

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043659**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.08**

**(51)** Int. Cl. **A61K 31/573** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202190927**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.10.03**

---

**(54) ИММУНОАБЛАТИВНЫЕ ВИДЫ ТЕРАПИИ**

---

**(31)** **18198491.5**

**(32)** **2018.10.03**

**(33)** **EP**

**(43)** **2021.08.02**

**(86)** **PCT/US2019/054395**

**(87)** **WO 2020/072713 2020.04.09**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АВМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Дейшер Тереза (US)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** US-A1-2018142015

LISA M.L. VAN WINSEN ET AL.: "Suppressive effect of glucocorticoids on TNF-[alpha] production is associated with their clinical effect in multiple sclerosis", MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL (MSJ), vol. 16, no. 4, 12 April 2010 (2010-04-12), pages 500-502, XP055567485, BASINGSTOKE, GB,: 1352-4585, DOI: 10.1177/1352458509359721, Patients and Methods.

LEUSSINK V.I. ET AL.: "High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes", ARCHIVES OF NEUROLOGY, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, CHICAGO, IL, US, vol. 58, no. 1, 31 December 2000 (2000-12-31), pages 91-97, XP009511803, ISSN: 0003-9942, DOI: 10.1001/ARCHNEUR.58.1.91, Methods  
WO-A2-03096970

XIAO-JUAN ZHU ET AL.: "High-Dose Dexamethasone Inhibits BAFF Expression in Patients with Immune Thrombocytopenia", JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 29, no. 5, 5 June 2009 (2009-06-05), pages 603-610, XP019731109, ISSN: 1573-2592, DOI: 10.1007/S10875-009-9303-Y, treatment regimes

---

**(57)** Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим глюкокортикоид, для применения в лечении заболеваний путем иммуноабляции. Композиции по настоящему изобретению могут быть предназначены для применения в лечении заболеваний, которые опосредуются иммунными клетками, такими как лимфоциты.

---

**B1**

**043659**

**043659**

**B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям для применения в лечении заболеваний путем иммуноабляции. В частности, композиции по настоящему изобретению могут быть предназначены для применения в лечении заболеваний, которые опосредуются иммунными клетками, такими как лимфоциты.

### Уровень техники

Авторы настоящего изобретения ранее обнаружили, что высокие концентрации глюкокортикоидов можно применять для кондиционирования пациентов с целью повышения эффективности клеточных видов иммунотерапии, таких как адаптивная Т-клеточная терапия; в контексте международной патентной заявки PCT/US2018/025517 (опубликованной в виде WO 2018/183927). В этой заявке авторы настоящего изобретения отметили различные виды токсичности, ассоциированные с химиотерапией и опосредованным облучением прекондиционированием, которое, как полагают, неселективно разрушает целлюлярность селезенки. Авторы настоящего изобретения предложили глюкокортикоиды (подкласс стероидов) и другие нетоксичные лимфодеплецирующие средства в острых дозах для лечения пациентов, больных раком, которые получают клеточные виды иммунотерапии.

В WO 2018/183927 отмечается, что глюкокортикоиды в высоких дозах могут вызывать абляцию лимфоидных тканей для уменьшения связывания клеточных иммунотерапевтических средств с лимфоидной тканью, в частности, с зародышевыми центрами и маргинальными зонами в лимфатических узлах, а также зародышевыми центрами и маргинальными зонами в селезенке. В WO 2018/183927 дополнительно отмечается, что глюкокортикоиды в высоких дозах также вызывают лимфодеплецию лимфоцитов периферической крови посредством биологического механизма (в отличие от цитотоксического механизма, лежащего в основе прекондиционирования химиотерапевтическими средствами или лучевой терапией).

Преыдушие исследования по применению стероидов для прекондиционирования пациента перед АСТ продемонстрировали, что этот подход является неэффективным. Hinrichs (J. Immunother. Ноябрь-декабрь 2005; 28(6):517-24.) оценил дексаметазон в качестве прекондиционирующего лечения перед АСТ. По сравнению с общим облучением тела (TBI) Hinrichs продемонстрировал, что доза 0,8 мг/кг HED, вводимая в -6-, -4- и -2-й дни, вызывала лимфодеплецию, эквивалентную 5 Gy TBI. Hinrichs продемонстрировал, что прекондиционирование системным внутрибрюшинным дексаметазоном в дозе 10 мг/кг (0,81 мг/кг HED) в -6-, -4- и -2-й дни до того, как АСТ вызывало эквивалентную лимфодеплецию по сравнению с облучением, однако это прекондиционирование не усиливало уничтожение опухоли в результате АСТ. В отличие от этого, Hinrichs раскрывает, что прекондиционирование облучением в действительности усиливало уничтожение опухоли в результате АСТ. В работе Hinrichs сообщается, что дексаметазон вызывал лимфодеплецию селезенки, о чем демонстрировало снижение целлюлярности селезенки на 99%. Однако, несмотря на то что Hinrichs сообщил о 99% лимфодеплеции, усиления уничтожения опухоли в результате АСТ не наблюдалось. Наоборот, Hinrichs наблюдал, что облучение в действительности усиливает уничтожение опухоли в результате АСТ. Однако эксперименты, целью которых было повторение описанной Hinrichs лимфодеплеции, демонстрируют, что дозы Hinrichs интраперитонеального дексаметазона, составляющие 10 мг/кг (0,81 мг/кг HED) в -6-, -4- и -2-й дни, вызывают неэффективную лимфодеплецию лимфоцитов периферической крови. При введении доз согласно Hinrichs, только В-лимфоциты в периферической крови были значительно лимфодеплецированы, от 10680 (контроль носителем) до 3733 живых событий, измеряемых с помощью проточной цитометрии CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> клеток, что соответствовало снижению на 65%. В отличие от этого, количество CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов снизилось с 3370 до 2441 живых событий, что соответствует лишь незначительному снижению на 33%. Количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов снизилось с 1779 до 902 живых событий, что соответствует лишь незначительному снижению на 50%. Количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов снизилось с 1318 до 1277 живых событий, что соответствует лишь незначительному снижению на 3%. Количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg-лимфоцитов снизилось с 198 до 70 живых событий, что соответствует лишь незначительному снижению на 65%. Количество естественных клеток-киллеров (NK) снизилось с 1153 до 958 живых событий, что соответствует лишь незначительному снижению на 17%.

Аутоиммунитет представляет собой явление, при котором иммунная система ошибочно атакует собственные составляющие субъекта. (У здоровых субъектов иммунная система избегает повреждающих аутоиммунных реакций в результате создания толерантности к собственным составляющим субъекта.) Заболевания, возникающие в результате повреждающих аутоиммунных реакций, называются аутоиммунными заболеваниями. Различные аутоиммунные заболевания поражают разные части организма; они могут быть деструктивными (например, в случае ревматоидного артрита, который поражает суставы), нейродегенеративными/нейродеструктивными (например, в случае рассеянного склероза) и в некоторых случаях, таких как сахарный диабет, ассоциированы со значительной смертностью (Thomas et al., 2010).

Патогенез аутоиммунных нарушений в значительной степени связан с определяющей ролью Т- и В-лимфоцитов, несоответствующим образом распознающих аутоантигены и иницирующих клеточно-опосредованную или гуморальную реакцию или и то, и другое, что приводит к воспалительному повреждению тканей и сосудов (Sullivan et al., 2010; Shlomchik et al., 2001).

Аутоиммунные заболевания очень часто лечат длительным приемом иммунодепрессантов, таких как

стероиды. Например, пациенты с пузырчаткой получали лечение дексаметазоном в дозе 100 мг путем в/в инфузии в течение 2 ч ежедневно в течение 3 дней (Pasricha et al., 2008). Эта доза не вызывала лимфоабляцию. Пациенты с пузырчаткой получали лечение, таким образом каждые 28 дней до излечения. Для их излечения требовалось от 3 до 12 месяцев. Частота рецидивов составляла 15%, и все пациенты вошли в ремиссию после другого лечения дексаметазоном. Эта доза дексаметазона составляет приблизительно 1-2 мг/кг. За счет контроля аутоиммунного заболевания и уменьшения его симптомов, такие режимы лечения не носят излечивающий характер, включают несколько долгосрочных побочных эффектов и повышенный риск инфекции (Patt et al., 2013).

Лимфодеплеционные виды терапии все чаще исследуются в отношении контроля иммунного повреждения. Одной из перспективных предпосылок такой терапии является то, что она может "перезагрузить" иммунную систему и восстановить иммунологическую толерантность (Lu et al., 2011). Однако толерантный потенциал лимфодеплеционных видов терапии остается спорным. Примером дискуссии являются противоречивые данные исследований антитимоцитарного глобулина (ATG), прототипа иммунодеплецирующих средств, в частности, в отношении того, индуцирует ли он CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регуляторные T (Treg)-клетки (Lu et al., 2011). Для понимания влияния ATG на T-клетки на клональном уровне *in vivo* Lu et al. изучили влияние антитела к мышиному тимоцитарному глобулину (mATG) в редукционистской модели, в которой репертуар T-лимфоцитов состоит из одного клона патогенных T-эффекторных (Teff) клеток, специфичных к физиологическому аутоантигену. Обработка mATG приводила к периферической индукции антигенспецифических Treg клеток из моноклонального в иных отношениях репертуара Teff, независимо от вовлечения тимуса. Индукция *de novo* Treg клеток происходила постоянно в локальных дренирующих лимфатических узлах, а стабильность индуцированных Treg клеток в крови коррелировала с долговременной защитой от аутоиммунного разрушения. Таким образом, Lu et al., 2011, предоставляет доказательства *in vivo* клональной конверсии патогенной аутоантигенспецифической Teff клетки в Treg клетку в условиях иммунодеплеционных видов терапии.

Сахарный диабет 1 типа (T1D) представляет собой аутоиммунное заболевание, которое постепенно приводит к деpleции инсулинсекретирующих  $\beta$ -клеток, что в конечном итоге приводит к клинически значимой гипергликемии и метаболической нестабильности (Atkinson et al., 2014). В целом T1D составляет примерно 5% сахарного диабета, которым страдают около 20 миллионов человек во всем мире (Menke et al., 2013). Приблизительно 1,25 миллиона американцев страдают T1D, и, по оценкам, в США ежегодно впервые диагноз будет поставлен 40000 человек (American Diabetes Association, *Diabetes Care* 37, 2014). T1D ассоциирован с ежегодным экономическим бременем в США в размере 14,4 миллиарда долларов с учетом медицинских расходов и косвенных затрат, таких как потерянный доход.

Инсулин в терапевтических целях и другие виды лечения, основанные на внешних гипогликемических средствах, не излечивают T1D, а просто предлагают решения для контроля уровня глюкозы в крови. Пациенты по-прежнему подвержены изменчивому уровню глюкозы в крови и развитию микрососудистых и макрососудистых диабетических осложнений (Peng et al., 2018).

Безопасные процедуры для удаления аутоиммунных субстратов у пациентов с сахарным диабетом отсутствуют. Аутоиммунитет при T1D включает многие стороны иммунного ответа (Snarski et al., 2016; Cantu-Rodriguez et al., 2016). Как следствие, антигенспецифические виды иммунотерапии, основанные на применении антител, слитых белков, цитокинов, регуляторных T-клеток и ингибиторов на основе малых молекул, приводят лишь к некоторым степеням сохранения  $\beta$ -клеток и снижения уровня глюкозы в крови у пациентов с T1D (Kim et al., 2013). Даже в комбинациях различные виды иммунотерапии, направленные на определенные компоненты репертуара аутоиммунитета, не могут гарантировать восстановление инсулиновой независимости (Bone et al., 2017).

Аутологическая трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) на данный момент является единственной доказанной стратегией излечения T1D (Votarelli et al., 2007). Аутологическая HSCT применялась в течение 12 лет в качестве варианта лечения аутоиммунных заболеваний (AD), таких как рассеянный склероз, системный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона и др. (Swart et al., 2017). Этот более интенсивный и широкий иммунологический подход заключается в "иммунологической перезагрузке", выполняемой с помощью иммуносупрессии высокими дозами, которая включает неспецифическое устранение аутореактивных T- и B-клеточных ответов с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток для восстановления толерантности иммунной системы. Примечательно, что в клинических испытаниях этот подход способствовал тому, что до 80% пациентов с T1D испытывали периоды инсулиновой независимости параллельно с соответствующим повышением уровней C-пептида во время теста толерантности к пище (Couri et al., 2018). Однако серьезные опасения препятствуют принятию иммунологической перезагрузки в качестве терапевтического подхода для лечения T1D.

Риски, ассоциированные с процедурой HSCT, превышают положительные эффекты, предлагаемые в отношении T1D: HSCT по-прежнему ассоциируется со значительной токсичностью и смертностью до 3% (Alexander et al., 2018; Pallerla et al., 2004; Henig et al., 2014). Более того, текущие протоколы иммунологической перезагрузки основаны на цитотоксических иммуносупрессорных режимах (например, химиотера-

пии, лучевой терапии), которые подвергают пациентов ряду проблем безопасности, включая краткосрочные риски инфекции, острую органную дисфункцию и смерть, а также долгосрочные риски злокачественных новообразований и вторичных аутоиммунных заболеваний (Daikeler et al., 2012).

Почти все пациенты с T1D, получавшие лечение в виде HSCT, возобновили применение экзогенного инсулина с последующим снижением уровней С-пептида (Magdalena et al., 2018) в результате неполной абляции аутоиммунных патофизиологических субстратов после прекондиционирования (PC) (Loh et al., 2007). Увеличение интенсивности режимов кондиционирования трансплантата или повторение процедуры для улучшения результатов лечения подвергнет пациентов чрезмерным рискам и токсичности (Couri et al., 2018).

HSCT ассоциирована с высокими затратами, которые находятся в диапазоне от примерно 80000 до 300000 долларов США, в зависимости от режимов кондиционирования, проводимых перед HSCT, типа трансплантации и затрат на стационарное лечение, ассоциированных с госпитализацией (Broder et al., 2017).

Существует потребность в дальнейших видах лечения аутоиммунных нарушений и других заболеваний, которые опосредованы лимфоцитами. Дополнительные виды лечения, которые являются более простыми и менее дорогостоящими, чем HSCT, были бы предпочтительными.

#### **Краткое описание сути изобретения**

Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что высокие дозы глюкокортикоидов могут вызывать лимфопению лимфоцитов периферической крови без существенного влияния на количество других клеток. Дальнейшие действия, такие как абляция зародышевых центров, также лежат в основе некоторых аспектов настоящего изобретения. В настоящем изобретении предложено медицинское применение этих действий агонистов глюкокортикоидов в высоких дозах для применения в лечении лимфоцит-опосредованных заболеваний.

Соответственно, в первом аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая глюкокортикоид, для применения в лечении лимфоцит-опосредованного заболевания у субъекта, при этом лечение включает введение дозы фармацевтической композиции пациенту для доставки глюкокортикоида в дозе, эквивалентной приблизительно 3-26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED). Доза глюкокортикоида может обозначаться "острая высокая доза". В некоторых вариантах осуществления доза фармацевтической композиции для доставки пациенту глюкокортикоида представляет собой дозу, эквивалентную приблизительно 10-26 или приблизительно 12-26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED). Фармацевтическая композиция может содержать (или может не содержать) фармацевтически приемлемый носитель, как определено в настоящем документе. Фармацевтическая композиция может содержать (или может не содержать) фармацевтически приемлемый консервант, как определено в настоящем документе. Фармацевтическая композиция может содержать (или может не содержать) фармацевтически приемлемое хелатирующее средство, как определено в настоящем документе. Однако во всех вариантах осуществления этого аспекта фармацевтической композиции действительно содержит один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из: фармацевтически приемлемого носителя, консерванта и/или хелатирующего средства. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может также содержать вспомогательные вещества. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более одного фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более одного фармацевтически приемлемого консерванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более одного фармацевтически приемлемого хелатирующего средства. Варианты осуществления настоящего изобретения могут быть определены как действия, направленные для достижения системной лимфопении у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, например аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, латерального амиотрофического склероза, склеродермии, пузырчатки и волчанки. Лимфопеническое действие по настоящему изобретению лежит в основе эффективности этих вариантов осуществления.

