., Riley R., Buckley L.: Worsening of macrophage activation syndrome in a patient with adult onset Still's disease after initiation of etanercept therapy. *J Clin Rheumatol* 2001, 7: 252-256; Ramanan A.V., Schneider R.: Macrophage activation syndrome following initiation of etanercept in a child with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2003, 30: 401-403; De Benedetti F., Brunner H.I., Ruperto N., Kenwright A., et al.: Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367: 2385-2395; Ruperto N., Brunner H.I., Quartier P., Constantin T., et al.: Two randomized trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367: 2396-2406), а также о пациентах, которые не отвечают на такую терапию, это свидетельствует о том, что ингибирование IL-1, IL-6R или TNF $\alpha$  не обеспечивает полную защиту от развития САМ и не является эффективным лечением для развившегося синдрома.

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

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

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

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

Мыши с нокаутом гена перфорины считаются релевантной моделью для первичного ГЛГ, поскольку у этих мышей после инфицирования LCMV развиваются все диагностические и многие из клинических и лабораторных характеристик человеческого заболевания. ГЛГ-подобное заболевание, которое развивается у этих животных, зависит от CD8+ Т-клеток и IFN $\gamma$ , продуцируемого в ответ на стимуляцию антигеном (Imashuku S., Hibi S., Fujiwara F., Todo S.: Hyper-interleukin (IL)-6-naemia in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93: 803-807). Было показано, что при нейтрализации высоких циркулирующих уровней IFN $\gamma$  за счет введения анти-IFN $\gamma$  антител не только возвращались к прежнему состоянию аномальные клинические и лабораторные показатели, но и резко возрастали показатели выживаемости. Напротив, абляция любого другого цитокина никак не влияла на выживаемость (Imashuku S., Hibi S., Fujiwara F., Todo S.: Hyper-interleukin (IL)-6-naemia in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93: 803-807; Xu X., Tang Y., Song H., Yang S., et al.: Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J. Pediatr.* 2012, 160:984-90.e1). Дополнительными доказательствами важности IFN $\gamma$  при ГЛГ являются высокие концентрации циркулирующего IFN $\gamma$  у таких пациентов (Henter J.I., Elinder G., Söder O., Hansson M., et al.: Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1991, 78: 2918-2922; Xu X., Tang Y., Song H., Yang S., et al.: Diagnostic accuracy of a specific cytokine pattern in hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J. Pediatr.* 2012, 160: 984-90.e1). В группе из 71 пациента, которых контролировали от момента диагностирования ГЛГ до лечения и последующего наблюдения, уровни IFN $\gamma$  превышали верхнюю границу нормальных значений (17,3 пг/мл) у всех пациентов и, в частности, 53,5% пациентов имели уровни, превышающие 1000 пг/мл. Также сообщалось, что уровни IFN $\gamma$  повышаются сразу и быстро и могут снижаться от >5000 пг/мл до нормальных значений в течение 48 ч при эффективном лечении ГЛГ.

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

Во-вторых, была изучена животная модель на трансгенных по гену IL-6 мышях, у которых IL-6 экспрессируется на высоком уровне, поскольку она имитирует состояние пациентов с сЮИА, ревматическим заболеванием, наиболее часто ассоциированным с вторичными формами ГЛГ. При стимуляции лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR) у этих животных наблюдали повышение показателей смертно-

сти, повышение продуцирования воспалительных цитокинов и гиперактивацию воспалительных сигнальных путей. Кроме того, у этих мышей наблюдали резкое сокращение количества тромбоцитов и нейтрофилов, повышение уровней SCD25, ферритина и LDH, что напоминало многие из признаков, как правило, имеющих у пациентов с CAM (Strippoli R., Carvello F., Scianaro R., De Pasquale L., et al.: Amplification of the response to Toll-like receptor ligands by prolonged exposure to interleukin-6 in mice: implication for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheum.* 2012, 64: 1680-1688). У этих мышей при нейтрализации IFN $\gamma$  за счет введения анти-IFN $\gamma$  антитела показатели выживаемости резко улучшаются и лабораторные показатели возвращаются к норме (Prencipe G. et al., статья готовится к печати).

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

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

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

В совокупности данные результаты создают надежное основание для нейтрализации IFN $\gamma$  в качестве направленной терапии для вторичного ГЛГ и CAM, а также для исследования этого подхода в клинических условиях.

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

Обоснование для идентификации популяции пациентов, которые получают пользу от лечения NI-0501, и для оценки эффективности NI-0501 при CAM/вГЛГ опирается на ряд факторов. Во-первых, данные доклинических исследований, полученные на животной модели, релевантной для CAM при сЮИА, показали, что нейтрализация IFN $\gamma$  приводит к заметному улучшению показателей выживаемости и возвращению к норме лабораторных показателей. Далее, обсервационные данные у пациентов с CAM/вГЛГ демонстрируют наличие высоких уровней IFN $\gamma$  и, что более важно, чрезвычайно повышенных уровней IFN $\gamma$ -индуцируемых хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В-третьих, у пациентов с CAM/вГЛГ концентрации IFN $\gamma$  и CXCL9 в значительной степени коррелируют с показателями заболевания, такими как уровни ферритина, тромбоцитов и трансаминаз. Далее, благоприятный профиль переносимости и отсутствие соответствующих проблем безопасности, наблюдаемые у пациентов с пГЛГ в предыдущих исследованиях, в которых все вводимые инфузией препараты хорошо переносились, подтверждая результаты исследования с участием здоровых добровольцев, а также отсутствие сообщений об инфекциях, вызываемых патогенами, которым, как известно, должна способствовать нейтрализация IFN $\gamma$ , кроме того, все из инфекций, имеющих у некоторых пациентов с пГЛГ, были признаны связанными не с лечением NI-0501, а с иммунным статусом пациентов, продолжительностью заболевания и предшествующим или сопутствующим лечением. В-пятых, предварительные данные предшествующих клинических испытаний демонстрируют благоприятное влияние на показатели заболевания с заметным началом проявления эф-

фектов в течение первых дней лечения: типичные клинические признаки и симптомы ГЛГ начинали заметно ослабевать после первого введения NI-0501 (лихорадка в пределах нескольких часов, сплено/гепатомегалия в пределах нескольких дней); и из 18 оцениваемых пациентов на момент прекращения сбора данных лечение NI-0501 позволило 10 пациентам перейти к ТГСК. Далее, данные, полученные с помощью подхода моделирования и имитации ФК, демонстрируют предсказуемый фармакокинетический профиль NI-0501, а также то, что нейтрализация IFN $\gamma$  достигается и сохраняется. И наконец, общепринятая терапия (например, CsA) может быть начата незамедлительно, без необходимости в периоде вымывания, в случае, если NI-0501 будет недостаточно для адекватного контроля заболевания.

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

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

#### Фармацевтические композиции.

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

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

Фармацевтические композиции, подходящие для введения инъекцией, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Подходящие для внутривенного введения носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), а также их соответствующие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования таких покрытий, как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования сурфактантов. Предохранения от действия микроорганизмов можно добиваться за счет использования различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов,

хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях в композицию будет предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированной абсорбции инъекционных композиций можно добиваться за счет включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например алюминия моностеарата и желатина.

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

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

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

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

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

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

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

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или дозирующее уст-

ройство вместе с инструкциями по введению.

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

### Примеры

Пример 1. Уровни CXCL9 в качестве биомаркера продуцирования IFN $\gamma$  при синдроме активации макрофагов (САМ).

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

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

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

Таблица 7

Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с САМ и у пациентов с активным сЮИА

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

N - количество нейтрофилов; PLT - количество тромбоцитов; ALT - аланинаминотрансфераза,

<sup>1</sup> - медиана (IQR); r\* - r Спирмена.

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

Пример 2. Корреляция уровней CXCL9 и IFN $\gamma$  у пациентов с первичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ).

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

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

Как показано на фиг. 2, сывороточные уровни CXCL9 и IFN $\gamma$  до введения доз измеряли с использованием технологии Lumiplex и MSD соответственно в образцах, полученных от 6 пациентов с первичным ГЛГ и от 3 пациентов, получавших препарат из соображений гуманности. Были проведены корреляции

между концентрациями CXCL9 и общего IFN $\gamma$ . Была проведена статистическая обработка данных и получены р-значения с использованием критерия Спирмена.

Пример 3. Корреляция уровней CXCL9 и IFN $\gamma$  у пациентов с вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ).

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

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

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

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

Пример 4. Корреляция уровней CXCL9 и IFN $\gamma$  у пациента с тяжелым гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ).

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

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

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

Таблица 8  
Уровни IFN $\gamma$ , связанных с IFN $\gamma$  хемокинов и IL-18 в момент начала лечения NI-0501 и в процессе лечения NI-0501

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

\* - медиана (межквартильный диапазон).

Лечение NI-0501 из соображений гуманности начинали на фоне введения дексаметазона (13,6

мг/м<sup>2</sup>) и в/в введения циклоспорина-А. NI-0501 вводили каждые 3 дня, а впоследствии каждые 7 дней в соответствии с фармакокинетикой. Реакции на инфузию не наблюдали. Препарат NI0501 хорошо переносился. Клинические признаки и лабораторные показатели ГЛГ прогрессивно улучшались. Активные текущие инфекции быстро исчезли. Через 5 месяцев лечения пациент оставался в отличном состоянии. Пациент продолжал получать перорально циклоспорин-А (6 мг/кг) и преднизон (0,3 мг/кг, экв. 0,9 мг/м<sup>2</sup> дексаметазона). Все показатели, характерные для ГЛГ, вернулись к норме.

У субъекта все еще наблюдались необъяснимые эпизоды воспаления. Анализ NLRC4 показал de novo миссенс-мутацию (Т337N). Были отмечены повышенные сывороточные уровни IL-18, что подтверждало важную роль мутации NLRC4. Было продемонстрировано продуцирование IFN $\gamma$  на высоком уровне за счет наличия высоких концентраций IFN $\gamma$  в комплексе с NI-0501. IFN $\gamma$  был полностью нейтрализован, о чем свидетельствовало отсутствие поддающихся обнаружению уровней IFN $\gamma$ -индуцируемых хемокинов (фиг. 5 и табл. 8). Циркулирующие уровни IL-18 были постоянно повышены.

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

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

Приведенные в настоящем документе данные получены в пилотном исследовании фазы 2 с участием детей, страдающих первичным ГЛГ. Первичный ГЛГ (пГЛГ) представляет собой редкое заболевание иммунной регуляции, которое является заведомо смертельным, если не применять лечение. Оно возникает в результате патологической иммунной активации, приводящей к развитию лихорадки, спленомегалии, цитопении и коагулопатии, что может вызывать полиорганную недостаточность и смерть. На основании данных, полученных в моделях первичного и вторичного ГЛГ (вГЛГ) на мышах, получавших лечение анти-IFN $\gamma$  антителом, а также результатов обсервационных исследований с участием пациентов с ГЛГ, продуцирование IFN $\gamma$  на высоком уровне считают критическим фактором, стимулирующим развитие заболевания. Иммуно-химиотерапия, главным образом, режимы лечения на основе этопозида в настоящее время считаются единственными фармакологическими подходами для контроля ГЛГ и подготовки пациентов к исцеляющей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Несмотря на недавние попытки дальнейшей интенсификации режимов лечения, смертность и частота осложнений остаются высокими, частично из-за связанной с лекарственными средствами токсичности.