Несмотря на то, что глюкокортикоиды хорошо зарекомендовали себя при многих аутоиммунных состояниях (Flammer et al., 2011), они никогда не рассматривались для иммунологической перезагрузки. Кроме того, исследования, основанные на применении низких доз фармацевтических препаратов для прекондиционирования пациентов перед трансплантацией аутоиммунных клеток, продемонстрировали, что этот подход является неэффективным (Medicines Agency; 2017). Комплексный механизм действия, основанный на множественных эффектах *in vivo* фармацевтической композиции по настоящему изобретению, обеспечивает первую эффективную замену химиотерапии, которую можно применять в качестве безопасного режима иммунологической перезагрузки для лечения аутоиммунных состояний, таких как сахарный диабет.

С настоящим изобретением ассоциированы несколько преимуществ, связанных с действием фармацевтической композиции, включая:

- (i) отличную от миелоаблативной иммунологическую перезагрузку: фармацевтическая композиция

может вызывать деплецию всех типов лимфоцитов периферической крови, например включая островковые аутореактивные Т-клетки, ответственные за аутоиммунитет к сахарному диабету, но способствует сохранению нейтрофилов, тромбоцитов, эритроцитов и стволовых клеток (как HSC, так и MSC) в зависимости от специфического рецептор-опосредованного способа действия. Таким образом, настоящее изобретение снижает риски инфицирования и устраняет необходимость в HSCT для восстановления клеток крови после иммунологической перезагрузки. Результатом является отличный от миелоаблативного режим, который может осуществлять безопасную иммунологическую перезагрузку с эффективностью, сопоставимой с химиотерапией;

(ii) уменьшение зародышевых центров (GC) и маргинальных зон во вторичных лимфатических сосудах. Фармацевтическая композиция временно вызывает абляцию зародышевых центров во вторичных лимфоидных органах, которые дают начало высокоаффинным антителам и долгоживущим плазматическим клеткам (DeFranco et al., 2016) для повышения эффективности по сравнению с аутоиммунными патофизиологическими субстратами;

(iii) простые способы введения. Фармацевтическая композиция может быть составлена для перорального или внутривенного введения, что делает ее эффективной в течение нескольких часов с восстановлением лимфоцитов и GC в течение 7-14 дней. Впервые полная лимфодеплеция не потребует госпитализации;

(iv) снижение шансов рецидива. В отличие от химиотерапии или облучения, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно безопасно вводить в полностью лимфоабляционных дозах для удаления Т- и В-клеток памяти, ответственных за рецидив;

v) допустимо повторное введение. В случае рецидива аутоиммунных патофизиологических субстратов профиль безопасности высоких доз глюкокортикоидов позволит повторное введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

Эти действия и преимущества, связанные с настоящим изобретением, раскрываемым в настоящем документе, означают, что специалист в данной области техники поймет, что в настоящем изобретении предложена эффективная стратегия лечения аутоиммунных заболеваний, а также других лимфоцит-опосредованных заболеваний, обсуждаемых в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой связанные с HIV остаточные явления заболевания. В этих вариантах осуществления в контексте настоящего документа уменьшенное количество зародышевых центров в лимфоидных органах субъекта может заставить передвигаться остаточные HIV-инфицированные Т-клетки, которые связываются с нишами в этих центрах, в кровотоке, где они могут быть устранены иммунной системой или стандартными видами терапии. В контексте настоящего раскрытия специалисту в данной области техники будет понятно, что HIV представляет собой лимфоцит-опосредованное заболевание в том смысле, что вирус инфицирует Т-лимфоциты. Лимфодеплеционное действие по настоящему изобретению также способствует эффективности этих вариантов осуществления.

В других вариантах осуществления лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой лимфому, например лимфому зародышевого центра (лимфому GC) или лимфому маргинальной зоны. В этих вариантах осуществления в контексте настоящего документа уменьшенное количество зародышевых центров в лимфоидных органах субъекта может заставить передвигаться раковые клетки (например, лимфомы зародышевых центров), которые связываются с нишами в этих центрах, в кровотоке, где они могут быть устранены иммунной системой или стандартными видами терапии. Специалисту в данной области техники будет известно, что стандартные виды терапии рака включают, например химиотерапию. Таким образом, терапия на основе глюкокортикоидов в контексте настоящего документа может применяться в комбинации с химиотерапией, предпочтительно в комбинации с цитотоксической химиотерапией пониженной интенсивности (где эффективная доза химиотерапии меньше, при применении в комбинации с терапией на основе высоких доз глюкокортикоидов в контексте настоящего документа, чем эффективная доза той же химиотерапии без высоких доз глюкокортикоидов, в контексте настоящего документа). Лимфодеплеционное действие по настоящему изобретению также способствует эффективности этих вариантов осуществления. В конкретных вариантах осуществления конкретно предусмотрено лечение лимфомы Беркитта (BL). В Африке лечение BL основано на комбинации трех химиотерапевтических лекарственных средств: циклофосфамида, винкристина и метотрексата (системно и интратекально). Эта комбинация повторяется с 2-недельными интервалами, в целом составляет шесть циклов в течение 12 недель (Burkitt's Lymphoma National Treatment Guidelines. 2009). Дексаметазон в низких дозах в настоящее время находится в Перечне основных лекарственных средств ВОЗ, однако существующие препараты дексаметазона, внесенные в список ВОЗ, не подходят для лечения BL, поскольку более высокая доза по настоящему изобретению потребует смешивания флаконов, что может привести к заражению и серьезным или смертельным инфекциям у пациентов, а также к тому, что вспомогательные вещества, такие как бензиловый спирт или парабены, достигнут токсического уровня при смешивании.

В других вариантах осуществления лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (GvHD). GvHD представляет собой медицинское осложнение после получения трансплантированной ткани от генетически отличающегося человека. GvHD может возникать

даже при аутологической трансплантации, что, скорее всего, вызвано обработкой и хранением аутологических клеток, так что трансплантированные клетки затем распознают организм как чужеродный. При GvHD лейкоциты иммунной системы донора, которые остаются в донорской ткани (трансплантате), распознают реципиента (хозяина) как чужеродного (не своего). Лейкоциты, присутствующие в трансплантированной ткани, затем атакуют клетки организма реципиента, что приводит к этому состоянию. GvHD обычно ассоциируется с трансплантатами стволовых клеток, например, которые образуются при трансплантатах костного мозга. GvHD также применяется к другим формам трансплантированных тканей, таким как трансплантаты солидных органов. Лимфодеплеционное действие по настоящему изобретению также способствует эффективности этих вариантов осуществления.

В других вариантах осуществления лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аллергическое нарушение. Оно включает в себя хронические и острые аллергии. Например, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять для лечения астмы. Лимфодеплеционное действие по настоящему изобретению также способствует эффективности этих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит консервант и/или хелатирующее средство. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит консервант. Предпочтительно консервант представляет собой сульфит. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит хелатирующее средство, которое может представлять собой ЭДТА.

В предпочтительных вариантах осуществления глюкокортикоид фармацевтической композиции представляет собой дексаметазон. Он может находиться в форме основания дексаметазона, дексаметазона фосфата натрия или дексаметазона ацетата. Наиболее предпочтительно глюкокортикоид представляет собой дексаметазона фосфат натрия.

Как отмечено выше и как определено формулой настоящего изобретения, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначена для применения в лечении лимфоцит-опосредованного заболевания. Лечение может включать введение дозы фармацевтической композиции в виде однократной острой дозы. В качестве альтернативы лечение включает введение дозы фармацевтической композиции в виде суммарной дозы в течение приблизительно 72 ч.

Лечение лимфоцит-опосредованных заболеваний включает введение композиций пациентам, нуждающимся в противовоспалительном, иммуносупрессорном лечении, лимфоабляции, удалении зародышевых центров, повышении уровня IL-2, IL-7, IL-12 и/или IL-15, повышении количества мезенхимальных стволовых клеток, повышении уровня G-CSF или повышении количества нейтрофилов. Более того, лечение лимфоцит-опосредованного заболевания может приводить к обнаруживаемым изменениям экспрессии PD-1, PD-L1 или CTLA-4.

Как отмечено выше и как определено формулой настоящего изобретения, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначена для применения в лечении лимфоцит-опосредованного заболевания, при этом лечение включает введение дозы фармацевтической композиции пациенту. Фармацевтическую композицию можно вводить внутривенно (в/в) или перорально. При внутривенном введении дозу предпочтительно вводить в виде однократной в/в инфузии в течение 0,25-2 ч. Инфузионная композиция может находиться в физиологическом или полуфизиологическом растворе, или лактатном растворе Рингера, или 5% растворе декстрозы, или другом стандартном жидком растворе для в/в введения. В случае перорального введения композицию можно вводить в виде однократной пероральной дозы, смешанной с небольшим количеством сока или подсластителя.

В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция представлена в виде водного раствора глюкокортикоидов. Специалисту в данной области техники будет понятно, что это означает, что вода используется в качестве растворителя в фармацевтических композициях этих вариантов осуществления.

Фармацевтическую композицию для применения в соответствии с настоящим изобретением вводят для доставки глюкокортикоида в дозе, эквивалентной по меньшей мере приблизительно 3 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 4 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 6 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 7 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 8 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 9 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 11 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 12 мг/кг или по меньшей мере приблизительно 13 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 14 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 15 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 16 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 17 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 18 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 19 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 20 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 21 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 22 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 23 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 24 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 25 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED).

Доза фармацевтической композиции может быть определена как доставка глюкокортикоида в дозе, эквивалентной значению, взятому из диапазона доз, эквивалентных HED основания дексаметазона, при этом диапазон определяется конечными точками, выбранными из приведенного выше перечня значений, например приблизительно 10-26 мг/кг или приблизительно 15-25 мг/кг (или любые два значения из приведенного выше перечня). В предпочтительных вариантах осуществления субъект представляет собой человека, глюкокортикоид содержит основание дексаметазона и фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в дозе от приблизительно 3,0 до приблизительно 18,0 мг/кг основания дексаметазона.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что для измерения лимфодеплекции, достигаемой с помощью настоящего изобретения, можно применять обычную методологию. Например, популяции CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Treg и/или В-клеток можно измерять после введения фармацевтической композиции, например, через 48 ч после ее введения. Проточная цитометрия представляет собой один иллюстративный способ, который можно применять для подсчета клеток.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение можно применять в сочетании с другими терапевтическими подходами в контексте настоящего документа, например химиотерапией и/или клеточными видами терапии. В этих вариантах осуществления субъекту может быть назначена химиотерапия. В этих вариантах осуществления субъекту может быть назначена клеточная терапия. Однако большинство вариантов осуществления настоящего изобретения не включают химиотерапию или клеточные виды терапии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления субъекту не назначают химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту не назначают клеточные виды терапии.

Механизм действия настоящего изобретения подробно обсуждается в настоящем документе, и в некоторых случаях эти механизмы могут составлять часть отличительных характеристик настоящего изобретения, особенно когда механизм раскрывает новую клиническую ситуацию (например, позволяя выбирать подгруппы пациентов в качестве субъектов).

#### **Краткое описание графических материалов**

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

Фиг. 1. Дексаметазон в острых высоких дозах устраняет связывающие ниши в селезенке мыши и вторичных лимфатических узлах. Представлены черно-белые изображения в светлом поле (вверху) и иммунофлуоресцентные изображения (внизу) свежих толстых срезов селезенки, окрашенных FITC-PNA для количественного определения зародышевых центров мышей, которым вводили в/б эквивалентную дозу основания дексаметазона для человека (HED) 9,3 мг/кг за 96 ч до извлечения селезенки. На графике изображены столбиковые диаграммы среднего количества зародышевых клеток на площадь селезенки плюс стандартная площадь среднего (SEM) для мышей, которым вводили в/б контроль плацебо и 9,3 мг/кг HED основания дексаметазона в/б за 96 ч до извлечения селезенки. Контрольные мыши имеют значимую иммунофлуоресценцию FITC-PNA, в то время как мыши, которым вводили дексаметазон, почти не имеют иммунофлуоресцентного сигнала.

Фиг. 2. Дексаметазон в острых высоких дозах дозозависимым образом устраняет связывающие ниши в селезенке мыши. На графике изображены столбиковые диаграммы средней интенсивности окрашивания зародышевых центров, измеряемой с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания свежих толстых срезов селезенки, окрашенных FITC-PNA. Интенсивность иммунофлуоресценции рассчитывали с использованием порогового значения и анализа изображений MetaMorph. На столбцах представлены средние значения плюс SEM. Мышам вводили плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED или 12 мг/кг HED основания дексаметазона за 48 ч до извлечения селезенки. Уменьшение зародышевых центров заметно при 6 мг/кг HED и значительно снижается в дозах 9 и 12 мг/кг HED.

Фиг. 3. Дексаметазон в острых высоких дозах устраняет связывающие ниши в селезенке крысы (MZ: маргинальная зона). На столбиковых диаграммах изображена ширина маргинальной зоны, измеряемой на 5-микронных срезах селезенки крыс, обработанных в/в или п/о плацебо, 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED) или 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED) основания дексаметазона за 48 ч до извлечения селезенки. Площадь маргинальной зоны уменьшалась при всех дозах дексаметазона и ее максимально ингибировали при 12,9 мг/кг HED. n=5 на группу. \*p<0,05, ANOVA (апостериорный анализ Даннета) по сравнению с в/в носителем; †p<0,05, ANOVA (апостериорный анализ Даннета) по сравнению с п/о носителем; ‡p<0,05, t-критерий Стьюдента по сравнению с в/в носителем.

Фиг. 4. Дексаметазон в острых высоких дозах устраняет связывающие ниши в селезенке крысы. Изображены столбиковые диаграммы площади на селезенку при окрашивании BCL-6 5-микронных фиксированных срезов селезенки в качестве показателя количества зародышевых центров, представленных как среднее значение на срез. Крыс обрабатывали в/в или п/о плацебо, 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED) или 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED) основания дексаметазона за 48 ч до извлечения селезенки. Площадь зародышевых центров уменьшалась при всех дозах дексаметазона, и ее максимально ингибировали при 12,9 мг/кг HED.

Группы 1-4 в/в: 1 = 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 2 = 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED), 3 = 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED), 4 = плацебо.

Группы 5-9 п/о: 5 = 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 6 = 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED), 7 = 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED), 8 = плацебо.

Фиг. 5. Дексаметазон в острых высоких дозах снижает массу тимуса. На фотографиях изображен размер тимуса субъектов-мышей, обработанных плацебо (верхняя фотография), и тимуса субъектов-мышей, обработанных дозой 6 мг/кг HED фармацевтической композиции по настоящему изобретению (нижняя фотография). На нижней панели изображен процент массы тимуса к массе тела субъектов, обработанных плацебо (контроль), и субъектов, обработанных фармацевтической композицией по настоящему изобретению в дозе 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED и 12 мг/кг HED.

Фиг. 6. Дексаметазон в острых высоких дозах снижает количество лимфоцитов у крысы. Представлены графики абсолютных количеств лимфоцитов у индивидуумов и средних значений лимфоцитов, измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как крыс обрабатывали в/в (справа) или п/о (слева) плацебо, 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED) или 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED) основания дексаметазона. Дексаметазон вводили за 48 ч до забора крови. Значимую лимфодеплецию наблюдали при всех дозах по сравнению с контролем у крыс, независимо от того, было ли введение в/в (справа) или п/о (слева). Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека).

Фиг. 7. Дексаметазон в острых высоких дозах не снижает количество нейтрофилов у крысы. Представлены графики абсолютных количеств нейтрофилов у индивидуумов и средних значений нейтрофилов, измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как крыс обрабатывали в/в (справа) или п/о (слева) плацебо, 20 мг/кг (3,23 мг/кг HED), 40 мг/кг (6,45 мг/кг HED) или 80 мг/кг (12,9 мг/кг HED) основания дексаметазона.

Данные на фиг. 3, 4 и 6 получены от одних и тех же крыс. Дексаметазон в острых высоких дозах имеет профиль лимфодеплеции, который способствует сохранению нейтрофилов. П/о (слева) и в/в (справа) дозы вводили за 1×48 ч до забора крови. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека).

Фиг. 8. CD3 и CD4 положительные лимфоциты. Представлены графики количества CD3<sup>+</sup> (слева) и CD4<sup>+</sup> (справа) лимфоцитов у индивидуумов и средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованные к относительным абсолютным количествам с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышей обрабатывали перорально плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED или 12 мг/кг HED основания дексаметазона. Относительное количество/мкл = проточная цитометрия и общий анализ крови совместно. По сравнению с контролем в группе 12 мг/кг: 65% снижение количества CD3<sup>+</sup> клеток; 75% снижение количества CD4<sup>+</sup> клеток. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека). Односторонний ANOVA с последующим использованием критерия Тьюки включали для определения статистической значимости между группами обработки; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Фиг. 9. Дексаметазон в острых высоких дозах снижает количество CD8 положительных лимфоцитов и Treg клеток у мыши. Представлены графики количества CD8<sup>+</sup> (слева) и Treg (справа) лимфоцитов у индивидуумов и средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованные к относительным абсолютным количествам с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышей обрабатывали перорально плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED или 12 мг/кг HED основания дексаметазона. Treg лимфоциты идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>D25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Относительное количество/мкл = проточная цитометрия и общий анализ крови совместно. По сравнению с контролем в группе 12 мг/кг: 56% снижение количества CD8<sup>+</sup> клеток; 78% снижение количества Treg у мыши. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека). Односторонний ANOVA с последующим использованием апостериорного критерия Тьюки включали для определения статистической значимости между группами обработки; \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Фиг. 10. Дексаметазон в острых высоких дозах снижает количество NK-клеток и В-лимфоцитов у мыши. Представлены графики количества естественных клеток-киллеров (NK) (слева) и В-лимфоцитов (справа) у индивидуумов и средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованные к относительным абсолютным количествам с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышей обрабатывали перорально плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED или 12 мг/кг HED основания дексаметазона. NK-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>. В-лимфоциты идентифицировали как CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>. Относительное количество/мкл = проточная цитометрия и общий анализ крови совместно. По сравнению с контролем в группе 12 мг/кг: 87% снижение количества NK-клеток; 83% снижение количества В-клеток. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека). Односторонний ANOVA с последующим использованием апостериорного критерия Тьюки включали для определения статистической значимости между группами обработки; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Фиг. 11. Дексаметазон в острых высоких дозах снижает абсолютное количество лимфоцитов у мыши, способствуя сохранению нейтрофилов. Представлены графики абсолютных количеств нейтрофилов (слева) и общего количества лимфоцитов (справа) у индивидуумов, а также средних значений, измеряемых с помощью общего анализа крови через 24-48 ч после того, как мышей обрабатывали п/о плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED, 12 мг/кг HED или 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона. Клетки/мкл =

абсолютные количества, полученные на основе общего анализа крови (СВС). Дексаметазон в острых высоких дозах вызывает почти полную лимфоапатию в дозах более 12 мг/кг HED, но не влияет на нейтрофилы. Таким образом, дексаметазон в острых высоких дозах устраняет необходимость переливания крови и является более безопасной и нетоксичной альтернативой химиотерапевтическим схемам. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека).

Фиг. 12. Дексаметазон в острых высоких дозах способствует сохранению эритроцитов и тромбоцитов у мыши. Представлены графики абсолютных количеств эритроцитов у индивидуумов (слева) и средних значений, измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышью обрабатывали п/о плацебо, 3 мг/кг HED, 6 мг/кг HED, 9 мг/кг HED, 12 мг/кг HED или 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона. Клетки/мкл = абсолютные количества, полученные на основе СВС. Таким образом, дексаметазон в острых высоких дозах не влияет на эритроциты или тромбоциты, устраняет необходимость переливания крови и, таким образом, является более безопасной и нетоксичной альтернативой химиотерапевтическим схемам. Дозы представлены в виде HED (эквивалентная доза для человека).

Фиг. 13. Изображено количество живых гемопоэтических стволовых клеток, измеряемых через 48 ч после обработки наивных мышей плацебо (носитель) или низкими или высокими дозами дексаметазона в острых высоких дозах. Даже высокие дозы дексаметазона в острых высоких дозах не влияли значительно на количество живых гемопоэтических стволовых клеток. Таким образом, отличный от миелоаблативного режим, представленный дексаметазоном в острых высоких дозах, может устранять необходимость переливаний стволовых клеток для восстановления кроветворения после иммунологической перезагрузки.

Фиг. 14. У 50% (2 из 4) пациентов-людей, получавших 3 мг/кг основания дексаметазона, происходила деплеция CD3, CD4 и CD8 положительных лимфоцитов. Изображены данные до и после лечения у индивидуумов, через 48 ч после перорального введения 3 мг/кг основания дексаметазона четырем пациентам-людям, значения и линейные графики CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, измеряемые с помощью проточной цитометрии. Значения каждого пациента до лечения связаны со значениями после лечения с помощью соединительной линии. CD4<sup>+</sup> клетки также представляют собой CD3<sup>+</sup> клетки. CD8<sup>+</sup> клетки также представляют собой CD3<sup>+</sup> клетки.

Фиг. 15. У 25% (1 из 4) пациентов-людей, получавших 3 мг/кг основания дексаметазона, происходила деплеция Treg и В-лимфоцитов. Линия представляет собой данные у индивидуумов до и после лечения, а также через 48 ч после перорального введения 3 мг/кг основания дексаметазона четырем пациентам-людям, значения и линейные графики Treg и В-лимфоцитов, измеряемые с помощью проточной цитометрии. Значения каждого пациента до лечения связаны со значениями после лечения с помощью соединительной линии. Treg идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. В-лимфоциты идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>.

Фиг. 16. У 75% (3 из 4) пациентов-людей, получавших 3 мг/кг основания дексаметазона, происходила деплеция NK-клеток, в то время как гемопоэтические стволовые клетки сохранялись. Линия представляет собой данные у индивидуумов до и после лечения, а также через 48 ч после перорального введения 3 мг/кг основания дексаметазона четырем пациентам-людям, значения и линейные графики NK-клеток и гемопоэтических стволовых клеток (HSC), измеряемые с помощью проточной цитометрии. Значения каждого пациента до лечения связаны со значениями после лечения с помощью соединительной линии. NK-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>. HSC идентифицировали как CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>.

Фиг. 17. 100% пациентов-людей, получавших основу дексаметазона в дозе 3 мг/кг, продемонстрировали повышенные уровни IL-2 и/или IL-15 в сыворотке крови, но отсутствие повышения уровня IL-6. Изображены столбиковые графики для каждого пациента до и после лечения, через 48 ч после перорального введения 3 мг/кг основания дексаметазона четырем пациентам, уровни интерлейкина-2 и интерлейкина-15 в плазме крови, измеряемые с помощью анализа ProCartaPlex-9 plx Luminex.

На фиг. 1-17 изображены данные тех же самых четырех пациентов.

Фиг. 18. Пероральное введение основания дексаметазона в дозе 3 мг/кг повышало количество MSC костного мозга через 48 ч. Изображены столбиковые диаграммы данных от 31 исторически наивного контрольного человека плюс стандартное отклонение, и двух пациентов, получавших 3 мг/кг дексаметазона за 48 ч до аспирации концентрированного костного мозга из гребня подвздошной кости с использованием иглы MarrowCellution™. На графиках представлено количество CFU/мл костного мозга ± стандартное отклонение. Костный мозг добавляли непосредственно в среду для анализа фибробластов колониеобразующих единиц (CFU-F) без дополнительных манипуляций через 24 часа после сбора и транспортировки при контролируемой комнатной температуре. Количество колоний CFU-F представляет собой показатель количества мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в исходном материале. Через 48 ч после перорального введения дексаметазона в дозе 3 мг/кг количество MSC костного мозга гребня подвздошной кости составляло приблизительно в два раза больше по сравнению с 31 историческим контролем. Основание дексаметазона при пероральном введении в дозе 3 мг/кг повышало количество CFU-F на 1 мл в костном мозге человека через 48 ч по сравнению с 31 историческим контролем, которому проводили аспирацию с использованием той же иглы MarrowCellution™, что и у пациентам М и Р.

Фиг. 19. Сравнение введения основания дексаметазона при пероральном введении в дозе 12 и

17-18 мг/кг во -2-й день с однократной дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день вместе с 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во -2-й день и с 2 днями повторного введения циклофосфамида 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Представлен график абсолютного количества лимфоцитов у индивидуумов и средних значений (слева), измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышью в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Также изображено (справа) представление графиков введения у мышей с этими режимами.

Фиг. 20. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день в комбинации с 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона во -2-й день вызывала эквивалентную лимфодеплецию CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов по сравнению с 2-дневным повторным введением циклофосфамида 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Представлены графики CD3<sup>+</sup> (слева) и CD4<sup>+</sup> (справа) лимфоцитов у индивидов, а также средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованных к относительным абсолютных количеств с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышью в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й день и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Как на графике CD3<sup>+</sup> (слева), так и на графике CD4<sup>+</sup> (справа), данные для основания дексаметазона 12 мг/кг или 17-18 мг/кг изображены в столбцах справа от каждого (относительные количества представляют собой "92", "71", "37" и "25").

Фиг. 21. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день в комбинации с 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона во -2-й день вызывала эквивалентную лимфодеплецию CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и Treg по сравнению с 2-дневным повторным введением циклофосфамида 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Представлены графики Treg (справа) и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (слева) у индивидов, а также средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованных к относительным абсолютных количеств с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышью в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-й -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Как на графике CD8<sup>+</sup> (слева), так и на графике CD4<sup>+</sup> (справа), данные для основания дексаметазона 12 или 17-18 мг/кг изображены в столбцах справа от каждого (относительные количества представляют собой "33", "1,4", "0,2" и "0,5").

Фиг. 22. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день в комбинации с 12 мг/кг или 17-18 мг/кг основания дексаметазона во -2-й день вызывала эквивалентную лимфодеплецию NK-клеток и В-лимфоцитов по сравнению с 2-дневным повторным введением циклофосфамида 166 мг/кг в -5-й и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-й, -4-й, -3-й, -2-й дни. Представлены графики В-лимфоцитов (слева) и NK-клеток (справа) лимфоцитов у индивидов, а также средних значений, измеряемых с помощью проточной цитометрии в виде относительных количеств и нормализованных к относительным абсолютных количеств с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышью в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 мг/кг или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Как на графике В-клеток (слева), так и на графике NK-клеток (справа), данные для основания дексаметазона 12 или 17-18 мг/кг изображены в столбцах справа от каждого (относительные количества представляют собой "111" и "58" для В-клеток; не представлены для NK-клеток).

Фиг. 23. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день в комбинации с 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона во -2-й день вызывала эквивалентную лимфодеплецию абсолютного количества лимфоцитов, но способствовала сохранению нейтрофилов, по сравнению с 2-дневным повторным введением циклофосфамида 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Представлены графики абсолютного

количества нейтрофилов (слева) и абсолютных значений лимфоцитов (справа) у индивидуумов, а также средних значений, измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышей в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Fl<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Как на графике нейтрофилов (слева), так и на графике лимфоцитов (справа) данные для основания дексаметазона 12 или 17-18 мг/кг изображены в столбцах справа от каждого (относительные количества представляют собой "321", "605", "521" и "88").

Фиг. 24. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup>) и флударабина 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-й день в комбинации с 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день способствовала сохранению эритроцитов (RBC) и тромбоцитов. Представлены графики абсолютного количества тромбоцитов и абсолютного количества RBC у индивидуумов, а также средних значений, измеряемых с помощью общего анализа крови через 48 ч после того, как мышей в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Fl<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)). Как на графике RBC (слева), так и на графике тромбоцитов (справа) данные для основания дексаметазона 12 или 17-18 мг/кг изображены в столбцах справа от каждого (относительные количества представляют собой "10", "10", "348" и "373").

Фиг. 25. Однократная доза циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup>) и флударабина 10 мг/кг в -5-й день в комбинации с 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона во 2-й день способствовала сохранению массы тела, показателя токсичности, по сравнению с 2-дневным повторным введением циклофосфамида 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 днями введения флударабина 10 мг/кг в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Представлены графики (слева) разницы массы тела и средних значений, рассчитанных путем вычитания массы тела через 48 ч после того, как мышей в/б обрабатывали PBS (носителем) или в/б повторно циклофосфамидом 166 мг/кг в -5- и -4-й дни и 4 дня в/б флударабином 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни (Flu<sup>+</sup>Cy) или однократной в/б дозой циклофосфамида 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) и в/б дозой флударабина 10 мг/кг в 5-й день, а затем перорально 12 или 17-18 мг/кг дексаметазона во 2-й день (Flu<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (12 мг/кг); Fl<sup>+</sup>Cy<sup>+</sup> AVM0703 (17 мг/кг)) или перорально 12 или 17-18 мг/кг основания дексаметазона (AVM0703 (12 мг/кг); AVM0703 (17 мг/кг)), из массы тела до обработки. Группа дексаметазона с острыми высокими дозами не ассоциирована с потерей массы тела, в отличие от групп химиотерапии. Таким образом, дексаметазон в острых высоких дозах обеспечивает такой же эффект лимфодепрессии, что и химиотерапия, но без ассоциированной с ней токсичности. Также изображено (справа) представление графиков введения с этими режимами.

Фиг. 26. Сравнение 15 мг/кг FLED основания дексаметазона (AVM0703) со стандартным режимом химиотерапии: противоопухолевая эффективность. Мышей с В-клеточной лимфомой A20 (в возрасте 8-10 недель) обрабатывали PBS (контроль), 15 мг/кг FLED основания дексаметазона (AVM0703) или одним или двумя циклами циклофосфамида 100 мг/кг в/б, доксорубицина 6 мг/кг в/б, винкристина 0,1 мг/кг в/б и дексаметазона 0,2 мг/кг в/б (СНОР). Введение для одного цикла СНОР проводили в 0-й день, мышам с двумя циклами СНОР вводили препарат в 0- и 10-й дни, а введение дексаметазона проводили в 7-, 10-, 18-, 23-, 24-, 28-, 35- и 42-й дни (обозначено стрелками). За мышами наблюдали в отношении роста опухоли с измерением объема опухоли (мм<sup>3</sup>) каждые 2-3 дня. Эффективность 15 мг/кг HED основания дексаметазона является более высокой, чем 1 цикла СНОР, но не так эффективной, как 2 циклов СНОР с точки зрения контроля объема опухоли. Однако применение 15 мг/кг HED основания дексаметазона было ассоциировано с гораздо более благоприятным профилем токсичности по сравнению с 2 циклами СНОР.

Фиг. 27. Сравнение 15 мг/кг HED основания дексаметазона (AVM0703) со стандартным режимом химиотерапии: токсичность. На панели А изображено процентное изменение массы тела при введении 15 мг/кг HED основания дексаметазона (AVM0703) по сравнению с контролем PBS. На панели В изображено процентное изменение массы тела для 1 цикла или двух циклов циклофосфамида 100 мг/кг в/б, доксорубицина 6 мг/кг в/б, винкристина 0,1 мг/кг в/б и дексаметазона 0,2 мг/кг в/б (СНОР) по сравнению с контролем PBS. Снижение массы тела, наблюдаемое у мышей, обработанных двумя циклами СНОР (В), является намного более высоким, чем у мышей, обработанных 15 мг/кг HED основания дексаметазона (А). Кроме того, 18% мышей, обработанных двумя циклами СНОР, погибли в результате обработки СНОР, тогда как ни одна мышь не погибла в результате обработки дексаметазоном.