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

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

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

Результаты: в целом, лечение с использованием NI-0501 приводило к значительному улучшению показателей активности ГЛГ (фиг. 6), и у 9 из 13 пациентов был достигнут удовлетворительный ответ. Для шести пациентов стал возможен переход к ТГСК. Для двух пациентов с хорошо контролируемым ГЛГ было запланировано проведение ТГСК после нахождения соответствующего донора. Для одного пациента (у которого был достигнут контроль заболевания при использовании NI-0501 в качестве терапии 1-й линии) ТГСК пока не планируется, учитывая отсутствие вызывающей ГЛГ генной мутации. 11 из 13 пациентов были живы в течение 8 недель. Признаки и симптомы нарушения функции ЦНС были устранены у 2 подлежащих оценке пациентов. Более чем 50% сокращение дозы дексаметазона было возможным для 50% пациентов в течение первых 4 недель лечения NI-0501.

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

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы: пациенты и образцы. Образцы периферической крови собирали от пациентов, страдающих сЮИА с или без САМ, в 3 педиатрических ревматологических центрах: Ospedale Pediatrico Bambino Gesù в Риме, Istituto Giannina Gaslini в Генуе и Медицинском центре детской больницы Цинциннати. Были изучены 54 пациента с сЮИА (возраст в начале заболевания 7,9 лет, межквартильный диапазон 4,6-13,6 лет; 48% женского пола), соответствующие классификационным критериям ILAR для системного артрита (Petty, R.E., et al., International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. J Rheumatol, 2004. 31(2): p. 390-2). У 20 из пациентов с сЮИА образцы были собраны во время эпизодов активного резко выраженного САМ, который был диагностирован лечащими врачами в каждом из трех центров. Апостериорный анализ показал, что 17 из этих 20 эпизодов (85%) отвечали новым предложенным квалификационным критериям САМ (Minoia F., Davi S., Bovis F., et al. Development of new classification criteria for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. Pediatric Rheumatology 2014, 12 (Suppl 1):O1). Были доступны образцы от 28 пациентов с активным сЮИА без признаков САМ. 35 образцов были доступны от

35 пациентов с сЮИА (как имеющих, так и не имеющих САМ в их истории болезни) в стадии клинически неактивного заболевания, определенного в соответствии с критериями Уолласа (Wallace, C.A., et al., Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*, 2004. 31(11): p. 2290-4).

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

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

Количественное определение цитокинов.

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

Эксперименты на животных.

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

Статистический анализ.

Статистический анализ выполняли с использованием программы GraphPad Prism 5. Непрерывные переменные (количественные демографические, клинические и лабораторные данные) выражали в виде медиан и межквартильных диапазонов (IQR) и сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Знаковый ранговый критерий Уилкоксона использовали для сравнения двух парных групп, не предполагая, что распределение различий до-после следует распределению Гаусса. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для оценки связи с лабораторными показателями. Р-значение  $<0,05$  считали показателем статистической значимости.

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

При сравнении пациентов, имеющих САМ в момент сбора образцов, с пациентами с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов уровни IL-1 $\beta$  и IL-6 были сопоставимыми, это указывало на то, что уровни двух цитокинов, которые, как известно, играют ключевую роль в активном сЮИА, не возрастают во время резко выраженного САМ. Следует отметить, что циркулирующие уровни IL-1 $\beta$  были ниже предела количественной оценки (то есть 3,5 пг/мл) у большинства пациентов с сЮИА при наличии или отсутствии САМ. Напротив, циркулирующие уровни  $IFN\gamma$  были значительно выше у пациентов с активным САМ по сравнению с пациентами с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов. Уровни трех связанных с  $IFN\gamma$  хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 также были значительно выше у пациентов с активным САМ по сравнению с пациентами с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов. Это различие было особенно очевидным в случае CXCL9, медианные уровни которого были примерно в 15 раз выше у пациентов с САМ, чем у пациентов с активным сЮИА без САМ.

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

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

Уровни  $IFN\gamma$  и связанных с  $IFN\gamma$  хемокинов коррелируют с аномальными лабораторными показателями САМ. Впоследствии была изучена корреляция уровней  $IFN\gamma$  и трех  $IFN\gamma$ -индуцируемых хемокинов с лабораторными показателями САМ в момент сбора образцов. У пациентов с активным сЮИА без САМ уровни  $IFN\gamma$  и трех  $IFN\gamma$ -индуцируемых хемокинов не были связаны с лабораторными показателями САМ за одним исключением: уровни CXCL9, CXCL10 и CXCL11 слабо коррелировали с уровнями ALT с величиной  $r^2$  в диапазоне от 0,17 до 0,25 (табл. 2). Значимость этой связи остается неясной; однако следует отметить, что уровни ALT находились в пределах диапазона нормальных значений у всех пациентов с активным сЮИА без САМ. У пациентов с САМ в момент сбора образцов не было обнаружено никакой существенной корреляции лабораторных показателей САМ с уровнями IL-1 и IL-6. Напротив, у пациентов с САМ в момент сбора образцов уровни  $IFN\gamma$  и  $IFN\gamma$ -индуцируемых хемокинов были связаны с уровнями ферритина, количествами нейтрофилов и тромбоцитов, а также с повышенными уровнями LDH и ALT, все из которых, как правило, являются аномальными у пациентов с САМ (табл. 2). Корреляции с аномальными лабораторными показателями были особенно очевидны для  $IFN\gamma$  и для CXCL9, за единственным исключением корреляции  $IFN\gamma$  с LDH, которая не была статистически значимой (табл. 2 и фиг. 10A-10J). Опять-таки, как упомянуто выше, данные корреляции отсутствовали у пациентов с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов. Один пациент в этой группе имел существенно повышенные

уровни IFN $\gamma$  (336,2 пг/мл), CXCL9 (549400 пг/мл) и CXCL10 (35066 пг/мл). Этот пациент имел особенно тяжелую форму САМ и был госпитализирован в отделении интенсивной терапии с тяжелыми нарушениями функций центральной нервной системы. Это наблюдение дополнительно свидетельствует в пользу гипотезы о том, что существует сильная связь между уровнями IFN $\gamma$  и CXCL9 и тяжестью заболевания. В совокупности, эти результаты показывают, что повышенное продуцирование IFN $\gamma$  и связанных с IFN $\gamma$  хемокинов является характерным признаком активного САМ, который сильно коррелирует с тяжестью аномалии лабораторных показателей САМ.

Таблица 2

Сывороточные уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  и трех связанных с IFN $\gamma$  хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 у пациентов с активным вторичным ГЛГ с активным САМ в момент сбора образцов, с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов и с клинически неактивным сЮИА

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

Значения представлены в виде медианы (межквартильный диапазон);

\* - активный сЮИА против клинически неактивного сЮИА: p < 0,01.

Таблица 3

Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с САМ и у пациентов с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов

|                              | САМ                            | IFN $\gamma$ |       | CXCL9 |       | CXCL10 |       | CXCL11 |       | IL-6  |       |
|------------------------------|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
|                              |                                | r*           | p     | r*    | p     | r*     | p     | r*     | p     | r*    | p     |
| <b>Ферритин</b>              | 9000 (3158-13174) <sup>1</sup> | 0,57         | 0,014 | 0,49  | 0,041 | 0,56   | 0,002 | 0,62   | 0,023 | 0,17  | >0,1  |
| <b>NEU</b>                   | 6,9 (3,4-13,9) <sup>1</sup>    | -0,64        | 0,005 | -0,61 | 0,010 | -0,37  | >0,1  | -0,08  | >0,1  | 0,09  | >0,1  |
| <b>PLT</b>                   | 197 (114-392) <sup>1</sup>     | -0,53        | 0,017 | -0,52 | 0,022 | -0,58  | 0,008 | -0,22  | >0,1  | -0,02 | >0,1  |
| <b>ALT</b>                   | 46 (18-164) <sup>1</sup>       | 0,49         | 0,045 | 0,49  | 0,044 | 0,51   | 0,038 | 0,06   | >0,1  | -0,44 | 0,080 |
| <b>LDH</b>                   | 1152 (722-2135) <sup>1</sup>   | 0,45         | 0,095 | 0,62  | 0,013 | 0,64   | 0,001 | 0,64   | 0,048 | 0,08  | >0,1  |
| <b>Активный сЮИА без САМ</b> |                                |              |       |       |       |        |       |        |       |       |       |
|                              |                                | r*           | p     | r*    | p     | r*     | p     | r*     | p     | r*    | p     |
| <b>Ферритин</b>              | 214 (37-1669) <sup>1</sup>     | -0,27        | >0,1  | 0,28  | >0,1  | 0,27   | >0,1  | 0,29   | >0,1  | -0,12 | >0,1  |
| <b>N</b>                     | 8,4 (5,2-14,5) <sup>1</sup>    | 0,30         | >0,1  | 0,40  | 0,061 | 0,32   | >0,1  | 0,40   | 0,067 | 0,28  | >0,1  |
| <b>PLT</b>                   | 444 (353-544) <sup>1</sup>     | 0,21         | >0,1  | -0,14 | >0,1  | -0,13  | >0,1  | 0,27   | >0,1  | 0,35  | 0,064 |
| <b>ALT</b>                   | 16 (11-24) <sup>1</sup>        | 0,29         | >0,1  | 0,42  | 0,049 | 0,50   | 0,011 | 0,44   | 0,039 | 0,04  | >0,1  |
| <b>LDH</b>                   | 506 (455-851) <sup>1</sup>     | 0,07         | >0,1  | 0,49  | >0,1  | 0      | >0,1  | 0,26   | >0,1  | 0     | >0,1  |

NEU - количество нейтрофилов; PLT - количество тромбоцитов; ALT - аланинаминотрансфераза; LDH - лактатдегидрогеназа; <sup>1</sup> - медиана (IQR); r\* - r Спирмена.

Корреляция лабораторных показателей активности заболевания с уровнями IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 и IL-6 у пациентов с САМ и у пациентов с активным сЮИА.

Корреляция уровней IFN $\gamma$  с уровнями IFN $\gamma$ -индуцируемых хемокинов у пациентов с САМ. Для дальнейшего выяснения связи между IFN $\gamma$  и тремя IFN $\gamma$ -индуцируемыми хемокинами у пациентов с САМ оценивали корреляцию уровней IFN $\gamma$  с уровнями каждого отдельного хемокина. Примечательно, что, судя по всему, CXCL9 в основном, и специфически, индуцируется IFN $\gamma$ , в то время как CXCL10 и CXCL11 также индуцируются интерферонами I типа. С этим согласуется тот факт, что у пациентов с активным САМ циркулирующие уровни IFN $\gamma$  в значительной степени коррелировали с уровнями CXCL9 (r=0,693; r<sup>2</sup>=0,48; p=0,001), однако в меньшей степени коррелировали с уровнями CXCL10 (r=0,535;

$r^2=0,29$ ;  $p=0,015$ ) (фиг. 11A-11F). Корреляция с уровнями CXCL11 также была слабее и не достигала уровня статистической значимости ( $r=0,447$ ;  $r^2=0,20$ ;  $p=0,08$ ) (не показано).