Фиг. 28. Статистическое сравнение 15 мг/кг HED основания дексаметазона (AVM0703) с контролем PBS. Мышей с В-клеточной лимфомой A20 (в возрасте 8-10 недель) обрабатывали PBS (контроль) или 15 мг/кг HED основания дексаметазона (AVM0703). Введение дексаметазона проводили в 7-, 10-, 18-, 23- и 24-й дни (указано стрелками). За мышами наблюдали в отношении роста опухоли с измерением объема опухоли (мм<sup>3</sup>) каждые 2-3 дня. Эффективность 15 мг/кг HED основания дексаметазона (черные квадраты)

является более высокой, чем у контроля PBS (черные кружки), как наблюдается по снижению роста опухоли. Статистически значимые различия в объеме опухоли наблюдали в 15-, 17- и 20-й дни.

Фиг. 29. Терапия глюкокортикоидами снижает необходимую дозу для эффективной химиотерапии: опухоленесущие субъекты, обработанные только PBS ("контроль") или основанием дексаметазона ("AVM0703"), демонстрируют продолжающийся рост опухоли, обычно с высокой скоростью роста через 20 дней. Опухоленесущие субъекты, обработанные AVM0703 в 11-й день с последующей одной дозой химиотерапии Су/Flu в 14-й день ("Combo"), демонстрируют устойчивое и долговременное уменьшение объема опухоли аналогично опухолям субъектов, обработанных двумя дозами химиотерапии Су/Flu, в 11- и 14-й дни ("Су/Flu").

Фиг. 30. Терапия высокими дозами глюкокортикоидов снижает плотность опухоли без значимого влияния на массу тела. После подтверждения опухоли у субъектов измеряли плотность опухоли после введения еженедельных доз глюкокортикоида AVM0703 в дозе 6 мг/кг HED еженедельно, 15 мг/кг HED еженедельно или 21 мг/кг HED еженедельно (левая панель). Также изображена масса тела мышей в ходе исследования (правая панель); пунктирная линия представляет 20% снижение средней массы тела мышей в начале исследования. Значимое снижение массы тела вследствие токсичности отсутствует, как и отсутствует гибель мышей.

### Подробное описание сущности изобретения

Цитотоксические химиотерапевтические средства вызывают гибель клеток посредством механизмов или средств, не опосредованных рецепторами. Цитотоксические химиотерапевтические средства вызывают гибель клеток, нарушая функции, необходимые для деления клеток, метаболизма или выживания клеток. Вследствие этого механизма действия клетки, которые быстро растут (что означает пролиферирующие или делящиеся) или являются метаболически активными, будут уничтожаться предпочтительно по сравнению с клетками, которые не являются таковыми. Статус различных клеток в организме как делящихся или как использующих энергию (что представляет собой метаболическую активность для поддержания функции клетки) определяет дозу химиотерапевтического средства, которая вызывает гибель клеток. Специалисту в данной области техники будет понятно, что глюкокортикоид, который применяется в настоящем изобретении, не является цитотоксическим химиотерапевтическим средством. Цитотоксические химиотерапевтические средства не относятся исключительно к алкилирующим средствам, антиметаболитам, растительным алкалоидам, ингибиторам топоизомеразы, антинеопластическим средствам и триоксиду мышьяка, кармустину, флударабину, IDA ara-C, миалотангу, GO, азотистому иприту, циклофосфамиду, гемцитабину, бендамустину, общему облучению организма, цитарабину, этопозиду, мелфалану, пентостатину и облучению.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим глюкокортикоид, для применения в лечении заболеваний путем иммуноабляции. В частности, композиции по настоящему изобретению могут быть предназначены для применения в лечении заболеваний, которые опосредуются иммунными клетками, такими как лимфоциты. Лечение включает введение дозы фармацевтической композиции пациенту для доставки глюкокортикоида в дозе, эквивалентной приблизительно 3-26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED).

В контексте настоящего документа термин "глюкокортикоид" включает агонисты глюкокортикоидных рецепторов и любое соединение, которое связывается с глюкокортикоидным рецептором. Такие соединения относятся, но не ограничиваются ими, к дексаметазону, средствам, содержащим дексаметазон, гидрокортизону, метилпреднизону, преднизону, кортикону, будесониду, бетаметазону и беклометазону. Другие глюкокортикоиды включают преднизолон, мометазона фуруат, триамцинолона ацетонид и метилпреднизолон. Глюкокортикоиды дополнительно включают агонисты, модулирующие глюкокортикоидные рецепторы. Кроме того, селективные агонисты глюкокортикоидных рецепторов можно применять в фармацевтических композициях, раскрываемых в настоящем документе. Такие агонисты или модуляторы включают, например селективные модуляторы глюкокортикоидных рецепторов (SEGRM) и селективные агонисты глюкокортикоидных рецепторов (SEGRA). Глюкокортикоиды, модуляторы глюкокортикоидных рецепторов и селективные агонисты глюкокортикоидных рецепторов (SEGRA), которые можно применять в раскрываемых в настоящем документе способах и композициях, хорошо известны специалистам в данной области техники.

Глюкокортикоиды и средства, модулирующие глюкокортикоидные рецепторы (GR), оказывают свое действие посредством мембранных глюкокортикоидных рецепторов и цитоплазматических GR, которые активируют или подавляют экспрессию генов. Некоторые из необходимых эффектов лимфодеплеции глюкокортикоидов и средств, модулирующих GR, по-видимому, опосредуются мембранными GR или другими негеномными эффектами в дополнение к их геномным эффектам. Интересно, что совместное лечение с дексаметазоном, как было продемонстрировано, снижает резистентность к глюкокортикоидам (Serafin et al., 2017).

Эффекты глюкокортикоидов сложны и зависят от аффинности каждого конкретного глюкокортикоида к GR и минералокортикоидному рецептору (MR). Кроме того, в настоящее время известно девять изоформ цитозольного GR и дополнительных мембранных GR рецепторов, которые были идентифицированы, но не полностью охарактеризованы. Сообщалось, что глюкокортикоиды по-разному влияют на уровни

лимфоцитов в зависимости от концентрации вводимого глюкокортикоида и продолжительности лечения. В целом, сообщалось, что в низких дозах, обычно применяемых для хронической терапии, глюкокортикоиды перераспределяют лимфоциты из периферической крови в костный мозг, в средних дозах глюкокортикоиды вызывают лейкоцитоз, который считается перераспределением лейкоцитов из костного мозга, селезенки и тимуса в периферическую кровь, а в высоких дозах глюкокортикоиды оказывают лимфотоксическое действие на лимфоциты, вызывая апоптоз и некроптоз. Продолжительность эффекта также зависит от уровня дозы, например, Fauci et al., (1976) сообщает, что однократная пероральная доза дексаметазона 0,24 мг/кг подавляет Т- и В-лимфоциты периферической крови на 80%, при этом восстановление начинается через 12 ч и уровни становятся нормальными через 24 часа. Однако настоящее изобретение демонстрирует, что острые пероральные дозы 3 мг/кг или более необходимы для снижения Т- и В-клеток периферической крови через 24-48 ч после введения, а возврат к исходным уровням происходит через приблизительно 5-14 дней после введения.

Необходимые эффекты *in vivo* иллюстративных глюкокортикоидов будут включать уменьшение зародышевого центра и маргинальных зон во вторичных лимфатических сосудах, в частности, прямое уничтожение опухолей некоторых видов рака; множественной миеломы, почечно-клеточной карциномы, лейкоза и лимфомы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рак предстательной железы и молочной железы; деплецию всех типов лимфоцитов периферической крови, отсутствие перераспределения лимфоцитов в ВМ или другие органы и повышение уровней цитокинов плазмы крови, включая IL-2, и/или IL-7, и/или IL-12, и/или IL-15, до уровней предпочтительно 20 пг/мл или выше, среди прочего. Иллюстративные глюкокортикоиды не повышают уровни IL-6 в плазме крови, одного из основных факторов, вызывающих синдром высвобождения цитокинов, индуцированный АСТ (CRS). Иллюстративные глюкокортикоиды не повышают уровни GM-CSF в плазме крови, одного из основных факторов, вызывающих нейроэдем, индуцированную АСТ. Острые дозы дексаметазона приблизительно 6 мг/кг HED и выше уменьшают зародышевые центры и маргинальные зоны во вторичных лимфатических сосудах; острые дозы дексаметазона приблизительно 1,6 мг/кг HED за 48-часовой период характеризуются приблизительно 50% прямым уничтожением опухоли при множественной миеломе и других линий раковых клеток, которое сохраняется, но не повышается в дозах до приблизительно 12 мг/кг HED; острые дозы дексаметазона, превышающие приблизительно 3 мг/кг HED, требуются для лимфодеплеции, как продемонстрировано тем наблюдением, что у 50% пациентов, получавших 3 мг/кг HED, наблюдался лейкоцитоз (фиг. 14); повышение уровня цитокинов IL-2 и IL-15 в плазме крови наблюдается в дозах основания дексаметазона приблизительно 3 мг/кг HED или выше (фиг. 17). Основываясь на необходимых эффектах *in vivo* в показаниях, раскрываемых в настоящем документе, наиболее предпочтительные острые дозы основания дексаметазона, которые могут быть преобразованы в эквивалентные дозы других глюкокортикоидов на основе известных вычислительных таблиц или как раскрывается в настоящем описании, скорее всего, будут составлять около 9 мг/кг HED и выше.

Однократную высокую дозу глюкокортикоида можно вводить перорально или приблизительно в течение 1 ч в виде в/в инфузии. Суммарную дозу можно вводить в виде повторяющихся в/в или пероральных доз в любом количестве, так что суммарная доза, например, дексаметазона составляет от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг в течение от приблизительно 24- до приблизительно 72-часового периода.

Эквивалентные дозы другого глюкокортикоида или средства, модулирующего глюкокортикоидные рецепторы, можно немедленно и легко рассчитать с использованием общедоступных алгоритмов преобразования доз кортикоидов, предпочтительно <http://www.medcalc.com>. Например, 3-12 мг/кг дексаметазона преобразуется в 19-75 мг/кг преднизона. Поскольку биологический период полувыведения преднизона составляет приблизительно 20 ч, а биологический период полувыведения дексаметазона составляет от 36 до 54 ч, то преднизолон будет вводиться от 19 до 75 мг/кг каждые 24 ч в качестве эквивалентной биологической дозы. Более конкретно, доза дексаметазона 12 мг/кг соответствует 1) дозе преднизолона 75 мг/кг, которая потребует повторного введения от приблизительно двух до приблизительно трех доз каждые 24 ч. Доза 10 мг/кг бетаметазона соответствует приблизительно 12 мг/кг дексаметазона и имеет фармакодинамический (биологический) период полувыведения, аналогичный дексаметазону. Однако бетаметазон снижает количество эритроцитов в дозах приблизительно 24 мг/50 кг (Gaug 2017).

Дозы DEX (основание дексаметазона) в примерах настоящего документа приведены в виде эквивалентных доз для человека (HED). AVM0703 (также обозначаемый AugmenStem™ или PlenaStem™) в приведенных примерах представляет собой Dex (основание дексаметазона) в виде дексаметазона фосфата натрия в запатентованном буфере.

Способы расчета эквивалентной дозы для человека (HED) известны в данной области техники. Например, Центр оценки и исследований лекарственных средств (CDER) FDA в 2005 году выпустил широко цитируемый руководящий документ (U.S. Department of Health CDER, 2005), в котором излагается установленный алгоритм преобразования доз животных в HED на основе площади поверхности тела (общепринятый метод экстраполяции доз между видами) в табл. 1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что доза для животных в мг/кг, описанная ниже, HED легко рассчитывается с использованием стандартных коэффициентов пересчета в правых столбцах табл. 1.

Таблица 1

Преобразование доз для животных в эквивалентные дозы  
для человека на основании площади поверхности тела

Вид	Для преобразования дозы для животного в мг/кг в дозу в мг/м <sup>2</sup> , необходимо выполнить умножение на k <sub>m</sub>	Для преобразования дозы для животного в мг/кг в HED <sup>a</sup> в мг/кг, необходимо или:	
		Разделить дозу для животного на	Умножить дозу для животного на
Человек	37	---	---
Ребенок (20 кг) <sup>b</sup>	25	---	---
Мышь	3	12,3	0,08
Хомяк	5	7,4	0,13
Крыса	6	6,2	0,16
Хорек	7	5,3	0,19
Морская свинка	8	4,6	0,22
Кролик	12	3,1	0,32
Собака	20	1,8	0,54
Приматы:			
Обезьяны <sup>c</sup>	12	3,1	0,32
Мармозетка	6	6,2	0,16
Беличья обезьяна	7	5,3	0,19
Бабуин	20	1,8	0,54
Микропиг	27	1,4	0,73
Минипиг	35	1,1	0,95

<sup>a</sup> Подразумевается человек массой тела 60 кг. Для видов, не указанных в перечне, или для масс, выходящих за рамки стандартных диапазонов, HED можно рассчитать по следующей формуле:

$$HED = \text{доза для животного в мг/кг} \times \left( \frac{\text{масса животного в кг}}{\text{масса человека в кг}} \right)^{0,33}$$

<sup>b</sup> Это значение k<sub>m</sub> приводится только для справки, поскольку здоровые дети редко участвуют в качестве добровольцев в исследованиях 1-й фазы.

<sup>c</sup> Например, яванский макак, макак-резус и медвежий макак.

Дозы, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в виде "дозы на основе массы тела" или в виде "дозы на основе площади поверхности тела (BSA)". Доза на основе массы тела представляет собой дозу, которую вводят пациенту, и она рассчитывается на основе массы тела пациента, например, в мг/кг. Доза на основе BSA представляет собой дозу, вводимая пациенту, которая рассчитывается на основе площади поверхности пациента, например, в мг/м<sup>2</sup>. Две формы измерения дозы могут быть преобразованы в контексте введения человеку путем умножения дозы на основе массы тела на 37 или деления дозы на основе BSA на 37, как представлено в табл. 1 выше.

Термины "субъект" и "пациент" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к человеку или животному.

Дексаметазон, как и другие глюкокортикоидные стероиды в эквивалентных дозах, ингибирует образование и пролиферацию зародышевых центров в лимфатических тканях и вызывает лимфодеpleцию периферической крови. Дозы глюкокортикоидов, в частности дексаметазона, предпочтительно приводят к более 75% лимфодеpleции. Более предпочтительно дозы глюкокортикоида, в частности дексаметазона, приводят к более 80% лимфодеpleции. Наиболее предпочтительно доза глюкокортикоида, в частности, дексаметазона, приводит к более 95% лимфодеpleции. Специалисту в данной области техники будет понятно, что лимфодеpleцию можно легко измерить путем измерения общего анализа крови (СВС).

Дексаметазон и другие предпочтительные глюкокортикоиды способствуют сохранению нейтрофилов и не подавляют функцию нейтрофилов (Schleimer R.P., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989; 250:598-605), а также способствуют сохранению эритроцитов (RBC), тромбоцитов, мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и гематопозитических стволовых клеток (HSC). Сохранение нейтрофилов у людей означает, что абсолютное количество нейтрофилов (ANC) составляет более 500 на 1 мм<sup>3</sup>. В результате сохранения нейтрофилов, эритроцитов и тромбоцитов глюкокортикоиды, вызывающие лимфоабляцию, будут уменьшать или устранять необходимость в переливаниях крови. Глюкокортикоиды, вызывающие лимфоабляцию, также способствуют сохранению мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (MSC) и не влияют на способность MSC костного мозга дифференцироваться в хондроциты, остециты или адипоциты. Глюкокортикоиды, вызывающие лимфоабляцию, также увеличивают эндогенное количество MSC BM или их выживаемость ex vivo как у людей, так и у лошадей. Глюкокортикоиды, вызывающие лимфоабляцию, повышают уровни IL-2, IL-7, IL-12 и IL-15 в плазме крови, но не уровни IL-6 или GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъекта выбирают до лечения и/или оценивают после лечения на основании измерений уровней одного или нескольких из этих цитокинов в плазме крови.

Дексаметазон одобрен для применения с начальной дозой дексаметазона фосфата натрия для инъекций, которая варьируется от 0,5 до 9 мг в сутки в зависимости от заболевания, подлежащего лечению, что составляет суточную дозу от 0,01 до 0,18 мг/кг при массе тела 50 кг. При менее тяжелых заболеваниях дозы менее 0,5 мг могут быть достаточными, в то время как при тяжелых заболеваниях могут потребоваться дозы более 9 мг. В современной медицинской практике существует тенденция к применению высоких (фармакологических) доз кортикостероидов для лечения не поддающегося лечению шока. При отеке головного мозга инъекцию дексаметазона фосфата натрия обычно вводят сначала в дозе 10 мг внутривенно, а затем по 4 мг каждые 6 ч внутримышечно до исчезновения симптомов отека головного мозга. Эта суммарная доза будет соответствовать суммарной 24-часовой дозе от приблизительно 0,34 до 0,48 мг/кг и суммарной 72-часовой дозе от 0,8 до 1,12 мг/кг за 72 ч, что не является эффективной дозой в соответствии с настоящим изобретением, в котором применяют дозы от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг.

В случае острых аллергических нарушений рекомендуется инъекция дексаметазона фосфата натрия, USP 4 мг/мл: в первый день 1 или 2 мл (4 или 8 мг) внутримышечно, затем дексаметазона фосфат натрия в таблетках 0,75 мг; во второй и третий дни по 4 таблетки в два приема каждый день; в четвертый день по 2 таблетки в два приема; в пятый и шестой дни по 1 таблетке каждый день; в седьмой день без лечения; в восьмой день визит последующего наблюдения. Дексаметазон применяли в отделении неотложной помощи при тяжелой острой детской астме в дозе 2 мг/кг, что ниже доз глюкокортикоидов, определенных в настоящем изобретении.

Обычные составы глюкокортикоидов, таких как дексаметазон, могут быть неподходящими для применения в терапевтических путях применения по настоящему изобретению. Например, дексаметазон фосфат натрия (DSP) в настоящее время доступен в виде составов с низкими дозами (2-4 мг/мл) и малыми объемами (например, APP Pharmaceuticals, Mylan), которые содержат противомикробные консерванты, такие как бензиловый спирт (BA) и пропилпарабен (PP). Целевая доза DSP, необходимая для выполнения полной лимфоабляции, повлечет за собой применение нескольких флаконов, что приведет к передозировке вспомогательных веществ. Превышение допустимого суточного потребления (ADI) бензилового спирта и пропилпарабена согласно ВОЗ ассоциировано с генотоксичностью и повышенным риском рака (Darbre et al., 2014), репродуктивной токсичностью (Aker et al., 2016), повышенным риском аллергических заболеваний (Savage et al., 2012; Spanier et al., 2014) и дисфункциями ЦНС новорожденных (Medicines Agency, 2017). Более того, при использовании коммерчески доступных инструкций по применению DSP серьезные психоневрологические эффекты возникают у приблизительно 6% пациентов, получающих стероиды (Malmegrim et al., 2017). Поскольку настоящее изобретение включает введение высоких доз глюкокортикоидов, следует применять составы с низкими уровнями потенциально токсичных консервантов или составы без токсичных консервантов. Предпочтительно консервант представляет собой антиоксидант.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать консервант (например, антиоксидант), такой как сульфит натрия, для поддержания стабильности композиции. Сульфиты также широко используются в качестве консервантов и антиоксидантных добавок в фармацевтической промышленности. Сообщалось, что воздействие таких сульфитов вызывает ряд нежелательных клинических явлений у чувствительных индивидуумов, начиная от дерматита, крапивницы, приливов, гипотонии и боли в животе и заканчивая опасными для жизни анафилактическими и астматическими реакциями. Симптомы, индуцируемые сульфитом, варьируются от легких у некоторых людей до тяжелых у других, а у некоторых людей реакции могут быть опасными для жизни. В предпочтительных вариантах осуществления, в которых сульфит натрия включен в качестве антиоксиданта, концентрация составляет от 0 до 70 ppm сульфита натрия (безводного).

Антиоксиданты могут быть добавлены в количествах, которые снижены по сравнению с уровнями, обычно применяемыми в композициях, содержащих глюкокортикоиды, тем самым снижая токсичность и нежелательные побочные эффекты, ассоциированные с применением таких антиоксидантов. В некоторых случаях в составы по настоящему изобретению могут не входить антиоксиданты.

В контексте настоящего документа антиоксиданты представляют собой вспомогательные вещества, которые задерживают или ингибируют процесс окисления молекул, тем самым повышая стабильность композиции. Антиоксиданты, которые можно применять, включают, например, аскорбиновую кислоту, ацетилцистеин, бутилгидроксианизол, цистеина гидрохлорид, дитионит натрия, гентизиновую кислоту, глутамата моносодия, глутатион, формальдегид сульфоксилат натрия, метионин, монотиглицерин, пропилгаллат, сульфиты, тиогликолят натрия,  $\alpha$ -тиглицерин, токоферол  $\alpha$ ,  $\alpha$ -токоферол гидросукцинат и тиогликолят натрия.

В дополнение к активному глюкокортикоиду и антиоксиданту в фармацевтические композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть включены дополнительные компоненты, хорошо известные специалистам в данной области техники. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены с использованием фармацевтически приемлемого "носителя", состоящего из материалов, которые считаются безопасными и эффективными. Термин "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным объектам и композициям, которые "обычно считаются безопасными", например, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают аллергической или подобной нежелательной реакции, такой как расстройство желудка и т.п., при введении человеку. В некоторых вариантах осуществления этот

термин относится к молекулярным объектам и композициям, одобренным регулирующим органом федерального правительства США или правительства штата, в виде перечня GRAS в соответствии с разделами 204(s) и 409 Федерального закона о пищевых продуктах, лекарствах и косметических средствах, т.е. при условии предварительного рассмотрения и утверждения FDA или аналогичных перечней, Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных и, в частности, у человека.

Термин "носитель" относится к разбавителям, связывающим веществам, смазывающим веществам и разрыхлителям. Специалисты в данной области техники знакомы с такими фармацевтическими носителями и способами составления фармацевтических композиций с использованием таких носителей.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, например растворители, усилители растворимости, суспендирующие средства, буферные средства, изотонические средства, антиоксиданты или противомикробные консерванты. При применении вспомогательные вещества композиций не будут отрицательно влиять на стабильность, биодоступность, безопасность и/или эффективность активных ингредиентов, т.е. глюкокортикоидов, применяемых в композиции. Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, что предложены композиции, в которых отсутствует несовместимость между какими-либо компонентами лекарственной формы. Вспомогательные вещества можно выбрать из группы, состоящей из буферных средств, солюбилизирующих средств, средств, регулирующих тоничность, хелатирующих средств, антиоксидантов, противомикробных средств и консервантов.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать хелатирующее средство, которое применяется для связывания и снижения реакционной способности ионов металлов, которые могут присутствовать в композициях. Возможными хелаторами являются кальций динатрий ЭДТА 0,01-0,1% (ЭДТА = этилендиаминтетрауксусная кислота или эдетат), динатрий ЭДТА 0,01-0,11%, натрий ЭДТА 0,20%, кальций версетамид натрий 2,84%, кальтеридол 0,023%, ДТРА 0,04-1,2% (диэтилентриаминпентауксусная кислота). В предпочтительном варианте осуществления концентрация динатрия ЭДТА (эдетата) составляет от 0 до 500 ppm.

Как отмечено в WO 2018/183927, глюкокортикоиды также можно применять в качестве прекодиционирующего средства в сочетании с адаптивными видами клеточной терапией (АСТ). Глюкокортикоиды, в частности дексаметазон, в дозе от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг, однократная острая доза от приблизительно 12 до приблизительно 72 ч до введения клеточной иммунотерапии или суммарная доза от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг, вводимая от приблизительно 12 до приблизительно 72 ч после введения клеточной терапии увеличивают уровни IL-2 и IL-15 в плазме крови.

Глюкокортикоиды, в частности дексаметазон, в дозе от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг, однократная острая доза или суммарная доза от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 26 мг/кг, вводимая в течение приблизительно 72 ч, либо отдельно, либо в комбинации с цитотоксическим прекодиционированием пониженной интенсивности, могут быть пригодным для лечения аутоиммунных заболеваний. Для лечения аутоиммунного заболевания АСТ может быть нацелена на иммунные клетки, вызывающие заболевание, в попытке уничтожить аутоиммунные распознающие клетки. Кроме того, при аутоиммунных заболеваниях АСТ может представлять собой Treg, нацеленную на CAR или TCR, или экспрессируемое антитело к антигену, специфически или селективно экспрессируемому областью или органом в организме, в которых продолжается аутоиммунная атака. Treg могут не исключительно относиться к CD4<sup>+</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Treg, FoxP3<sup>+</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup>Treg, CD8<sup>+</sup>Treg, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int/high</sup>, CD127<sup>low</sup>, CTLA4<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>, CD127<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>индуцированным Treg, или Treg I типа.

"Естественные" регуляторные Т-клетки, первоначально распознаваемые по их конститутивной экспрессии CD4 и CD25, можно дополнительно определить по экспрессии фактора транскрипции foxP3 и поверхностного CD152. Их генерация и некоторая их супрессорная активность зависят от TGF-бета, и было продемонстрировано, что они могут индуцировать IDO в соответствующих DC посредством CD152-опосредованного лигирования CD80/86. Анергические CD4<sup>+</sup> Т-клетки, генерируемые стимуляцией антигеном в отсутствие костимуляции, по-видимому, характеризуются внутренним повышением своего порога для стимуляции антигена, что может поддерживаться экспрессией Е3-убиквитинлигаз, таких как GRAIL, c-cbl и Itch. Анергические клетки могут выступать в качестве регуляторных Т-клеток, конкурируя в местах презентации антигена и адсорбируя стимулирующие цитокины, такие как IL-2. Tr1 клетки представляют собой индуцированную субпопуляцию CD4 Т-клеток-хэлперов, дифференцировка которых и некоторые из их регуляторных свойств зависят от IL-10. Они не экспрессируют foxP3, но могут экспрессировать маркеры, ассоциированные с клетками Th2 и репрессором GATA (ROG). Как и природные Treg, они экспрессируют высокие уровни поверхностного CD152 и могут вызывать катаболизм IDO и триптофана в соответствующих DC. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> супрессорные Т (Ts) клетки были впервые охарактеризованы у человека, но недавно были продемонстрированы и у грызунов. Как и Tr1 клетки, они индуцируются в присутствии IL-10, и IL-10 может участвовать в подавлении костимуляции дендритных клеток и повышении активности ILT-3 и ILT-4 (в DC человека), которые, по-видимому, играют важную роль в презентации антигена для придания толерантности дополнительным когортам Т-клеток.

Регуляторные Т-клетки (Treg) играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Treg по-

давляют функцию других Т-клеток, ограничивая иммунный ответ.

Изменения количества и функции Трег вызывают несколько аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз, активный ревматоидный артрит и сахарный диабет 1 типа. Высокие уровни Трег были обнаружены при многих злокачественных нарушениях, включая различные виды рака легких, поджелудочной железы и молочной железы. Трег могут также предупреждать противоопухолевые иммунные ответы, что приводит к увеличению смертности.

К настоящему времени идентифицированы два основных класса Трег: CD4 и CD8 Трег. Трег CD4 состоят из двух типов: "естественные" Трег (nТрег), которые конститутивно экспрессируют CD25 и FoxP3, и так называемые адаптивные или индуцибельные Трег (iTрег).

Природные Трег (nТрег) происходят из тимуса в виде CD4<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих высокие уровни CD25 вместе с фактором транскрипции (и маркером линии) FoxP3. nТрег составляют примерно 5-10% от общей популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток и могут быть впервые обнаружены на единичной положительной стадии развития Т-лимфоцитов. Они представляют собой положительно отобранные тимоциты с относительно высокой авидностью к аутоантигенам. (Fehervari Z., Sakaguchi S. Development and function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16:203-208.)

Считается, что сигнал для развития в Трег клетки исходит от взаимодействий между Т-клеточным рецептором и комплексом МНС II с собственным пептидом, экспрессируемым на строме тимуса. nТрег практически не зависят от цитокинов.

Адаптивные или индуцибельные Трег происходят из тимуса в виде единичных положительных CD4 клеток. Они дифференцируются в CD25 и FoxP3, экспрессирующие Трег (iTрег) после соответствующей антигенной стимуляции в присутствии когнатного антигена и специализированных иммунорегуляторных цитокинов, таких как TGF-β, IL-10 и IL-4. (Chatenoud L., Bach J.F. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J. Clin. Invest.* 2006; 116:2325-2327.)

FoxP3 в настоящее время является наиболее распространенным маркером Трег, хотя были сообщения о небольших популяциях FoxP3<sup>+</sup> Трег. Обнаружение фактора транскрипции FoxP3 в качестве маркера Трег позволило ученым лучше определить популяции Трег, что привело к обнаружению дополнительных маркеров Трег, включая CD127.

Глюкокортикоиды, в частности дексаметазон, в дозе от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг, однократная острая доза или суммарная доза от приблизительно 3 до приблизительно 26 мг/кг, вводимая в течение приблизительно 72 ч, либо отдельно, либо в комбинации с химиотерапией или облучением пониженной интенсивности, могут быть пригодными для лечения связанные с HIV остаточных явлений заболевания и для лечения лимфом зародышевых центров, таких как лимфома Беркитта.

Фолликулярные CD4 Т-клетки-хэлперы, T<sub>fh</sub>, находящиеся в В-клеточных фолликулах во вторичных лимфоидных тканях, легко инфицируются вирусами при СПИДе и являются основным источником устойчивого вируса, несмотря на относительный контроль вирусной репликации. Такая устойчивость, по меньшей мере частично, связана с относительным исключением эффективных противовирусных CD8 Т-клеток из В-клеточных фолликулов. Сохранение вируса при СПИДе, у индивидуумов, получающих эффективную лекарственную терапию, или у тех, кто спонтанно контролирует вирус, остается препятствием для окончательного лечения. Инфицированные фолликулярные CD4 Т-клетки-хэлперы, T<sub>fh</sub>, присутствующие внутри В-клеточных фолликулов, представляют собой основной источник этого остаточного вируса. Хотя эффективные ответы CD8 Т-клеток могут контролировать репликацию вируса в сочетании с лекарственной терапией или в редких случаях спонтанно, большинство противовирусных CD8 Т-клеток не проникают в В-клеточные фолликулы, а те, которые проникают, не могут надежно контролировать репликацию вируса в популяции T<sub>fh</sub>. Таким образом, эти очаги являются убежищем и резервуаром для репликации вирусов при СПИДе. Лимфодеплеция и уменьшение зародышевых центров и маргинальных зон в селезенке заставит передвигаться остаточные HIV-инфицированные клетки в кровотоки, где они могут быть уничтожены с помощью существующих видов терапии. Латентно инфицированные покоящиеся CD4 Т-клетки были обнаружены в периферической крови, желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и лимфатических узлах HIV-1-инфицированных индивидуумов, а также, вероятно, существуют в других органах, содержащих лимфоидную ткань.

Высокоактивная антиретровирусная терапия (HAART) позволяет на длительное время подавлять нагрузку HIV-1 в плазме крови у инфицированных людей, но вирус сохраняется при низком уровне и восстанавливается после прекращения терапии. Во время HAART этот вирус находится в латентно инфицированных клетках, таких как покоящиеся CD4 Т-клетки, и в других типах клеток, которые могут поддерживать остаточную репликацию вируса. Для терапевтической эрадикации потребуется уничтожение вируса из всех резервуаров.