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

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

В резком противоречии с этим в данном исследовании были продемонстрированы заметно повышенные уровни IFN $\gamma$  и связанных с IFN $\gamma$  хемокинов у пациентов с активным САМ в момент сбора образцов по сравнению с уровнями у пациентов, имеющих активный сЮИА без САМ в момент сбора образцов. Это также было подтверждено в случае отдельных пациентов, у которых были серийно взяты образцы как во время активного САМ, так и во время активного сЮИА без САМ. Кстати, в данном исследовании у пациентов, у которых были собраны образцы во время САМ, не было обнаружено значительного увеличения уровней IL-6 или IL-1 $\beta$ , а также какой-либо связи с лабораторными показателями САМ, это

указывало на то, что эти цитокины, хотя и серьезно вовлечены в патогенный механизм сЮИА (De Benedetti, F., et al., Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med*, 2012. 367(25): p. 2385-95; Ruperto, N., et al., Two randomized trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med*, 2012. 367(25): p. 2396-406), могут не играть ключевую роль в поддержании САМ. Эти данные о повышенных уровнях IFN $\gamma$  и связанных с IFN $\gamma$  хемокинов согласуются с некоторыми полученными ранее результатами. Shimizu с соавторами сообщали, что уровни неоптерина, катаболита гуанозинтрифосфата, синтезируемого человеческими макрофагами при стимуляции IFN $\gamma$ , были выше у пациентов с САМ во время сЮИА, чем у пациентов с активным сЮИА без САМ (Shimizu, M., et al., Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(9): p. 1645-53). Совсем недавно Put с соавторами сообщили о повышенных уровнях IFN $\gamma$  и CXCL10 у 5 пациентов как с первичным, так и с вторичным ГЛГ, 3 из которых имели САМ в процессе сЮИА (Put, K., et al., Cytokines in systemic juvenile idiopathic arthritis and haemophagocytic lymphohistiocytosis: tipping the balance between interleukin-18 and interferon-gamma. *Rheumatology (Oxford)*, 2015). Согласно этим результатам 5 пациентов с активным сЮИА без САМ в момент сбора образцов имели заметно более низкие уровни IFN $\gamma$  и CXCL10 (Put et al., *Rheumatology* 2015).

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

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

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

Данные, полученные в животных моделях п-ГЛГ на мышах как с нокаутом гена перфорины, так и с нокаутом гена Rab27a, однозначно демонстрируют патогенную роль IFN $\gamma$ . Аналогично, недавно полученные данные в индуцируемой TLR9 модели ГЛГ, модели ГЛГ, вторичного по отношению к инфекции, также продемонстрировали важную роль повышенного продуцирования IFN $\gamma$  (Behrens, E.M., et al., Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J Clin Invest*, 2011).

121(6): p. 2264-77 и (Bautois et al., готовится к печати). Недавние исследования с использованием описанной выше мышинной модели САМ показали, что лечение анти-IFN $\gamma$  антителом приводит к росту показателей выживаемости и возвращению к норме аномальных клинических и лабораторных показателей, характерных для САМ (Prencipe et al., готовится к печати). В совокупности результаты данного исследования и данные, полученные на животных, являются обоснованием нейтрализации IFN $\gamma$  как терапевтического подхода в случае САМ.

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

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

Доклинические исследования.

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

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

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

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

Всего 41 нежелательное явление (НЯ) наблюдали после начала инфузии лекарственного средства у 14 из 20 субъектов (70%), о 10 из которых сообщали 4 субъекта, получающие плацебо. 36 (87,8%) НЯ имели слабую интенсивность и 5 (12,2%) имели умеренную интенсивность. Не было отмечено никаких тяжелых или опасных для жизни НЯ. 23 НЯ (56,1%) у 10 из 14 субъектов, испытывавших НЯ, были признаны связанными с лекарственным средством (по меньшей мере с обоснованной вероятностью). Большинство НЯ были однократными, и не наблюдалось связи с увеличением дозы NI-0501. Все инфузии NI-0501 были неосложненными.

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

Клиническое исследование фазы 2/3. Материалы и методы: в данном исследовании участвуют пациенты с первичным ГЛГ. Исследование разделено на три части: скрининг, лечение и последующее наблюдение. Общая схема приведена на фиг. 12.

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

Из исследования исключают следующих пациентов: пациентов, которым был поставлен диагноз

вторичного ГЛГ вследствие подтвержденного ревматического или неопластического заболевания; пациентов, ранее получавших лечение любыми средствами, истощающими Т-клетки (такими как, например, глобулин против тимоцитов (ATG), анти-CD52 терапевтические средства), в течение предшествующих 2 недель до скрининга либо получавших лечение любым другим биологическим лекарственным средством в пределах 5-кратного определенного для него периода полужизни (за исключением ритуксимаба в случае документированной инфекции В-клеток вирусом EBV); пациентов с активными инфекциями микобактерий, *Histoplasma Capsulatum*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* и *Leishmania*; пациентов с признаками перенесенного туберкулеза или латентного туберкулеза; пациентов с положительными результатами серологического анализа на антитела к ВИЧ, антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В или гепатита С; пациентов с наличием злокачественного новообразования; пациентов, имеющих другое сопутствующее заболевание или врожденный порок с серьезным влиянием на функцию сердечно-сосудистой системы, легких, печени или почек; пациентов с историей гиперчувствительности или аллергии на любой компонент, используемый при проведении исследования; пациентов с отметкой о вакцинации живой или ослабленной живой (включая BCG) вакциной в течение предшествующих 12 недель до скрининга и/или беременным или кормящим грудью пациентов женского пола.

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

Таблица 4

## Препарат NI-0501

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

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

Таблица 5

## Клинические и лабораторные критерии для принятия решения об увеличении дозы

| День исследования (SD)     | Доза NI-0501                       |  |
|----------------------------|------------------------------------|--|
| В SD0                      | Начальная доза 1 мг/кг             |  |
| В SD3                      | Увеличение до 3 мг/кг              | Необходимые критерии:<br>- если лихорадка продолжается или повторно возникает (если имела место в начале исследования)<br>или<br>- если значительно ухудшается клиническое состояние |
| С SD6 и далее <sup>a</sup> | Увеличение до 3 мг/кг <sup>b</sup> | Необходимые критерии:<br>- если отсутствует  |

|                                     |                                    |   |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|
|                                     |                                    | <p>удовлетворительное улучшение клинического состояния</p> <p>и</p> <p>- имеет место по меньшей мере 1 из следующего:</p> <p>Количество тромбоцитов (<math>\times 10^3/\text{мкл}</math>)</p> <p>если</p> <p>исх. количество <math>&lt; 50 \rightarrow</math> нет улучшения до <math>&gt; 50</math></p> <p>исх. количество <math>50-100 \rightarrow</math> улучшение менее 30%</p> <p>исх. количество <math>&gt; 100 \rightarrow</math> любое уменьшение до <math>&lt; 100</math></p> <p>АКН (количество/мкл)</p> <p>если</p> <p>исх. количество <math>&lt; 500 \rightarrow</math> нет улучшения до <math>&gt; 500</math></p> <p>исх. количество <math>500-1000 \rightarrow</math> любое уменьшение до <math>&lt; 500</math></p> <p>исх. количество <math>&gt; 1000 \rightarrow</math> любое уменьшение до <math>&lt; 1000</math></p> <p>Ферритин (нг/мкл)</p> <p>если</p> <p>исх. уровни <math>\geq 3000 \rightarrow</math> нет улучшения (уменьшение <math>&lt; 20\%</math>)</p> <p>исх. уровни <math>&lt; 3000 \rightarrow</math> любое изменение до <math>&gt; 3000</math></p> <p>Спленомегалия <math>\rightarrow</math> ухудшение (при клиническом осмотре или УЗИ)</p> <p>Коагулопатия (следует учитывать и D-димер, и фибриноген)</p> <p>D-димер</p> <p>если аномалии в начале исследования <math>\rightarrow</math> нет улучшения</p> |
|                                     |                                    | <p>Фибриноген</p> <p>если</p> <p>исх. уровни <math>\leq 100 \rightarrow</math> нет улучшения</p> <p>исх. уровни <math>\geq 100 \rightarrow</math> любое уменьшение до <math>&lt; 100</math></p>   |
| С SD9 или SD12 и далее <sup>c</sup> | Увеличение до 3 мг/кг <sup>d</sup> | <p>Необходимые критерии:</p> <p>- в случае, если после минимум двух инфузий в дозе 3 мг/кг проведена повторная оценка и установлено, что соответствие вышеприведенным критериям по-прежнему имеет место</p>   |

<sup>a</sup> - доза NI-0501 должна быть увеличена с 1 до 3 мг/кг, если соответствие критериям имеет место после SD6;

<sup>b</sup> - если доза NI-0501 уже была увеличена в день SD3, должны быть выполнены по меньшей мере две инфузии в дозе 3 мг/кг перед повторной оценкой соответствия критериям;

<sup>c</sup> - в зависимости от того, произошло ли увеличение дозы до 3 мг/кг в SD3 или SD6;

<sup>d</sup> - для максимум четырех инфузий;

сокращения: исх. - исходное(ые); АКН - абсолютное количество нейтрофилов;

УЗИ - ультразвуковое исследование.

В этих исследованиях NI-0501 вводят в течение 8 недель, и период лечения будет разделен на 2 отдельных периода: периоды лечения 1 и 2, как показано на фиг. 12.

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

при условии установления благоприятного соотношения польза/риск для пациента.

В данных исследованиях NI-0501 вводят на фоне дексаметазона, доза которого может быть уменьшена в зависимости от состояния пациента. Пациентам, ранее не получавшим лечение, NI-0501 будут вводить на фоне дексаметазона в дозе 10 мг/м<sup>2</sup>. Пациенту, получающему NI-0501 в качестве терапии второй линии для ГЛГ, дексаметазон следует вводить в дозе по меньшей мере 5 мг/м<sup>2</sup>, или в дозе, которую вводили до скрининга, если она выше. Пациенты должны получать дексаметазон, начиная с SD-1.