Лимфома Беркитта представляет собой лимфому зародышевого центра, возникающую и растущую во вторичной лимфатической системе, всегда ассоциированную с хромосомной транслокацией, активирующей c-Myc. Это один из самых быстрорастущих видов рака, который может увеличиваться вдвое каждые 14-18 ч. BL представляет собой агрессивную В-клеточную лимфому, обнаруживаемую в зародышевых центрах селезенки и вторичных лимфатических сосудах. BL названа в честь врача Дениса Парсонса Беркитта, хирурга, который впервые описал болезнь в 1958 году, работая в экваториальной Африке (Burket,

D., 1958). BL чаще всего встречается у детей, живущих в Африке к югу от Сахары, при этом самые высокие показатели заболеваемости и смертности имеют место в Восточной Африке (Ogem, J., et al.). Мальчики более восприимчивы к BL, чем девочки. За пределами Африки BL чаще всего встречается у людей с ослабленной иммунной системой.

Среди В-клеточных злокачественных новообразований CLL является наиболее чувствительной к ибрутинибу, и поэтому, к сожалению, ибрутиниб вряд ли принесет значительную пользу людям, страдающим лимфомой Беркитта и другими лимфомами зародышевого центра. Однако тот же результат по перераспределению В-клеточных видов опухолей в кровотоки, где они более восприимчивы к химиотерапии и менее пролиферативны, может быть достигнут для лимфом зародышевых центров, таких как лимфома Беркитта, при применении средств, которые вызывают абляцию вторичных лимфатических зародышевых центров. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение увеличивает восприимчивость лимфомы к химиотерапии и/или предлагает комбинированную терапию, включающую цитотоксическую химиотерапию пониженной интенсивности в дополнение к глюкокортикоидам, например дексаметазону. В настоящем документе раскрыты различные подходящие виды химиотерапии.

Клинические наблюдения способности ингибитора тирозинкиназы Брутона ибрутиниба лечить хронический лимфолейкоз продемонстрировали, что перераспределение клеток CLL из лимфатических сосудов в кровотоки является механизмом, способствующим его положительному воздействию при CLL. Циркулирующие клетки CLL не являются пролиферативными, при этом пролиферация клона ограничена лимфатическим микроокружением. Следовательно, перераспределение в кровотоки снижает пролиферацию рака. Аналогичным образом, перераспределение ALL из костного мозга в кровотоки, как сообщается, повышает чувствительность к стандартной химиотерапии (Chang B.Y., Blood, 2013, 122:2412-24).

Сообщалось, что глюкокортикоиды оказывают множественное и противоречивое действие на лимфоциты, в зависимости от дозы, продолжительности приема и исследуемых видов. Глюкокортикоиды исследовали в качестве средств, индуцирующих лимфоцитоз, средств, которые увеличивают количество циркулирующих лимфоцитов, с 1943 года (для обзора см. Burger et al., 2013), как правило, с применением преднизона от 0,5 до 1 мг/кг, что эквивалентно дозе дексаметазона 0,1-0,2 мг/кг. В отличие от этого, высокие дозы метилпреднизона (HDMP), применяемые при рефрактерном CLL, не вызывают лимфоцитоза при дозе метилпреднизона, эквивалентной дозе 0,5-1,0 мг/кг, в которой действовал преднизон. Считается, что лимфотоксические высокие дозы стероидов обычно составляют примерно 100 мг суточного эквивалента преднизона, что будет составлять эквивалентную дозу дексаметазона 16 мг, которая составляет примерно от 0,23 до 0,32 мг/кг и которая, как было продемонстрировано, не является эффективной дозой для преколонизирования. Дексаметазон не уменьшает зародышевые центры у мышей до тех пор, пока не будет введена доза приблизительно 3 мг/кг или более HED. Преднизон не оказывает значительного влияния на массу селезенки или зародышевые центры до тех пор, пока он не будет применяться в дозах у мышей более 2,5 мг/кг п/о ежедневно в течение 13 недель (Yan et al., 2015), что составляет дозу для человека, которая будет иметь неприемлемую минералокортикоидную активность в дозе 30 мг в день (~0,48-0,72 мг/кг) считается высокой дозой для пациентов с волчанкой.

Для лечения лимфомы Беркитта (BL) с помощью стандартных режимов химиотерапии, таких как COPADM, преднизон включается в различные циклы, обычно в дозе 60 мг/м<sup>2</sup>, что преобразуется в 1,62 мг/кг преднизона и эквивалентную дозу дексаметазона 0,3 мг/кг, что не является эффективной дозой для преколонизирования. Дексаметазон также применяют в клинической практике для лечения В-клеточных видов рака, обычно при пероральном приеме 40 мг в день в течение 4-5 дней или 6 мг/м<sup>2</sup> в течение 5 дней. При некоторых показаниях, таких как ALL, дексаметазон назначают ежедневно в течение нескольких недель, что может быть ассоциировано с остеонекрозом, особенно у мальчиков-подростков. Риск остеонекроза может быть существенно устранен путем приема дексаметазона через неделю, и он может особенно присутствовать при ALL вследствие режима введения аспарагиназы, который является частью лечения ALL (Chang B.Y., Blood, 2013, 122:2412-24).

Инфекция, вызываемая вирусом Эпштейна-Барра (EBV), обнаруживается почти у всех африканских пациентов с BL и считается, что хроническая малярия снижает устойчивость к EBV, позволяя ей закрепляться. Заболевание обычно поражает челюсть или другую лицевую кость, дистальный отдел подвздошной кишки, слепую кишку, яичники, почки или молочную железу. Кроме того, BL поражает людей с ослабленным иммунитетом, таких как людей с HIV.

BL подразделяется на три основных клинических варианта: эндемический, спорадический и варианты, ассоциированные с иммунодефицитом, причем эндемический вариант (также называемый "африканский вариант") чаще всего встречается у детей, живущих в эндемичных по малярии регионах мира.

Одним из эффектов настоящего изобретения может быть абляция зародышевых центров и/или маргинальных зон для избирательного вытеснения BL и других раковых клеток зародышевых центров или раковых клеток маргинальной зоны из зародышевых центров или маргинальных зон в кровотоки, где их легче уничтожить с помощью химиотерапии или других средств. Это могло бы значительно, безопасно и экономично улучшить результаты лечения BL.

Астма представляет собой хроническое воспаление, характеризующееся повышенным количеством CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов 1 типа и макрофагов в ткани легких и нейтрофилов в просвете дыхательных путей.

Лимфоциты, которые заметно различаются при двух воспалительных состояниях, играют решающую роль в патогенезе астмы и COPD. В настоящее время имеется неопровержимое количество доказательств, подтверждающих важную роль Т-клеток при астме, в частности участие Т-клеток-хэлперов 2 типа (Th2) в atopической аллергической астме, а также отличной от atopической и профессиональной астме. Также может быть незначительный вклад Т-цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток 2 типа. Некоторые цитокины Th2 могут модулировать воспаление дыхательных путей, в частности, интерлейкин-13, который вызывает гиперчувствительность дыхательных путей независимо от IgE и эозинофилии в моделях на животных. Астма и хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) представляют собой два различных воспалительных заболевания легких, которые имеют общую функциональную аномалию, т.е. ограничение воздушного потока (Baraldo et al., 2007).

При астме ограничение воздушного потока в значительной степени обратимо либо спонтанно, либо после лечения, и в большинстве случаев не прогрессирует. С другой стороны, ограничение воздушного потока при COPD обычно прогрессирует и малообратимо. При астме хроническое воспаление вызывает ассоциированное повышение чувствительности дыхательных путей к различным раздражителям, что приводит к повторяющимся эпизодам свистящего дыхания, одышки, стеснения в груди и кашля, особенно ночью и ранним утром. Многие клетки участвуют в воспалительной реакции при астме, и считается, что среди них решающую роль играют CD4<sup>+</sup> лимфоциты 2 типа, тучные клетки и эозинофилы. При COPD малообратимое ограничение воздушного потока ассоциировано с аномальным воспалительным ответом легких на вредные частицы или газы. Это хроническое воспаление характеризуется повышенным количеством CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов 1 типа и макрофагов в ткани легких и нейтрофилов в просвете дыхательных путей. Лимфоциты, которые заметно различаются при этих двух воспалительных состояниях, играют решающую роль в патогенезе астмы и COPD (Baraldo et al., 2007).

#### Определения

Представлены определения, используемые для описания вариантов осуществления изобретения.

Биологический механизм лимфодеплеции означает индукцию запрограммированной гибели клеток посредством апоптоза, некроптоза, пироптоза, аутофагии или онкоза. Различные раздражители могут вызывать отличную от апоптозной форму гибели клеток, называемую некроптозом, которая возникает, когда ингибируются каспазы, необходимые для апоптоза. Пироптоз представляет собой каспазозависимую форму запрограммированной гибели клеток, которая во многих отношениях отличается от апоптоза. В отличие от апоптоза, он зависит от активации каспазы-1 или каспазы-11 (каспазы-5 у человека). Аутофагия представляет собой лизосомозависимый процесс.

Апоптоз представляет собой форму гибели клеток, при которой запрограммированная последовательность событий приводит к уничтожению клеток без выброса вредных веществ в окружающее пространство. Апоптоз играет решающую роль в развитии и поддержании здоровья организма, устраняя старые клетки, ненужные клетки и патологические клетки.

В контексте настоящего документа термин "и/или" следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В"; "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Термин "приблизительно", относящийся к измеряемой величине, такой как количество или временная продолжительность и т.п., относится к вариациям  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ .

Термин "введение" относится к физическому введению средства субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Примеры путей введения составов, раскрываемых в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте настоящего документа фраза "парентеральное введение" означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, например перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный путь или путь введения через слизистые оболочки, например интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Фармакологическая доза представляет собой дозу, намного превышающую нормальные уровни в организме.

В контексте настоящего документа термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения количества метастазов,

увеличения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, увеличения продолжительности жизни или улучшения различных физиологических симптомов, ассоциированных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предупреждению возникновения опухоли, например вакцине.

Терапевтическое средство представляет собой средство, которое увеличивает эффективность клеточных видов иммунотерапии по сравнению с клеточной иммунотерапией без указанного терапевтического средства.

Термин "аутологический" относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он впоследствии будет вводиться, независимо от того, является ли этот индивидуум человеком или другим животным.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, независимо от того, является ли этот индивидуум человеком или другим животным.

Термин дексаметазон (также называемый Dex) не исключительно относится к любому составу, вне зависимости от того, представляет ли он собой жидкий раствор, жидкую суспензию, пероральный раствор, таблетированную форму, таблетированную форму, растворенную в жидкости, содержащей активный ингредиент дексаметазона, инъекционную форму, гелевый состав, пластырный состав или любой состав, содержащий активный ингредиент дексаметазон.

Термин "средства, модулирующие глюкокортикоидные рецепторы", не исключительно относится к агонистам глюкокортикоидных рецепторов или модуляторам глюкокортикоидных рецепторов, включая, но не ограничиваясь ими: соединение A [CpdA; (2-((4-ацетофенил)-2-хлор-N-метил)этиламмонийхлорид)] и N-(4-метил-1-оксо-1H-2,3-бензоксазин-6-ил)-4-(2,3-дигидробензофуран-7-ил)-2-гидрокси-2-(трифторметил)-4-метилпентанамид (ZK216348), AL-438, мапракорат, LGD-5552, RU-24858, фосдагрокорат, PF-802, соединение 10, MK5932, C108297, LGD5552 и ORG 214007-0.

Иммунотоксины представляют собой белки, которые содержат токсин вместе с антителом или фактором роста, которые специфически связываются с целевыми клетками. Иммунотоксины создаются путем химического связывания антитела с токсином цельного белка, лишённого своего природного связывающего домена. Иммунологические белки, которые меньше, чем моноклональные антитела (MoAb), такие как факторы роста и цитокины, также были химически конъюгированы и генетически слиты с белковыми токсинами. Токсины, используемые в иммунотоксинах, происходят из бактерий, грибов и растений, и большинство их функций заключается в ингибировании синтеза белка. Бактериальные токсины, обычно используемые в иммунотоксинах, включают дифтерийный токсин (DT) и токсин из экзотоксина синегнойной палочки (PE). Токсины растений, используемые в иммунотоксинах, включают А-цепь рицина (RTA) и белки, инактивирующие рибосомы (RIP), гелонин, противовирусный белок из лаконоса и додекандрон. Представляя собой фермент, одна молекула токсина может воздействовать на множество молекул субстрата, оказывая разрушительное воздействие на клетку. Токсины, такие как дифтерийный токсин (DT) и экзотоксин синегнойной палочки (PE), предупреждают синтез белка, воздействуя на фактор элонгации 2 (EF-2).

В контексте настоящего документа термин "системная инъекция" не исключительно относится к способу введения, который быстро, в течение секунд или нескольких часов, приводит к циркулирующим уровням клеточных видов иммунотерапии, и не исключительно относится к внутривенному, внутривенному, подкожному введению, введению через подслизистую оболочку носа, лингвальному введению, введению с помощью бронхоскопии, внутривенному, внутриартериальному, внутримышечному, внутриглазному, внутривитреальному, подкожному, внутрикожному введению, введению с помощью дермального пластыря, с помощью кожного пластыря, с помощью пластыря, введению в спинномозговую жидкость, в воротную вену, в головной мозг, в лимфатическую систему, внутриплевральному, ретроорбитальному, внутрикожному введению, введению в селезенку, внутрилимфатическому введению и др.

В контексте настоящего документа термин "место инъекции" не исключительно относится к введению внутри опухоли или внутри органа, такого как почка, печень или поджелудочная железа, или сердце, или легкое, или головной мозг, или селезенка, или глаз, внутримышечному, внутриглазному, внутривитреальному, внутридермальному введению, введению с помощью дермального с помощью кожного пластыря, с помощью пластыря, введению в спинномозговую жидкость, в головной мозг и др.

В контексте настоящего документа термин "лимфодеплеция" не исключительно относится к уменьшению количества лимфоцитов в периферической крови, не вызывая перераспределения лимфоцитов в другой орган, такой как костный мозг, тимус, лимфатические узлы, легкое, или селезенка, или другой орган.

В контексте настоящего документа термин "лимфоабляция" не исключительно относится к снижению количества лимфоцитов в периферической крови до менее 200 на 1 мкл, предпочтительно до менее 100 на 1 мкл, без перераспределения лимфоцитов в другой орган, такой как костный мозг, тимус, лимфатические узлы, легкое, селезенка или другой орган.

В контексте настоящего документа термин "цитотоксическая лимфодеплеция" относится к снижению количества лимфоцитов в периферической крови за счет механизма ADCC, клеточно-опосредованной ци-

тотоксичности или прямого лизиса или цитотоксического уничтожения лимфоцитов, химиотерапии или облучения.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), также называемая антителозависимой клеточной цитотоксичностью, представляет собой механизм клеточной иммунной защиты, посредством которого эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует целевую клетку, мембранные поверхностные антигены которой были связаны специфическими антителами.

В контексте настоящего документа термины "клеточная иммунотерапия", "адаптивная клеточная иммунотерапия", "адаптивная клеточная терапия" (АКТ) или "клеточная иммунотерапия или клеточная терапия" не исключительно относятся к видам лечения, которые включают клетку, используемую для облегчения борьбы иммунной системы с заболеваниями или клетку иммунного происхождения, которая напрямую борется с такими заболеваниями, как рак, аутоиммунные заболевания и инфекции, вызываемые определенными вирусами. Клеточная иммунотерапия может происходить из аутологического или аллогенного источника. В предпочтительных вариантах осуществления адаптивная иммунотерапия, применяемая в способах, раскрываемых в настоящем документе, может представлять собой адаптивную Т-клеточную иммунотерапию, т.е. "Т-клеточную терапию".