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

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

Как рекомендовано в руководстве по лечению ГЛГ, пациенты получают профилактическое лечение против *Pneumocystis jirovecii*, грибковой инфекции и *Herpes zoster*, начиная со дня, предшествующего началу лечения NI-0501, до окончания исследования. Пациенты получают профилактическое лечение, начиная со дня, предшествующего началу лечения NI-0501 (то есть SD-1), до окончания исследования. Например, для предотвращения инфекции *Pneumocystis jirovecii* пациенты могут получать, например, 750 мг/м<sup>2</sup>/сутки сульфаметоксазола с 150 мг/м<sup>2</sup>/сутки триметоприма, принимаемые перорально в равно разделенных дозах два раза в сутки в течение 3 последовательных дней в неделю. Для предотвращения грибковой инфекции пациенты могут получать, например, 12 мг/кг флуконазола в сутки с максимальной суточной дозой 400 мг. Для предотвращения инфекции *Herpes zoster* пациенты могут получать, например, 200 мг ацикловира четыре раза в сутки для детей старше двух лет, для детей младше двух лет - 100 мг четыре раза в сутки. Эти терапевтические средства будут введены перорально, когда это возможно, в остальных случаях внутривенно.

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

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

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

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

Следующие терапевтические препараты нельзя использовать одновременно с введением NI-0501: этопозид, средства, истощающие Т-клетки, или любые другие биологические лекарственные средства, как правило, не допустимы, за исключением следующих: G-CSF в случае продолжительной нейтропении; ритуксимаба в случае документированной инфекции В-клеток вирусом EBV и дополнительных терапевтических препаратов против ГЛГ в случае нестабильного или ограниченного ослабления ГЛГ (как определено в настоящем документе) при использовании максимального уровня дозы NI-0501. Этопозид следует вводить, если только из анамнеза не известно об отсутствии ответа на препарат или о непереносимости лекарственного средства пациентом. Вакцинация живой или ослабленной (включая BCG) вакциной следует избегать на протяжении всего исследования, включая 4 недели периода последующего наблюдения. В случае если концентрации NI-0501 остаются на терапевтических уровнях после заверше-

ния исследования, период времени без вакцинаций следует продлевать до тех пор, пока не перестанет поддаваться измерению концентрация NI-0501.

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

Таблица 6

## Определение ответа

| Общая степень ответа |   |
|----------------------|---|
| <b>Полный ответ</b>  | <p>Ответ считают полным, если:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- отсутствует лихорадка=температура тела &lt;37,5°C</li> <li>- селезенка имеет нормальный размер, что определяют методом 3D УЗИ брюшной полости</li> <li>- отсутствует цитопения=абсолютное количество нейтрофилов <math>\geq 1,0 \times 10^9/\text{л}</math> и количество тромбоцитов <math>\geq 100 \times 10^9/\text{л}</math> [отсутствие G-CSF и поддерживающего переливания крови должно быть документировано по меньшей мере за 4 дня до решения об отсутствии цитопении]</li> <li>- отсутствие гиперферритинемии=сывороточный уровень &lt;2000 мкг/л</li> <li>- отсутствие признаков коагулопатии, то есть, нормальные уровни D-димера и/или нормальные уровни (&gt;150 мг/дл) фибриногена</li> <li>- отсутствие неврологических и СМЖ аномалий, связанных с ГЛГ</li> <li>- отсутствие устойчивого ухудшения показателей sCD25 (о чем свидетельствуют по меньшей мере два последовательных измерения, с показателями, &gt;2-кратно превышающими исходные показатели)</li> </ul> |

|   |   |
|---|---|
| <b>Частичный ответ</b>  | <p>Ответ считают частичным, если:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- по меньшей мере 3 из аномальных, характерных для ГЛГ клинических и лабораторных показателей (включая аномалии ЦНС) соответствуют вышеуказанным критериям для «полного ответа». В случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 3 аномальными, характерными для ГЛГ показателями, по меньшей мере 2 показателя должны удовлетворять указанным критериям</li> <li>- отсутствует прогрессирование других патологических признаков ГЛГ (таких как, например, желтушность, размер печени, отек, клинические изменения в ЦНС)</li> </ul> |
| <b>Ослабление ГЛГ</b>   | <p>- уменьшение (&gt;50% изменение от исходного значения) по меньшей мере 3 аномальных, характерных для ГЛГ клинических и лабораторных показателей (включая аномалии ЦНС). В случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 2 аномальными, характерными для ГЛГ показателями, изменение от исходного значения, превышающее 50%, для обоих показателей позволяет констатировать ослабление ГЛГ.</p>   |
| <b>Ограниченное ослабление/Отсутствие ослабления/Отсутствие ответа</b>  |   |
| <p>- менее чем 50% изменение от исходного значения 3 или более из вышеуказанных аномальных, характерных для ГЛГ клинических и лабораторных показателей [в случае «реактивированных пациентов», которые были включены в исследование с 2 аномальными, характерными для ГЛГ показателями, изменение от исходного значения менее, чем на 50%, для обоих показателей будет достаточным для констатации ограниченного ослабления заболевания]</p> <p><b>и</b></p> <p>- отсутствие явного ослабления других патологических аспектов заболевания</p>   |   |
| <b>Реактивация</b>  |   |
| <p>- ухудшение двух или более клинических и лабораторных показателей ГЛГ со следующими спецификациями:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. количественные лабораторные показатели* должны стать аномальными и ухудшиться более, чем на 30%, относительно предыдущего измерения при двух последовательных оценках, выполняемых с интервалом минимум 1 день и максимум 1 неделю</li> <li>2. ухудшение клинических показателей должно быть подтверждено соответствующими наблюдениями ухудшения в течение трех последовательных дней</li> </ol> <p>- развитие новых, или повторное возвращение, ЦНС симптомов считают монокритерием для реактивации.</p> <p>* Следующие лабораторные показатели особо учитывают при определении реактивации:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- тромбоциты</li> <li>- нейтрофилы</li> <li>- фибриноген</li> <li>- ферритин</li> <li>- растворимый CD25 (sCD25; то есть, растворимый рецептор IL-2).</li> </ul> <p>Оценку функции NK, уровней эритроцитов/гемоглобина и триглицеридов нельзя рассматривать при определении реактивации.</p> |   |

Показатели безопасности, которые следует собирать и оценивать, включают частоту возникновения, тяжесть, причинную обусловленность и исход нежелательных явлений (НЯ) (серьезных и несерьезных), с особым вниманием, уделяемым инфекциям; изменение лабораторных показателей, таких как полное количество клеток крови (СВС), особенно красных клеток (гемоглобин), нейтрофилов и тромбо-

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

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

Введение NI-0501 пациентам приводит к быстрой нормализации лихорадочного состояния в течение нескольких часов после первой инфузии NI-0501. На фиг. 13A и 13B показан эффект инфузии NI-0501 на температуру тела у двух пациентов, имеющих температуру тела  $>37,5^{\circ}\text{C}$  в момент начала лечения NI-0501. На фиг. 14 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество нейтрофилов у пациентов. На фиг. 15 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на количество тромбоцитов у пациентов. На фиг. 16 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на сывороточные уровни ферритина у пациентов. На фиг. 17 приведены серия графиков и таблица, демонстрирующие эффект введения NI-0501 на снижение дозы глюкокортикоидов у пациентов. На фиг. 18 приведен график, показывающий, что введение NI-0510 поддерживает нейтрализацию IFN $\gamma$  до времени проведения ТГСК. Изменение показателей ГЛГ в ответ на введение NI-0501 также сохраняется до трансплантации. Пациенты также были оценены на любые признаки вовлеченности ЦНС после введения NI-0501. Сводные исходные показатели вовлеченности ЦНС и состояние на момент окончания исследования (ЕОТ) приведены ниже в табл. 11.

Таблица 11

**Ответ на введение NI-0501 - вовлеченность ЦНС**

|                              | <b>Начало исследования (SDO)</b>                             | <b>ЕОТ</b>                 |
|------------------------------|--|----------------------------|
| Пациент<br>№ 6               | Пritупление чувствительности; гемипарез                      | Устранено                  |
|                              | Нарушение темпов развития                                    | Полностью<br>восстановлено |
|                              | Повышенное содержание белка и неоптерина в<br>СМЖ; Плеоцитоз | Устранено                  |
|                              | Аномальная активация на МРТ                                  | Скорректировано            |
| Пациент<br>№ 3               | Повышенное содержание белка в СМЖ;<br>Плеоцитоз              | Устранено                  |
| Пациент<br>№ 15              | Потеря способности к ходьбе                                  | Восстановлено              |
|                              | Повышенное содержание белка и неоптерина в<br>СМЖ; Плеоцитоз | Устранено                  |
| Пациент<br>№ 18*             | Плеоцитоз; Повышенное содержание белка в<br>СМЖ              | Скорректировано            |
|                              | Аксиальная гипотония   | Скорректировано            |
| Пациент<br>№ 20 <sup>s</sup> | Повышенное содержание белка и неоптерина в<br>СМЖ; Плеоцитоз | Начальная коррекция        |
|                              | Парез 6-го нерва; клонус голенистопа                         | Начальная коррекция        |
| Пациент<br>№ 4 <sup>^</sup>  | Повышенное содержание белка в СМЖ;<br>Плеоцитоз              | Не поддается оценке        |
|                              | Аномальные инфильтраты при МРТ                               | Не поддается оценке        |

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

\* - лечение продолжается;

<sup>s</sup> - лечение начато после 2 недель;

<sup>^</sup> - контроль в момент ЕОТ не проводили.

Из 10 пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), у всех трансплантация прошла успешно; 1 пациенту потребовалась дополнительная пересадка CD34 стволовых клеток вследствие смешанного химеризма в D+145 после ТГСК. Вторичное отторжение трансплантата произошло у 1 пациента с последующей реактивацией ГЛГ. Этот пациент умер в D+68 после ТГСК вследствие острой респираторной недостаточности и бактериальных инфекций. Другой пациент умер в D+47 после ТГСК (септический шок в контексте тяжелой формы GvHD). Умеренная реакция GvHD имела место у других 3 пациентов и была устранена/устраняется.

Нейтрализующие сывороточные концентрации NI-0501 во время ТГСК были обнаружены у 8 из 10 пациентов, получающих трансплантаты, о чем свидетельствовали уровни CXCL9 (хемокина, индуцируе-

мого исключительно IFN $\gamma$ ) ниже предела количественной оценки. Таким образом, эти данные показывают, что NI-0501 позволяет избегать краткосрочной или долгосрочной токсичности, наблюдаемой при использовании схем лечения на основе этопозида. Это означает уменьшение риска осложнений, связанных с алло-ТГСК.

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

Пример 8. Безопасность, переносимость, фармакокинетика и эффективность краткосрочных внутривенных введений NI-0501, моноклонального антитела против интерферона-гамма (анти-IFN $\gamma$ ), у пациентов с системным ювенильным идиопатическим артритом (сЮИА), сопровождающимся синдромом активации макрофагов/вторичным ГЛГ (САМ/в-ГЛГ).

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

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

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

Критерии исключения являются следующими: (i) диагноз подозреваемого или подтвержденного первичного ГЛГ или ГЛГ вследствие неопластического заболевания; (ii) пациенты, получавшие лечение: анакинрой, тоцилизумабом, канакинумабом, ингибиторами TNF, ритуксимабом или любым другим биологическим лекарственным средством в пределах 5-кратного определенного для него периода полужизни; (iii) активные инфекции, вызванные микобактериями (типичные и нетипичные), *Histoplasma capsulatum*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* и *Leishmania*; (iv) признаки латентного туберкулеза; (v) положительные результаты серологического анализа на антитела к ВИЧ; (vi) наличие злокачественных новообразований; (vii) пациенты, имеющие другое сопутствующее заболевание или порок, серьезно влияющие на функции сердечно-сосудистой системы, легких, ЦНС, печени или почек, которые по мнению исследователя могут серьезно повлиять на вероятность ответа на лечение и/или оценку безопасности NI-0501;

(viii) история гиперчувствительности или аллергии на любой компонент, используемый при проведении исследования; (ix) отметка о вакцинации BCG вакциной в течение предшествующих 12 недель до скрининга; (x) отметка о вакцинации другими живыми или ослабленными живыми вакцинами в течение предшествующих 6 недель до скрининга и/или (xi) беременные или кормящие грудью пациенты женского пола.

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

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

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

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

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

Критерии эффективности в исследовании: в части 1 (пилотной) исследования проводится оценка следующих показателей для подтверждения режима дозирования в данной популяции пациентов: (i) соотношения польза/риск для NI-0501; (ii) ФК профиля NI-0501; (iii) уровней хемокинов, которые, как известно, индуцируются IFN $\gamma$  (например, CXCL9, CXCL10, CXCL11); (iv) изменения характерных признаков САМ: цитопении, дисфункции печени и коагулопатии через 2, 4, 6 и 8 недель после начала введения NI-0501 и (v) доз и продолжительности введения NI-0501. В части 2 (основной) исследования критерии эффективности препарата в исследовании являются следующими: (a): основной критерий эффективности: количество пациентов, достигших ремиссии САМ к неделе 8 после начала введения NI-0501; и (b) вторичные критерии эффективности: время до ремиссии САМ; время до первоначального ответа по оценке исследователя; количество пациентов, для которых в любой момент на протяжении исследования доза глюкокортикоидов могла быть постепенно снижена до той же (или меньшей) дозы, которую им вво-

дили до возникновения САМ; время до возможности снижения дозы глюкокортикоидов; выживаемость в конце исследования и количество пациентов, выведенных из исследования вследствие отсутствия эффективности. В части 2 (основной) исследования критерии безопасности являются следующими: (а) частота возникновения, тяжесть, причинная обусловленность и исход НЯ (серьезных и несерьезных), с особым вниманием, уделяемым инфекциям; изменение лабораторных показателей, в частности СВС (в первую очередь гемоглобина, нейтрофилов и тромбоцитов), результатов тестов на функцию печени (LFT) и показателей свертываемости крови; количество пациентов, выведенных из исследования по соображениям безопасности; а также уровни (в случае их наличия) циркулирующих антител против NI-0501 для определения иммуногенности (ADA).

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

Другие варианты осуществления.

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

#### Список последовательностей

```

<110> NOVIMMUNE SA
      de Min, Cristina
      Ferlin, Walter
      de Benedetti, Fabrizio

<120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У
ПАЦИЕНТОВ, ИМЕЮЩИХ ПОВЫШЕННЫЕ УРОВНИ CXCL9 И ДРУГИХ БИОМАРКЕРОВ

<130> NOVI-040001WO 322145-2619

<140> PCT/EP2016/060360
<141> 2016-05-09

<150> US 62/158,153
<151> 2015-05-07

<150> US 62/221,393
<151> 2015-09-21

<150> US 62/246,949
<151> 2015-10-27

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химически синтезировано

<400> 1
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химически синтезировано

<400> 2

```

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3  
<211> 14  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 3

Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
1 5 10

<210> 4  
<211> 13  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 4

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 5  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 5

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 6

Gln Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Trp Met  
1 5 10

<210> 7  
<211> 13  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 7

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Val Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 8  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 8

Glu Asp Asn Arg Arg Pro Ser  
1 5

<210> 9  
<211> 14  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 9

Asp His Ser Ser Gly Trp Tyr Val Ile Ser Gly Met Asp Val  
1 5 10

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 10

Gln Ser Asn Asp Ser Asp Asn Val Val  
 1 5

<210> 11  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 11

Asp Leu Thr Val Gly Gly Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 12

Asp Asp Asp Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 13  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 13

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Val Val  
 1 5

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 14

Asp Gly Trp Asn Ala Leu Gly Trp Leu Glu Ser  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 15

Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Gly Ser Tyr Tyr Val Gln  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 16

Asp Asp Lys Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 17  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 17

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 18

Thr Arg Ser Ser Gly Thr Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 19

Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Asn His Trp Val  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 20

Ser Asn Ala Met Ser  
 1 5

<210> 21  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 21

Thr Leu Thr Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
 1 5 10 15

Gly

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 22

Gly Thr Glu Leu Val Gly Gly Gly Leu Asp Asn  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 23

Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ala Thr Asn Tyr Val Gln  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 24

Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Asn His His Val Val  
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 25

Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 26

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Gln Glu Val Val  
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 27

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Phe Trp Val  
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 28

Arg Ser Phe Asp Ser Gly Gly Ser Phe Glu Tyr  
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 29

Glu Asp Asp Arg Arg Pro Ser  
1 5

<210> 30

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 30

Gln Ser Tyr Asp Asp Thr Thr Pro Trp Val  
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химически синтезировано

<400> 31

Val Gly Ser Trp Tyr Leu Glu Asp Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 32  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 32

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val His  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 33

Gln Ser Ser Asp Thr Thr Tyr His Gly Gly Val Val  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 34

Gly Gly Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 6  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 35

Gln Ser Tyr Glu Gly Phe  
 1 5

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 36

Thr Gly Arg Asn Gly Asn Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 37

Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 38  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 38

Gln Ser Ser Asp Ser Asn Arg Val Leu  
 1 5

<210> 39  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 39

Asp Phe Trp Val Ile Thr Ser Gly Asn Asp Tyr  
1 5 10

<210> 40  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 40

Gln Ser Phe Asp Ser Thr Asn Leu Val Val  
1 5 10

<210> 41  
<211> 13  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 41

Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 42  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 42

Gln Ser Tyr Ser Tyr Asn Asn Gln Val Val  
1 5 10

<210> 43  
<211> 1362  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 43

60 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
120 tcctgtgcag cctctggatt cacttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct  
180 ccagggaaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac  
240 gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
300 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatggt  
360 agcagtggct ggtacgtacc aactgggtc gacccctggg gccagggaac cctggtcacc  
420 gtctctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacccct ctccaagagc  
480 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg  
540 acgggtgtgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta  
600 cagtccctcag gactctact cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc  
660 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga  
720 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaaactc  
780 ctggggggac cgtcagttt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc  
840 cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc agacaagacc gcgggaggag

900  
 960 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg  
 1020 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa  
 1080 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc  
 1140 cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg ctctatccc  
 1200 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg  
 1260 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag  
 1320 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattaggc tctgcacaac  
 1362 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ag  
  
 <210> 44  
 <211> 453  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 44  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 45  
<211> 654  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 45  
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc

60

tcctgcactc gcagcagtg ggcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccaacagcgc

120

ccgggcagtt cccccaccac tgtcatctat gaggataacc agagaccctc tggggtcctc

180

gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaattctg cctccctcac catctctggg

240

ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgcagttctt atgatggcag caatcgttgg

300

atgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc

360

actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca agggcacact ggtgtgtctc

420

ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggagatag cagccccgtc

480

aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc

540

agctacctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc

600

acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc atag

654

<210> 46  
<211> 217  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 46

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly  
 85 90 95  
 Ser Asn Arg Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 180 185 190  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 195 200 205  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215  
 <210> 47  
 <211> 123  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 47  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 48  
 <211> 111  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано

&lt;400&gt; 48

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly  
 85 90 95

Ser Asn Arg Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 49

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccagggt  
 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac  
 180

gcaactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatggg  
 300

agcagtggtc ggtacgtacc aacttggttc gaccctggg gccggggcac cctggtcacc  
 360

gtctcgagt  
 369

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 50

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
 100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 51

<211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 51  
 aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
 60  
 tcctgcactc gcagcagtggt cagcattgtc agcaactatg tcgagtggta ccaacagcgc  
 120  
 ccgggcagtg cccccaccac tgtcatctat gaggataacc ggagaccctc tggggtcctc  
 180  
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaatactg cctccctcac catctctggg  
 240  
 ctggaggctg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcct atgatggcag caatcgttgg  
 300  
 atgttcggcg gagggaccaа gctgaccgtc ctagg  
 336  
  
 <210> 52  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 52  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Val Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Glu Asp Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly  
 85 90 95  
 Ser Asn Arg Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
  
 <210> 53  
 <211> 369  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 53  
 gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccа tgagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtг ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcat  
 300  
 agcagtggtc ggtacgtaat ctccggtagt gacgtctggg gccgagggac aatgggtcac  
 360  
 gtctcgagt  
 369  
  
 <210> 54  
 <211> 123  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано

&lt;400&gt; 54

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp His Ser Ser Gly Trp Tyr Val Ile Ser Gly Met Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 55

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
60

60

tcctgcaccc gcagcagtg ggcattgcc agcaactatg tcgagtggtc ccagcagcgc  
120

120

ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctct gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt  
180

180

gatcgggtct ctggctccgt cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catttctgga  
240

240

ctgaggactg aggacgaggc tgactattac tgtcagtcta atgattccga caatgtggtt  
300

300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt  
330

330

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 56

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile Ser Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Val Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Asp Ser  
85 90 95

Asp Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 57  
 60 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 120 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct  
 180 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtagtag cacatactac  
 240 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca atcccaagaa cagctgtat  
 300 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaggaccta  
 360 acagtgggtg gtccttggtg ctactttgac tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc  
 366 tcgagt  
 <210> 58  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 58  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Leu Thr Val Gly Gly Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 59  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 59  
 60 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
 120 tcctgcaccc gcagcagtg cagcattgtc agcaactatg tgcaaggta ccagcagcgc  
 180 cgggagcagtc cccccaccac tgtgatcttt gacgatgacc aaagaccctc tggggctcct  
 240 ggtcgggtct ctggctccct cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctggg  
 300 ctgcagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatatgag caatgtggta  
 360 ttcggcgggg ggaaccaaggc caccgtccta ggt  
 333  
 <210> 60  
 <211> 111  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано

&lt;400&gt; 60

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Val Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile Phe Asp Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Leu Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
85 90 95

Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
100 105 110

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 61

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcagc cctctggatt caccttttagc agctatgcc aagctgggt ccgccaggct

120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac

180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat

240

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatgga

300

tggaacgcgc tgggatggct tgaatcctgg ggccggggca ccctgggtcac cgtctcagat

360

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 62

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Trp Asn Ala Leu Gly Trp Leu Glu Ser Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; ДНК