Термин "прекондиционирование" относится к подготовке пациента с помощью цитотоксического лимфодеплецирующего средства или нетоксичного лимфодеплецирующего средства к АКТ.

Термин "иммунотерапия", также называемый биологической терапией, в контексте настоящего документа не исключительно относится к типу лечения рака, аутоиммунного заболевания или лечения инфекции, предназначенного для усиления естественной защиты организма для борьбы с раком, аутоиммунным заболеванием или инфекцией. Она использует вещества, произведенные организмом или в лаборатории, для улучшения или восстановления функции иммунной системы. Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, страдающего заболеванием или подверженного риску его возникновения или страдающего рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа. Примеры иммунотерапии включают, но не ограничиваются ею, Т-клеточные виды терапии. Т-клеточная терапия может включать адаптивную Т-клеточную терапию, иммунотерапию инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), аутологическую клеточную терапию, модифицированную аутологическую клеточную терапию (eACT) и аллогенную Т-клеточную трансплантацию. Однако специалисту в данной области техники будет понятно, что способы кондиционирования, раскрываемые в настоящем документе, могут повышать эффективность любой терапии трансплантированными Т-клетками. Примеры Т-клеточных видов терапии описаны в публикациях патентов США № 2014/0154228 и 2002/0006409, патенте США № 5728388 и в международной публикации WO 2008/081035.

В контексте настоящего документа термин "иммунная модуляция" не исключительно относится при раке, аутоиммунном заболевании или инфекции к диапазону видов лечения, направленных на использование иммунной системы пациента для достижения опухолевого, аутоиммунного клеточного или вирусного контроля, стабилизации и потенциального устранения заболевания.

В контексте настоящего документа термин "иммуномодулятор" не исключительно относится к химическому средству (например, дексаметазону) или биологическому средству (например, Хумира® и ритуксимаба), который изменяет иммунный ответ или функционирование иммунной системы (например, путем стимуляции образования антител или ингибирования активности лейкоцитов). Традиционные иммуномодулирующие лекарственные средства, которые являются иммуносупрессорами, не исключительно относятся к глюкокортикоидам, ингибиторам кальциневрина, антиметаболитам и алкилирующим средствам. Антиметаболиты не исключительно относятся к пуриновым аналогам (например, азатиоприну и микофенолята мофетилу) и антагонистам фолиевой кислоты (например, метотрексату и дапсону).

Имуносупрессоры (также называемые иммунодепрессантами) могут представлять собой химические или биологические средства, которые могут подавлять или предупреждать иммунный ответ. Например, антагонисты CD26 и дексаметазон являются иммуносупрессорами. NTLA, применяемые в настоящем изобретении, могут представлять собой иммунодепрессоры NTLA.

Термины "кондиционирование" и "прекондиционирование" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и указывают на подготовку пациента или животного, нуждающегося в Т-клеточной терапии, к подходящему состоянию. В контексте настоящего документа кондиционирование включает, но не ограничивается этим, уменьшение количества зародышевых центров и маргинальных зон, уменьшение количества эндогенных лимфоцитов, устранение цитокиновой утечки, повышение уровня одного или нескольких гомеостатических цитокинов или провоспалительных факторов в сыворотке крови, усиление эффекторной функции Т-клеток, вводимых после кондиционирования, усиление активации и/или доступности антигенпрезентирующих клеток, или любую их комбинацию перед Т-клеточной терапией.

В контексте настоящего документа термин "адаптивная иммунотерапия" или "адаптивная клеточная иммунотерапия" не исключительно относится к иммунным клеткам, которые получены от пациента (аутологические или аутогенные) или донора (аллогенные), родственного или неродственного, и выращенных в лаборатории. Это увеличивает количество иммунных клеток, которые способны уничтожить раковые клетки, клетки, вызывающие аутоиммунные заболевания, или бороться с инфекциями. Эти иммунные

клетки возвращаются пациенту, чтобы облегчить борьбу иммунной системы с заболеванием. Это также называется клеточной адаптивной иммунотерапией. Иммунная клетка может представлять собой Т-клетку и/или другую клетку иммунной системы, не исключительно относящуюся к макрофагам, моноцитам, дендритным клеткам, нейтрофилам, гранулоцитам, фагоцитам, тучным клеткам, базофилам, тимоцитам или врожденным лимфоидным клеткам, или любой их комбинации.

В контексте настоящего документа термин "агонист" не исключительно относится к любому объекту, который активирует конкретный рецептор или нижерасположенный сигнальный путь, необходимый для опосредования эффекта (эффектов) рецептора. Агонисты могут не исключительно относиться, но не ограничиваться ими, к антителам, фрагментам антител, растворимым лигандам, малым молекулам, циклическим пептидам, сшивающим средствам.

В контексте настоящего документа термин "антагонист" не исключительно относится к любому объекту, который нарушает связывание контррецепторной (контррецепторных) структуры (структур) или активации конкретного рецептора или нижерасположенного сигнального пути, необходимого для опосредования эффекта (эффектов) рецептора. Антагонисты могут не исключительно относиться, но не ограничиваться ими, к антителам, фрагментам антител, растворимым лигандам, рецепторам Fc-слияний, химерным рецепторам, малым молекулам, циклическим пептидам, пептидам.

В контексте настоящего документа термин "ингибитор" не исключительно относится к любому объекту, который снижает целевой эффект конкретного рецептора. Ингибиторы могут представлять собой малые молекулы, бессмысловые средства, нуклеиновые кислоты, включая siRNA и microRNA.

В контексте настоящего документа термин "лимфоцит" включает естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (токсичных для клеток) лимфоцитов, которые представляют собой основной компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и клетки, инфицированные вирусами. Это функционирует посредством процесса апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Их назвали "естественными убийцами", поскольку они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточно-опосредованном иммунитете (без участия антител). Их Т-клеточные рецепторы (TCR) дифференцируются самостоятельно из других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, отвечает главным образом за созревание Т-клеток. Существует шесть типов Т-клеток, а именно: Т-хелперы (например, CD4<sup>+</sup> клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксические Т-лимфоциты, CTL, Т-киллерные клетки, цитолитические Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки или Т-киллеры), Т-клетки памяти ((i) стволовые Т scM клетки памяти, как и наивные клетки, представляют собой CD45RO<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> (L-селектин), CD27<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> и IL-7Ra<sup>+</sup>, но они также экспрессируют значительные количества CD95, IL-2R<sup>~</sup>, CXCR3 и LFA-1 и демонстрируют многочисленные функциональные свойства, характерные для клеток памяти); (ii) ТсМ клетки центральной памяти экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFN $\gamma$  или IL-4, и (iii) эффекторные Т EM клетки памяти, однако они не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFN $\gamma$  и IL-4, регуляторные Т-клетки (Treg, супрессорные Т-клетки или CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки), естественные Т-клетки-киллеры (NKT) и Т-клетки гамма-дельта. В-клетки, с другой стороны, играют основную роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). Они вырабатывают антитела и антигены, выполняют роль антигенпрезентирующих клеток (APC) и превращаются в В-клетки памяти после активации в результате взаимодействия с антигенами. У человека незрелые В-клетки образуются в костном мозге, откуда и произошло их название.

Термин "рак" относится к заболеванию, которое характеризуется неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов рака описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п. Термины "опухоль" и "рак" используются в настоящем документе взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные опухоли и опухоли жидких тканей, например, диффузные или циркулирующие опухоли. В контексте настоящего документа термин "рак" или "опухоль" включает предзлокачественные, а также злокачественные виды рака и опухоли.

Конкретный рак может реагировать на химио- или лучевую терапию или рак может быть рефрактерным. Рефрактерный рак относится к раку, который не поддается хирургическому вмешательству, и рак либо изначально не отвечает на химио- или лучевую терапию, либо перестает отвечать на них со временем.

В контексте настоящего документа термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения количества метастазов, увеличения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, увеличения продолжительности жизни или улучшения различных физиологических симптомов, ассоциированных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предупреждению возникновения опухоли, например

вакцине.

В контексте настоящего документа термин "выживаемость без прогрессирования", который может быть сокращен как PFS, относится ко времени от даты лечения до даты прогрессирования заболевания в соответствии с пересмотренными критериями ответа IWG для злокачественной лимфомы или смерти по любой причине.

"Прогрессирование заболевания" оценивается путем измерения злокачественных новообразований на рентгенограммах или другими способами, которые не должны регистрироваться как нежелательные явления. Смерть вследствие прогрессирования заболевания при отсутствии признаков и симптомов должна указываться как первичный тип опухоли (например, DLBCL).

В контексте настоящего документа термин "продолжительность ответа", который может быть сокращен как DOR, относится к периоду времени между первым объективным ответом субъекта и датой подтвержденного прогрессирования заболевания в соответствии с пересмотренными критериями ответа IWG для злокачественной лимфомы или смерти.

Термин "общая выживаемость", который может быть сокращен как OS, определяется как время от даты лечения до даты смерти.

Термины "снижение" и "уменьшение" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и указывают на любое изменение, которое меньше исходного. Термины "снижение" и "уменьшение" представляют собой относительные термины, требующие сравнения между измерениями до и после измерения. Термины "снижение" и "уменьшение" включают полную деплецию.

Термин "лечение" или "осуществление лечения" субъекта относится к любому типу вмешательства или процесса, выполняемых в отношении субъекта, или к введению активного средства субъекту с целью обращения, облегчения, нормализации, ингибирования, замедления или предупреждения начала, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения или состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. В одном варианте осуществления термин "лечение" или "осуществление лечения" включает частичную ремиссию. В другом варианте осуществления термин "лечение" или "осуществление лечения" включает полную ремиссию.

Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или любую их комбинацию альтернатив. В контексте настоящего документа употребление формы единственного числа следует понимать как относящееся к "одному или нескольким" из любого из упомянутых или перечисленных компонентов.

Термины "приблизительно" или "состоящий по сути из" относятся к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется, или определяется, т.е. ограничений системы измерения. Например, термины "приблизительно" или "состоящий по сути из" могут означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы, термины "приблизительно" или "состоящий по сути из" могут означать диапазон до 20% (т.е.  $\pm 20\%$ ). Например, приблизительно 3 мг может включать любое количество от 2,3 до 3,6 мг (в качестве 20%). Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать в пределах порядка величины или в пределах 5-кратного значения. Если в документе и формуле изобретения представлены конкретные значения или составы, если не указано иное, следует предполагать, что значение "приблизительно" или "состоящий по сути из" находится в пределах допустимого диапазона ошибок для этого конкретного значения или состава.

В контексте настоящего документа любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одной десятой и одной сотой части целого числа), если не указано иное.

Диапазоны: различные аспекты настоящего изобретения представлены в формате диапазонов. Описание в формате диапазонов предоставляется для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, диапазон от "от 3 до 12" включает в себя 3,1, 3,2, 3,3 и т.д.

Аутоиммунные нарушения и другие заболевания, которые опосредуются лимфоцитами и которые требуют лечения, более простого и менее дорогостоящего, чем HSCT, связаны, но не ограничиваются, со следующим перечнем: аллергии, астма, остаточный HIV, лимфомы зародышевых центров, такие как лимфома Беркитта и диффузная крупноклеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны, реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), стероид-резистентная GvHD, ахалазия, болезнь Аддисона, болезнь Стилла взрослых, агаммаглобулинемия, очаговая алопеция, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, нефрит с образованием антител к GBM/антител к TBM, антифосфолипидный синдром, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунная дизавтономия, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная крапив-

ница, аксональная и нейрональная нейропатия (AMAN), болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (CD), целиакия, болезнь Шагаса, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Чарджа-Штрауса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцовый пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодových агглютининов, врожденная блокада сердца, миокардит Коксаки, CREST-синдром, болезнь Крона, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптический нейромиелит), дискоидная волчанка, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный фасцит, узловатая эритема, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, синдром Эванса, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Геноха-Шонлейна (HSP), гестационный герпес или пемфигоид беременных (PG), гнойный гидраденит (HS) (инверсное акне), гипогаммаглобулинемия, IgA-нефропатия, IgG4-связанная склерозирующая болезнь, иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ITP), миозит с тельцами включения (IBM), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный диабет (сахарный диабет 1 типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, деревянистый конъюнктивит, линейная IgA дерматоз (LAD), волчанка, хроническая болезнь Лайма, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язва Мурена, болезнь Мухи-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастения гравис, миозит, нарколепсия, неонатальная волчанка, нейромиелит зрительного нерва, нейтропения, глазной рубцовый пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS, паранеопластическая дегенерация мозжечка (PCD), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Персонейджа-Гернера, пузырьчатка, периферическая нейропатия, перивенозный энцефаломиелит, пернициозная анемия (РА), синдром POEMS, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы I, II, III типа, ревматическая полимиалгия, полимиозит, постинфарктный перикардит, постмиокардиотомический синдром, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориазический артрит, истинная эритроцитарная аплазия (PRCA), гангренозная пиодермия, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром скванного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическая офтальмия (SO), артериит Такаюсу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническая пурпура (ТПП), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, сахарный диабет 1 типа, язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго, болезнь Фогта-Коянаги-Харада.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения может потребоваться исключить заболевания, такие как аллергии, астма, остаточный HIV, лимфомы зародышевых центров, такие как лимфома Беркитта и диффузная крупноклеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны, реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), стероид-резистентная GvHD, ахалазия, болезнь Аддисона, болезнь Стилла взрослых, агаммаглобулинемия, очаговая алопеция, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, нефрит с образованием антител к GBM/антител к TBM, антифосфолипидный синдром, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунная дизавтономия, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная крапивница, аксональная и нейрональная нейропатия (AMAN), болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (CD), целиакия, болезнь Шагаса, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Чарджа-Штрауса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцовый пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодových агглютининов, врожденная блокада сердца, миокардит Коксаки, CREST-синдром, болезнь Крона, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптический нейромиелит), дискоидная волчанка, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный фасцит, узловатая эритема, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, синдром Эванса, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Геноха-Шонлейна (HSP), гестационный герпес или пемфигоид беременных (PG), гнойный гидраденит (HS) (инверсное акне), гипо-гамма-глобулинемия, IgA-нефропатия, IgG4-связанная склерозирующая болезнь, иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ITP), миозит с тельцами включения (IBM), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный диабет (сахарный диабет 1 типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, псориаз, псориазический артрит, истинная эритроцитарная аплазия (PRCA), гангренозная пиодермия, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром скванного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическая офтальмия (SO), артериит Такаюсу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническая пурпура (ТПП), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, сахарный диабет 1 типа, язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго, болезнь Фогта-Коянаги-Харада.

ческий васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, деревянистый конъюнктивит, линейная IgA дерматоз (LAD), волчанка, хроническая болезнь Лайма, болезнь Менъера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язва Мурена, болезнь Мухи-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастения гравис, миозит, нарколепсия, неонатальная волчанка, нейромиелит зрительного нерва, нейтропения, глазной рубцовый пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS, паранеопластическая дегенерация мозжечка (PCD), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Персонейджа-Тернера, пузырьчатка, периферическая нейропатия, перивенозный энцефаломиелит, пернициозная анемия (РА), синдром ROEMS, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы I, II, III типа, ревматическая полимиалгия, полимиозит, постинфарктный перикардит, постмиокардиотомический синдром, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориазический артрит, истинная эритроцитарная аплазия (PRCA), гангренозная пиодермия, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром скованного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическая офтальмия (SO), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническая пурпура (ТТР), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, сахарный диабет 1 типа, язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго, болезнь Фогта-Коянаги-Харада.

Дополнительное обсуждение иммунных условий по настоящему изобретению.