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 63  
 aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaggac gataaccatc  
 60  
 tcctgcaccc gcaagtggagg cagcattggc agctactatg tgcagtggta ccagcagcgc  
 120  
 ccggggcactg cccccaccac tgtgatctat gacgataaaa aaagaccctc tgggggtccct  
 180  
 gatcgggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactat tgcagtctt atgatagcaa caatcttgtg  
 300  
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcacccgtc ctaggt  
 336  
 <210> 64  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 64  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Gly Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Thr Ala Pro Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Asp Asp Lys Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
 85 90 95  
 Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 <210> 65  
 <211> 369  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 65  
 gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatggt  
 300  
 agcagtggct ggtacgtacc acactgggtc gacccctggg gcagggggac aatggtcacc  
 360  
 gtctcgagt  
 369  
 <210> 66  
 <211> 123  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 66

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
 100 105 110  
 Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 67  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 67  
 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
 60  
 tcctgcaccc gcagcagtgcc caccattgcc agcaactatg tcgagtggta ccagcagcgc  
 120  
 ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtccct  
 180  
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctgaagactg aggcagggc tgactactac tgtcagctct atgataacag caatcattgg  
 300  
 gtgttcggcg gagggaacca ggtcacgctc ctaggt  
 336  
 <210> 68  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 68  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Thr Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asn  
 85 90 95  
 Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 <210> 69  
 <211> 360  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<223> химически синтезировано

<400> 69  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc caggggggtc cctgaaatc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agcaatgcc tgaattgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact ctactggta gtggtgttac cgcatactac  
 180  
 gcagactccg tggagggccg gttcagcatc tccagagaca attccaaga cactctgtat  
 240  
 ctgcaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagggcacg  
 300  
 gaactcgtgg gaggaggact tgacaactgg ggccaaggca ccttggtcac cgtctcgagt  
 360

<210> 70  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 70  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Leu Thr Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Gly Thr Glu Leu Val Gly Gly Gly Leu Asp Asn Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 71  
 <211> 339  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 71  
 aattttatgc tgactcagcc ccactctctg tcggagtctc cggggaagac ggtgacgac  
 60  
 tcctgcaccg gcagcggagg cagcattgcc accaactatg tgcagtggta tcagcagcc  
 120  
 ccgggcagtg cccccaccac tgtgattcat gaggataacc aaagaccctc tggggtcct  
 180  
 gatcggttct ctggctccat cgaaggctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctgcagcctg aggacgaggc tgattactac tgtcagtctt atgatatga caatcatcat  
 300  
 gtggatttcg gcggaggagc caagctgacc gtcctaggt  
 339

<210> 72  
 <211> 113  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 72  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ala Thr Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile His Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Gly Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
85 90 95

Asp Asn His His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

Gly

<210> 73  
<211> 360  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 73  
60 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
120 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct  
180 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac  
240 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat  
300 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatgga  
360 tggaacgcgc tgggatggct tgaatcctgg ggcaagggga caatgggtcac cgtctcgagt

<210> 74  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 74  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Trp Asn Ala Leu Gly Trp Leu Glu Ser Trp Gly Lys  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 75  
<211> 339  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 75  
 aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
 60  
 tcctgcaccg gcagcagtgg cagcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc  
 120  
 ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt  
 180  
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatagcag caatcaagag  
 300  
 gtggatttcg cgggagggac caagctgacc gtcctaggt  
 339  
 <210> 76  
 <211> 113  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 76  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
 85 90 95  
 Ser Asn Gln Glu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 Gly  
 <210> 77  
 <211> 369  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 77  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc aagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatggt  
 300  
 agcagtggtt ggtacgtacc acactgggtc gacccctggg gccagggaac cctggtcacc  
 360  
 gtctcgagt  
 369  
 <210> 78  
 <211> 123  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано

&lt;400&gt; 78

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Val Pro His Trp Phe Asp Pro  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 79

60 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac gggtaccatc  
120 tcctgcaccc gcagcagtgagg cagcattgtc agcaactatg tacagtggta ccagcagcgc  
180 ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt  
240 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
300 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcct atgatagcaa caatttttgg  
336 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 80

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Val Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
85 90 95

Asn Asn Phe Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; ДНК

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 81  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtagtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcctgtg attactgtgt gaaaaggctc  
 300  
 tttgatagtg gtgggtcctt tgagtactgg ggccaggggg caatgggtcac cgtctcagtg  
 360

<210> 82  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 82  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Lys Arg Ser Phe Asp Ser Gly Gly Ser Phe Glu Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 83  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 83  
 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtcaccatc  
 60  
 tcctgcaccc gcagcagtggt ctacattgcc agctcctatg tgcagtggta ccagcagcgc  
 120  
 cggggcagtt cccccaccac tgtaatcttt gaggatgacc ggagaccctc tggggtcctt  
 180  
 gatcgggtct ctggctccat cgacggctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctgaggactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcct atgatgacac cactccctgg  
 300  
 gtgttcggcg gagggaacca gctgaccgtc ctaggt  
 336

<210> 84  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 84

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Ser Ser  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile Phe Glu Asp Asp Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Gly Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp  
85 90 95

Thr Thr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 85  
<211> 360  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

60 <400> 85  
gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc  
120 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct  
180 ccagggaagg ggcaggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac  
240 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
300 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtcggc  
360 agctggtacc tggaagattt tgatatctgg ggccggggga caatgggtcac cgtctcagat

<210> 86  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 86  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Val Gly Ser Trp Tyr Leu Glu Asp Phe Asp Ile Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 87  
<211> 342  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 87  
 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtcctc cggggaagac gggtaccatc  
 60  
 tcctgcaccc gcagcagtggt cagcattgcc agcaactatg ttacttggtg tcagcagcgc  
 120  
 ccgggcagtt caccaccac tgtgatctat gaggataacc gaagaccctc tggggtcctt  
 180  
 gctcgggtct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 240  
 ctggagactg acgacgaggc tgactactac tgtcagtcct ctgataccac ctatcatgga  
 300  
 gggtggttat tcggcggagg gaccaagctg accgtcctag gt  
 342

<210> 88  
 <211> 114  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 88

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val  
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75 80

Leu Glu Thr Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Thr  
 85 90 95

Thr Tyr His Gly Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 100 105 110

Leu Gly

<210> 89  
 <211> 366  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

<400> 89  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctgagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaaggcggc  
 300  
 aactacggtg attacttcga ctactttgac tactggggca gagggacaat ggtcaccgtc  
 360  
 tcgagt  
 366

<210> 90  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано

&lt;400&gt; 90

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 91

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc

60

tcctgcaccc gcagcagtgagg cagcattgcc agcaattatg tgcatgggta ccagcagcgc

120

ccgggcagtg cccccacccat tgtgatctat gaagataacc aaagaccctc tggggtcctc

180

catcgggtct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga

240

ctgaagactg aggaagaggc tgactactac tgtcagtcct atgagggggt cggcggaggg

300

accaagctga ccgtcctagg t

321

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химически синтезировано

&lt;400&gt; 92

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val  
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Glu Gly  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 93  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcc aagctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtagtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaaggggccg gttcactatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatgga  
 300  
 tggaacgcgc tgggatggct tgaatcctgg ggccaggggg caatgggtcac ggtctcagat  
 360  
  
 <210> 94  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 94  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Trp Asn Ala Leu Gly Trp Leu Glu Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
  
 <210> 95  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 95  
 aattttatgc tgactcagcc ccacgctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtgaccatt  
 60  
 tcctgcaccg gcagaaatgg caacattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc  
 120  
 ccggacagtg cccccaccct tataatcttt gaagataccc aaagaccctc tggggtcctt  
 180  
 actcggctct caggctccat cgacacctcc tccaattctg cctccctcat catctcttca  
 240  
 ttgaggactg aggacgaggc tgattactac tgtcaatctt ctgattccaa cagggtgctg  
 300  
 ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggt  
 333  
  
 <210> 96  
 <211> 111  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
  
 <400> 96

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ala Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Asn Gly Asn Ile Ala Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Ser Ala Pro Thr Leu Ile  
 35 40 45  
 Ile Phe Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Thr Arg Leu Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Ile Ile Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Ser  
 85 90 95  
 Asn Arg Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 <210> 97  
 <211> 360  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 97  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tggctgggt ccgccaggct  
 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac  
 180  
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat  
 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatttt  
 300  
 tgggttatta cgagtgggaa tgactactgg gggcggggga ccacgggtcac cgctcagat  
 360  
 <210> 98  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> химически синтезировано  
 <400> 98  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Phe Trp Val Ile Thr Ser Gly Asn Asp Tyr Trp Gly Arg  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 99  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<223> ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАНО

<400> 99  
 60 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtgaccatc  
 120 tcctgcacccc gcagcagtg ggcatttgct agcaattatg tgcagtggta ccagcagcgc  
 180 ccgggcagtt cccccaccac tgtgatcttt gaagataacc gaagaccctc tggggtcctt  
 240 gatcggtttt ctggctccat cgacacctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
 300 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgcagtcctt ttgatagcac caatcttgtg  
 336 gtgttcggcg gagggacca gctgaccgtc ctaggt

<210> 100  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАНО

<400> 100

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Phe | Met | Leu | Thr | Gln | Pro | His | Ser | Val | Ser | Glu | Ser | Pro | Gly | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Val | Thr | Ile | Ser | Cys | Thr | Arg | Ser | Ser | Gly | Ser | Ile | Ala | Ser | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Val | Gln | Trp | Tyr | Gln | Gln | Arg | Pro | Gly | Ser | Ser | Pro | Thr | Thr | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Phe | Glu | Asp | Asn | Arg | Arg | Pro | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Ile | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn | Ser | Ala | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Gly |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |
| Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Ser | Phe | Asp | Ser |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Asn | Leu | Val | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |

<210> 101  
 <211> 360  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАНО

<400> 101  
 60 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc  
 120 tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct  
 180 ccagggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtgttgtag cacatactac  
 240 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat  
 300 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatgga  
 360 tggaacgcgc tgggatggct tgaatcctgg gggaaggagg ccacgggtcac cgtctcaggt

<210> 102  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАНО

<400> 102

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Trp Asn Ala Leu Gly Trp Leu Glu Ser Trp Gly Lys  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 103  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 103  
aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc  
60

tcctgcgccg gcagcagtg ggcagcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc  
120

cgggcagtg cccccaccgc tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctc  
180

gacgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga  
240

ctgaagactg aggcagaggc tgactactac tgtcaatctt actcttaca caatcaggtc  
300

gtgttcggcg gaggaccaca ggtaaccgta ctaggt  
336

<210> 104  
<211> 112  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 104

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ala Val  
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Tyr  
85 90 95

Asn Asn Gln Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 105  
<211> 13  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> химически синтезировано

<400> 105

Thr Arg Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Ser Ser Tyr Val Gln  
1 5 10

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), включающий введение пациенту-ребенку или взрослому пациенту-человеку, имеющим ГЛГ, посредством в/в инфузии в промежуток времени, составляющий один час, антитела в начальной дозе 1 мг/кг, где указанное антитело содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 1); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 4); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность EDNQRPS (SEQ ID NO: 5); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 6).

2. Способ по п.1, где антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

3. Способ по п.1 или 2, где антитело сформулировано в виде фармацевтической композиции в концентрации 5 мг/мл.

4. Способ по п.3, где фармацевтическая композиция содержит L-гистидин, L-гистидин моногидрохлорид, моногидрат, хлорид натрия (NaCl) и полисорбат 80, где значение pH фармацевтической композиции составляет от 5,8 до 6,2.

5. Способ по п.4, при этом значение pH составляет 6,0.

6. Способ по п.1, где пациент получает по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию после первоначальной в/в инфузии, где дополнительную инфузию вводят в промежуток времени, составляющий один час.

7. Способ по п.6, где указанную по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в дозе, которая выше, чем начальная доза 1 мг/кг.

8. Способ по п.6, где указанную по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют в дозе 3 мг/кг.

9. Способ по любому из пп.6-8, где указанную по меньшей мере одну дополнительную в/в инфузию выполняют по меньшей мере через три дня после первоначальной в/в инфузии.

10. Способ по п.1, где субъекту вводят серию в/в инфузий антитела, по две инфузии в неделю.

11. Способ по п.10, где указанную серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе более высокой, чем начальная доза.

12. Способ по п.11, где указанную серию в/в инфузий два раза в неделю выполняют в дозе по меньшей мере 3 мг/кг.

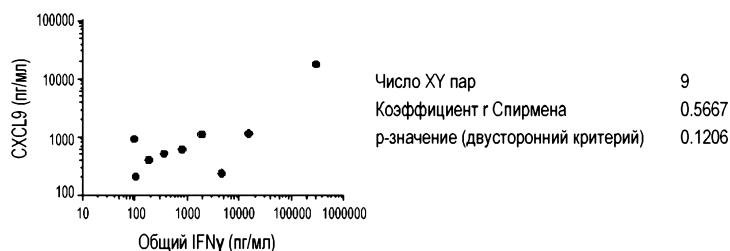
13. Способ по п.1, где пациенту вводили дексаметазон по меньшей мере за день до введения антитела.

14. Способ по п.13, где дексаметазон вводят в дозе не более 10 мг/м<sup>2</sup>.

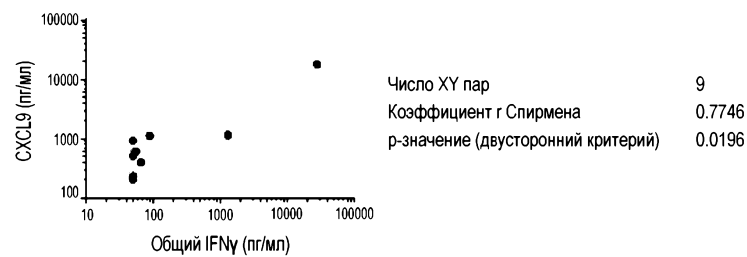
15. Способ по п.13, где дексаметазон вводят в дозе по меньшей мере 5 мг/м<sup>2</sup>.

16. Способ по п.1, дополнительно включающий введение по меньшей мере второго средства субъекту.

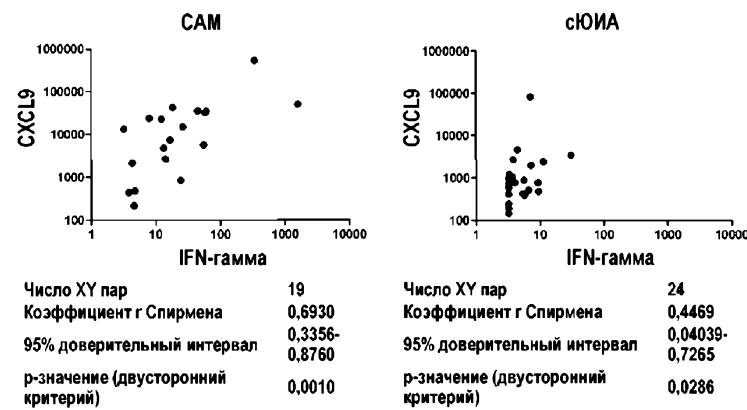
17. Способ по п.16, где второе средство представляет собой терапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство.



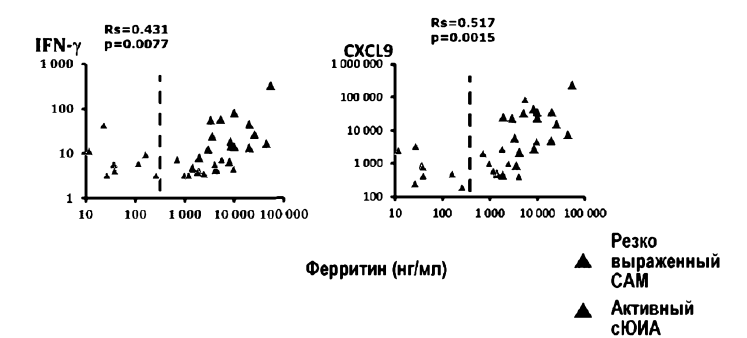
Фиг. 1



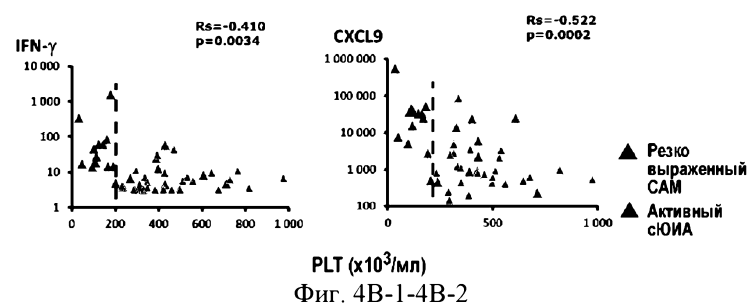
Фиг. 2



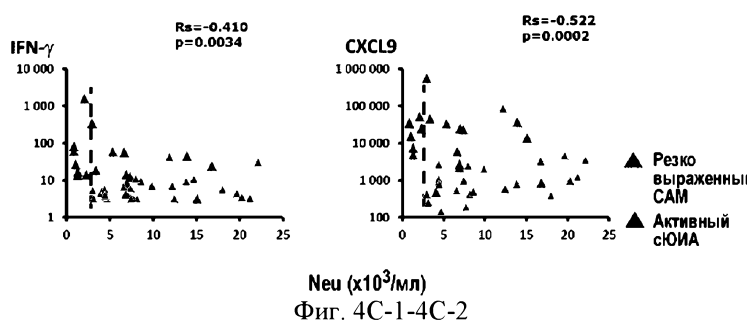
Фиг. 3А-3В



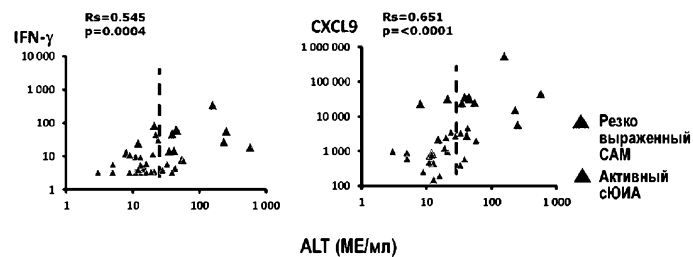
Фиг. 4А-1-4А-2



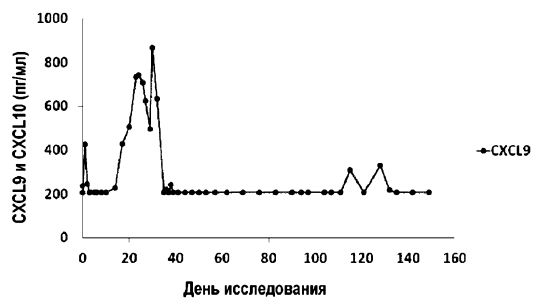
Фиг. 4В-1-4В-2



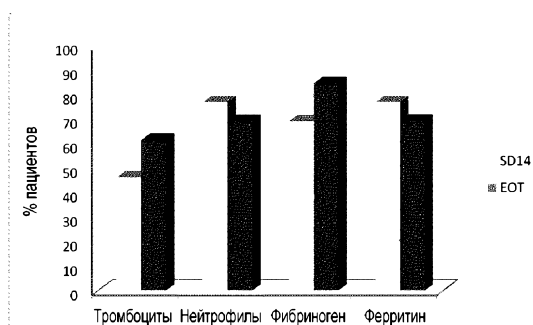
Фиг. 4С-1-4С-2



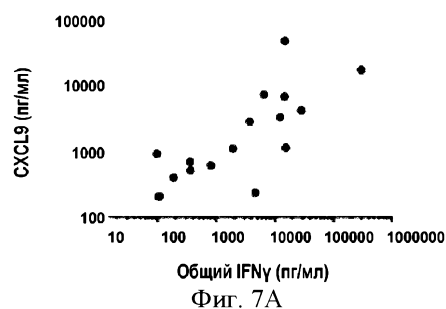
Фиг. 4D-1-4D-2



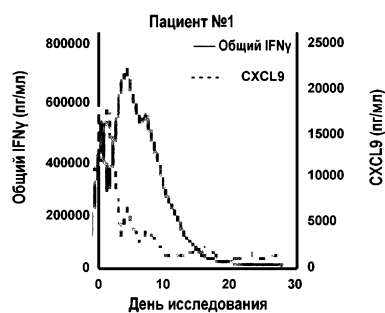
Фиг. 5



Фиг. 6

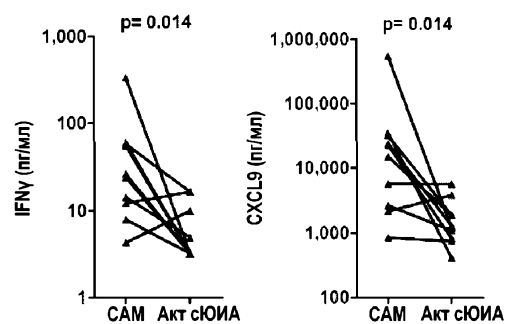


Фиг. 7A

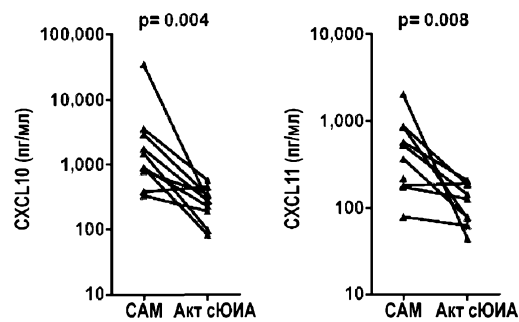


Число ХУ пар 17  
 Коэффициент г Спирмена 0,7885  
 95% ДИ 0,4839-0,9227  
 р-значение (двусторонний критерий) 0,0003

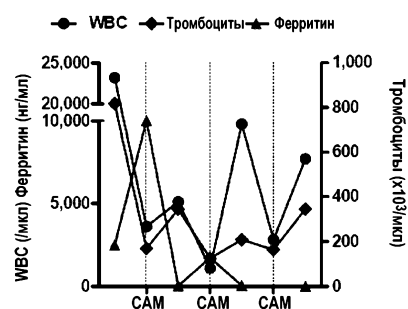
Фиг. 7B



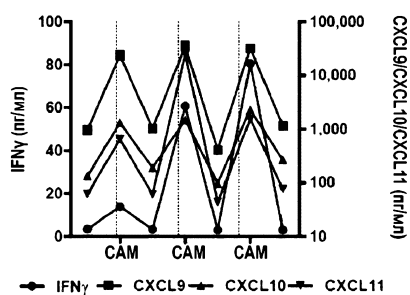
Фиг. 8А-8В



Фиг. 8С-8D

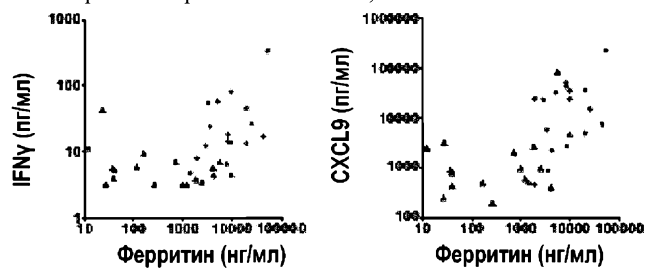


Фиг. 9А

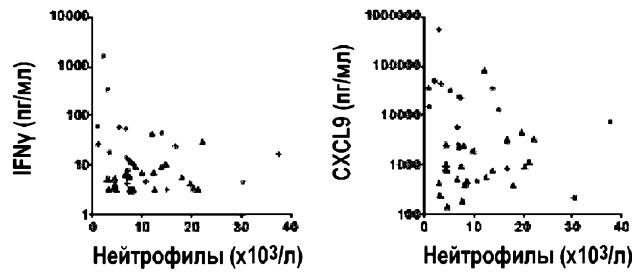


Фиг. 9В

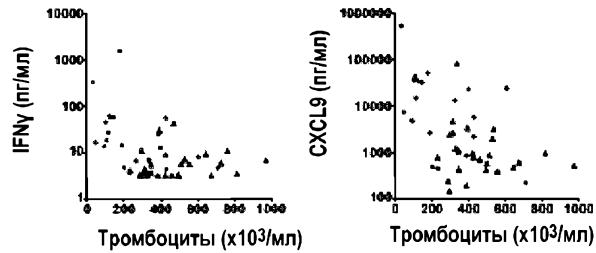
+ - резко выраженный САМ;  $\perp$  - активный сЮИА



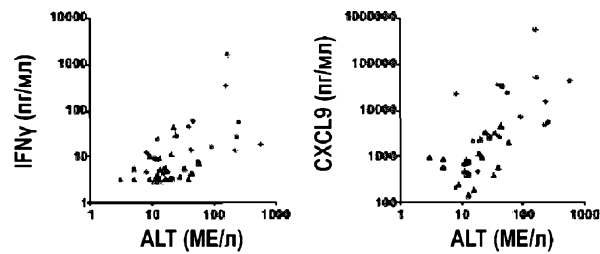
Фиг. 10А-10В



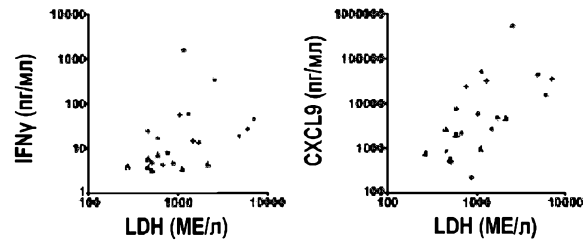
Фиг. 10С-10Е



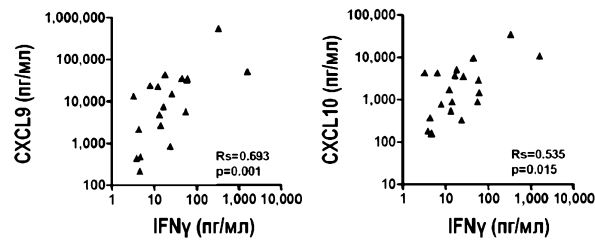
Фиг. 10Е-10F



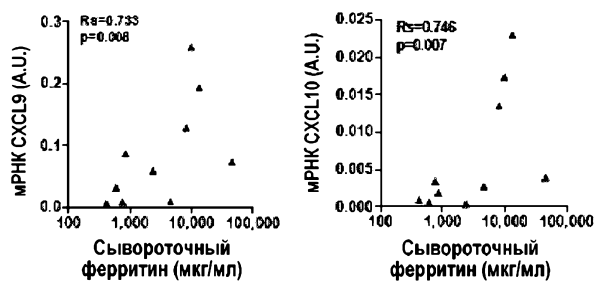
Фиг. 10G-10H



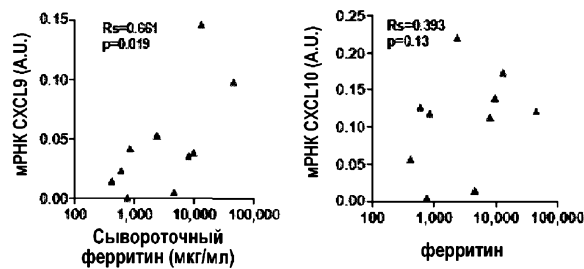
Фиг. 10I-10J



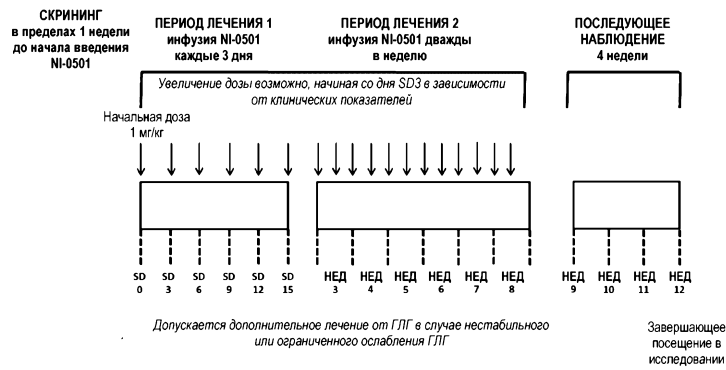
Фиг. 11А-11В



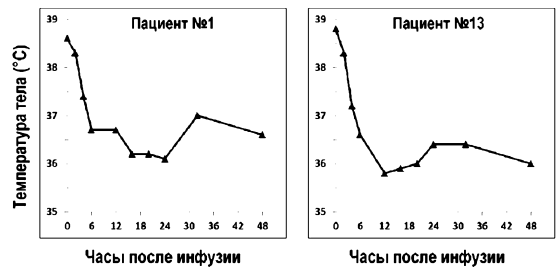
Фиг. 11С-11D



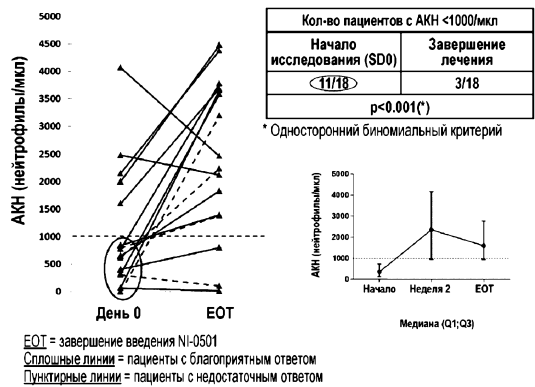
Фиг. 11E-11F



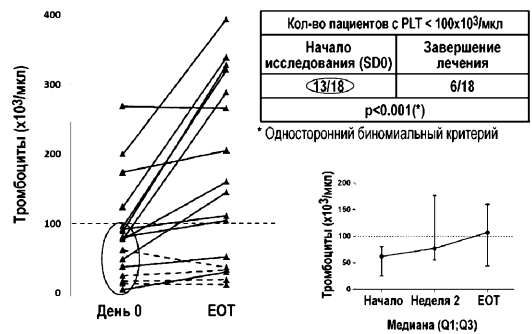
Фиг. 12



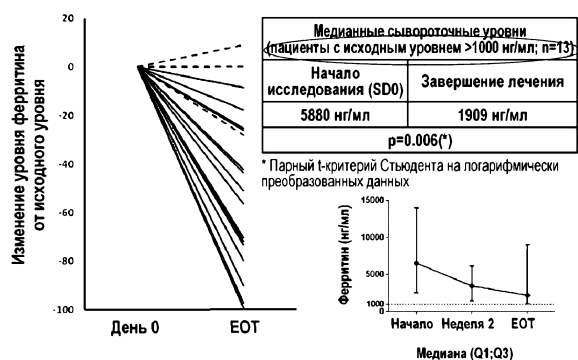
Фиг. 13A-13B



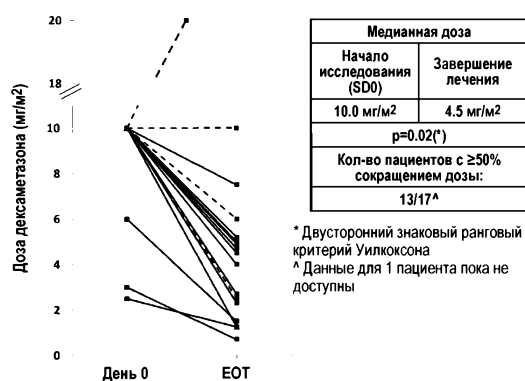
Фиг. 14



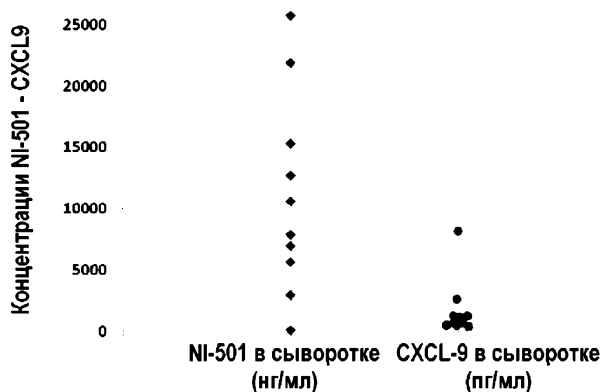
Фиг. 15



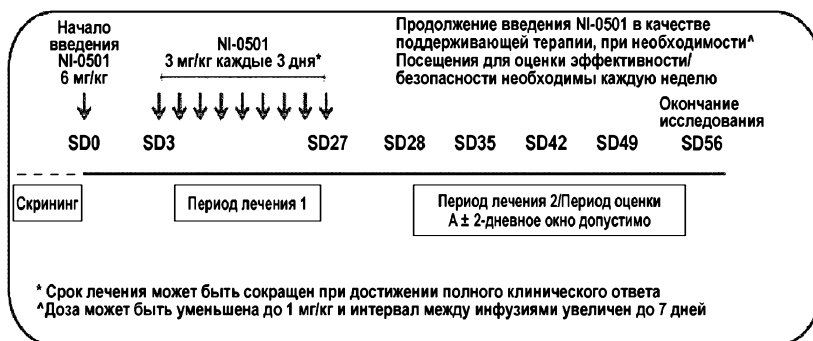
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2