Селезенка содержит как белую, так и красную пульпу. Красная пульпа селезенки содержит макрофаги, которые обычно фильтруют и удаляют стареющие или дефектные эритроциты (RBC) и бактерии, покрытые антителами, или эритроциты из кровотока. Белая пульпа селезенки содержит лимфоидные компартменты и имеет решающее значение для иммунного надзора и ответа: она синтезирует антитела против вторгающихся патогенов и высвобождает тромбоциты и нейтрофилы в ответ на кровотечение или инфекцию. Считается, что во время развития селезенка выполняет несколько функций, в том числе является первым очагом кроветворения (на шестой неделе беременности). Доклинические и клинические испытания продемонстрировали, что без цитотоксического химиотерапевтического прекондиционирования клеточные виды иммунотерапии выводятся из кровотока в основном в течение одного часа после введения и накапливаются в селезенке. Цитотоксическое химиотерапевтическое прекондиционирование должно происходить сразу же после введения клеточных видов иммунотерапии для поддержания клеточных видов иммунотерапии в кровотоке, обычно за 48 ч до введения клеточных видов иммунотерапии. Если цитотоксическое химиотерапевтическое прекондиционирование проводят за 4 недели до или во время прекондиционирования, что позволяет восстановить костный мозг, поддерживать клеточные виды иммунотерапии в кровотоке является неэффективным. Ritchie D.S et al. *Mol. Ther.* Nov; 21(11):2122-9 (2013).

Периартериальные лимфоидные муфты (PALS) белой пульпы селезенки заселены в основном Т-клетками, в то время как лимфоидные части заселены преимущественно В-клетками. Зародышевые центры (GC) представляют собой участки в лимфатических узлах или лимфатических узелках в периферических лимфатических тканях и в белой пульпе селезенки, где насыщенные зрелые В-лимфоциты, также известные как центроциты, быстро пролиферируют, дифференцируются, мутируют посредством соматической гипермутации и переключения классов во время ответов антител. Зародышевые центры являются важной частью В-клеточного гуморального иммунного ответа. Они динамично развиваются после активации В-клеток Т-зависимым антигеном. Гистологически GC описывают микроскопически различимые части лимфоидной ткани. Активированные В-клетки мигрируют из первичного очага в фолликулярную систему первичных фолликулов и начинают моноклональную экспансию в среде фолликулярных дендритных клеток (FDC).

После нескольких дней размножения В-клетки мутируют свою ДНК, кодирующую антитела, и таким образом генерируют множество клонов в зародышевом центре. Это включает случайные замены, делеции и вставки вследствие соматической гипермутации. После некоторого неидентифицированного раздражителя со стороны FDC созревающие В-клетки (центробласты) мигрируют из темной зоны в светлую зону и начинают экспонировать свое антитело на свою поверхность и на этой стадии называются центроцитами. Центроциты находятся в состоянии активированного апоптоза и конкурируют за сигналы выживания от FDC, которые презентуют антиген. Считается, что этот процесс восстановления зависит от аффинности антитела к антигену. Затем функциональные В-клетки должны взаимодействовать с Т-хелперами для получения окончательных сигналов дифференцировки. Это также включает переключение изотипа, например, с IgM на IgG. Считается, что взаимодействие с Т-клетками предупреждает образование аутореактивных антител. В-клетки становятся либо плазматической клеткой, распространяющей антитела, либо В-клеткой памяти, которая активируется при последующих контактах с тем же антигеном. Они также могут перезапускать весь процесс пролиферации, мутации и отбора в соответствии с гипотезой рециклинга.

В-клетки, содержащиеся в области белой пульпы селезенки, могут быть далее разделены на опреде-

ленные области, идентифицируемые с помощью окрашивания определенными молекулярными маркерами. Маргинальная зона селезенки содержит нециркулирующие зрелые В-клетки, которые граничат с белой пульпой, создавая разделение между белой и красной пульпой, и экспрессируют высокие уровни CD21 и IgM, CD24 и CD79a, а также измеримые уровни CD9 и CD22. Зона мантии окружает нормальные фолликулы зародышевого центра и экспрессирует CD21, CD23 и CD38. Фолликулярная зона находится внутри зародышевых центров и экспрессирует высокие уровни IgD и CD23, промежуточные уровни CD21 и CD24 и также может быть идентифицирована с помощью окрашиванием PNA. Зародышевый центр лучше всего различается по связыванию с PNA и экспрессирует более высокие уровни CD54, чем фолликулярная зона. Зародышевые центры имеют особую популяцию Т-клеток-хелперов, которые, по-видимому, равномерно распределяются во всех зародышевых центрах. Зародышевые центры традиционно ассоциированы с иммунными ответами, которые требуют Т-клеток-хелперов, хотя это не является абсолютным. В зародышевых центрах происходит мутация гипервариабельных генов и образуются В-клетки, продуцирующие высокоаффинный IgG. Активные зародышевые центры имеют поддающиеся оценке макрофаги и дендритные клетки, экспрессирующие CD21. Фолликулярные центры также можно идентифицировать по экспрессии CD45R (B220) (*Cytotoxicologic Pathology*, 35:366-375, 2007). Фолликулярные центры CD45R обнаруживаются вокруг зародышевых центров, экспрессирующих Bcl6 и Bcl2. *BioEssays*, 29:166-177, 2007; *Cytotoxicol. Pathol.* 34(5):648-655 (2006)].

Ответ на патогены или раковые клетки регулируется сложными взаимодействиями и активностью большого числа различных типов клеток, участвующих в иммунном ответе. Врожденный иммунный ответ является первой линией защиты и возникает вскоре после воздействия патогена. Он осуществляется фагоцитарными клетками, такими как нейтрофилы и макрофаги, цитотоксическими естественными клетками-киллерами (NK) и гранулоцитами. Последующий адаптивный иммунный ответ вызывает антигенспецифические защитные механизмы, и для его развития может потребоваться несколько дней. Типами клеток, играющих важную роль в адаптивном иммунитете, являются антигенпрезентирующие клетки, включая макрофаги и дендритные клетки. Антигензависимая стимуляция всех различных типов клеток, включая субпопуляции Т-клеток, В-клетки и макрофаги, играет решающую роль в защите хозяина. Иммунные клетки не исключительно относятся к В-клеткам, дендритным клеткам, гранулоцитам, врожденным лимфоидным клеткам (ILC), мегакариоцитам, моноцитам/макрофагам, клеткам-супрессорам миелоидного происхождения (MDSC), естественным клеткам-киллерам (NK), тромбоцитам, эритроцитам (RBC), Т-клеткам, тимоцитам.

Zwang et al., (2014) продемонстрировали, что после лимфодеплеции лимфоциты повторно заселяют иммунное пространство за счет усиления тимопоэза и пролиферации остаточных недеплецированных периферических лимфоцитов. Термин "гомеостатическая пролиферация" (альтернативно гомеостатическая экспансия или пролиферация, индуцированная лимфопенией) относится к последнему процессу. Гомеостатическая пролиферация особенно важна для восстановления компартмента лимфоцитов после иммунодеплеционной терапии при трансплантации. Репопуляция лимфоцитов может смещаться в сторону типа эффекторной памяти, способной вызывать отторжение трансплантата, аутоиммунитет или, в случае аллогенной трансплантации костного мозга, реакцию "трансплантат против хозяина".

Два иммунодеплецирующих средства, алемтузумаб и кроличье антитело к тимоцитарному глобулину, хорошо охарактеризованы по своей способности индуцировать фенотип эффекторной памяти в повторно заселяющихся лимфоцитах.

Ранние исследования гомеостатической пролиферации продемонстрировали, что Т-клетки, выживающие при лимфодеплеции, делятся, развивают фенотип и функцию памяти, а затем действуют доминирующим образом, придавая животным устойчивость к толерантности сердечного или почечного аллотрансплантата посредством костимуляторной блокады. [1, 2] В соответствии с этими результатами последние исследования продемонстрировали, что самой лимфопенией достаточно для нарушения стабильной периферической толерантности, основанной на костимулирующей блокаде. [3] В модели трансплантации сердца у мыши при несоответствии МНС, лимфопения (достигаемая либо облучением, либо моноклональными антителами к CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) индуцировала острое отторжение, опосредованное Т- и В-клетками, сопровождающееся сдвигом Т-клеток в сторону фенотипа эффекторной памяти (EM) CD44hi и появлением донор-специфических антител. Процесс гомеостатической пролиферации можно разделить на "медленную" (одно деление клетки за 24-36 ч) или "быструю" (одно деление за 6-8 ч) кинетику. В то время как медленная пролиферация происходит в ответ на "ощущение пустого пространства", быстрая пролиферация представляет собой прежде всего процесс, управляемый антигеном кишечника. [4] Медленная гомеостатическая пролиферация преобладает в гомеостатической пролиферации после лимфодеплеции в моделях у мышей. Кроме того, как Т-, так и В-клетки могут подвергаться гомеостатической пролиферации.

Алемтузумаб (антитело к CD52) представляет собой сильнодействующее средство, вызывающее деплецию лимфоцитов, которое применяли в качестве индукционной терапии при трансплантации и для лечения рассеянного склероза. CD4<sup>+</sup> клетки и в меньшей степени наивные CD8<sup>+</sup> клетки являются наиболее восприимчивыми к лимфодеплеции, индуцированной алемтузумабом. [5-8] Однако более крупная популяция наивных Т-клеток может оставаться недеплецированной, поскольку периферические лимфатические узлы могут быть резервуаром для этих клеток после индукции алемтузумабом. [9] Терапия алемтузумабом

приводит к смещению в сторону фенотипов памяти  $CD4^+$  и  $CD8^+$  у реципиентов почечного трансплантата; реципиенты с признаками отторжения (по результатам биопсии, новым или донорским антителам) после терапии алемтузумабом имеют повышенную долю  $CD8^+$  эффекторных клеток памяти ( $CD45RO^+CD62L^-$ ) [10]. Эти же самые пациентов дополнительно имеют сниженную частоту регуляторных Т-клеток (Treg) среди  $CD4^+$  клеток. В то же время в другой работе, наоборот, предполагали повышенную частоту появления Foxp3<sup>+</sup> клеток после индукции алемтузумабом. [11] Возможно, что в этом случае экспрессия Foxp3 может быть только временным маркером активации Т-клеток. [12-14] Среди пациентов с рассеянным склерозом гомеостатическая пролиферация после терапии алемтузумабом приводит к восстановлению высокоактивированной, пролиферативной, олигоклональной и подобной фенотипу памяти популяции  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток. [15] В частности, в пуле  $CD8$  доминирует терминально дифференцированная эффекторная популяция  $CD28^+CD57^+CD8$  памяти, экспрессирующая перфорин и гранзим В. Известно, что такая популяция ассоциирована с аутоиммунитетом, и, действительно, в этом исследовании с участием 87 пациентов у двух третей развился (в основном, тиреоидный) аутоиммунитет.

В недавнем исследовании кинетики деплеции лимфоцитов после введения гАТГ в качестве индукционной терапии при трансплантации почек обнаружили, что гАТГ вызывает длительную деплецию компартмента Т-клеток до уровня ниже 250  $CD3^+$  клеток/мкл через шесть месяцев по сравнению с минимальной деплецией Т-клеток после применения базиликсимаба или без индукционной терапии. [19] В отличие от предыдущих исследований, в этом недавнем исследовании не обнаружили увеличения тимопоэза (т.е.  $CD31^+$  клеток среди  $CD4^+$  или  $CD8^+$  клеток) через месяц после индукции гАТГ. Скорее всего периферическая опосредованная цитокинами передача сигналов с участием IL-7 и IL-15 посредством Stat5 увеличивалась в первый месяц после терапии гАТГ, особенно среди субпопуляций Т-клеток памяти. Эти исследования указывают на то, что восстановление Т-клеток после АТГ происходит скорее за счет периферических пулов Т-клеток, чем за счет повышенного тимопоэза.

У человека, в отличие от мышей, большая часть пролиферирующих Т-клеток происходит из периферии, а не из тимуса [20]. Следовательно, передача сигналов с участием периферических цитокинов важна для поддержания состояния лимфодеплеции и повторного заселения компартмента Т-клеток при лимфопении. IL-7 представляет собой основной цитокин, ответственный за гомеостатическую пролиферацию Т-клеток. У молодых людей, подвергшихся тимэктомии, и пожилых людей уровни циркулирующего IL-7 выше, чем у здоровых контролей. [21] IL-7 у этих пациентов с низкой функцией тимуса или с ее отсутствием, по-видимому, стимулирует пролиферацию Т-клеток посредством передачи сигналов с участием STAT5. Сам IL-7 был описан в качестве "пускового устройства" для поддержания компартмента Т-клеток [22]. При лимфопении избыток IL-7 стимулирует пролиферацию Т-клеток. Пролиферирующие Т-клетки потребляют IL-7 и его уровни падают до исходного состояния по мере повторного заселения компартмента Т-клеток. Этот механизм предупреждает избыточную пролиферацию и сохраняет гомеостаз Т-клеток. В недавнем исследовании обнаружили, что индуцированная IL-7 пролиферация требует прерывистой (а не непрерывной) передачи сигналов и что участие TCR обеспечивает это прерывание. [23] Т-клетки с недостаточным'affинностью к периферическим (собственным) лигандам TCR погибают после продолжительной передачи сигналов с участием IL-7; этот механизм поддерживает популяцию Т-клеток с соответствующей'affинностью к собственным лигандам. В дополнение к IL-7, передача сигналов с участием IL-15 важна для выживания и пролиферации  $CD8^+$  Т-клеток. [24-26] В то время как IL-15 усиливает гомеостатическую пролиферацию  $CD8^+$  клеток памяти, одного IL-15 недостаточно для гомеостатической пролиферации наивных  $CD8$  Т-клеток. [27] В наивных  $CD8^+$  клетках участие MHC I также необходимо для гомеостатической пролиферации. [28] Новые данные демонстрируют, что  $CD4^+$  клетки памяти также могут отвечать на IL-15. [29-31] Наконец, TGB-Р может ослаблять передачу сигналов с участием IL-15 и выступать в качестве препятствия гомеостатического аутоиммунитета, обусловленного пролиферацией [32-37].

Продукт гена протеинтирозинфосфатазы RPTN2, который ослабляет передачу сигналов с участием TCR в  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клетках, вовлечен в аутоиммунитет человека. [38, 39] Нокаут RPTN2 в Т-клетках на модели у мыши приводил к более быстрой индуцированной лимфопенией пролиферации  $CD8^+$  по сравнению с контрольными животными. Адаптивный перенос  $CD8^+$  клеток с делецией RPTN2 конгенным хозяевам приводил к дифференцировке по типу эффектора/памяти и аутоиммунитету по сравнению с адаптивным переносом контрольных  $CD8^+$  клеток. [40] Этот ответ не зависел от IL-7. miRNA-181a усиливает передачу сигналов с участием TCR, частично за счет подавления экспрессии другими протеинфосфатазами. [41] Таким образом, miRNA-181 или другая miRNA может ингибировать экспрессию RPTN2 и тем самым подавлять индуцированную лимфопенией пролиферацию. Было высказано предположение, что факторы транскрипции могут регулировать способность гемопоэтических стволовых клеток повторно заселять компартмент лимфоцитов. Например, передача сигналов с участием Nohx4 может способствовать фенотипу центральной памяти  $CD4^+$  ( $CD44hiCD62L^+$ ) гемопоэтических стволовых клеток в ответ на лимфопению. [42] В экспериментах по конкурентному адаптивному переносу клетки центральной памяти дикого типа в восстановление лимфоидных органов. Наконец, интегрин CD18 (антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов, или LFA-1) участвует в перемещении наивных Т-клеток между кишечником и вторичными лимфоидными органами [43, 44] и участвует в аутоиммунитете кишечника. 45 Адаптивный перенос  $CD4^+CD18^{-/-}$  клеток к

Rag<sup>-/-</sup> хозяевам продемонстрировал потребность в CD18 как для быстрой, так и для медленной пролиферации, индуцированной лимфопенией. [46] Вышеупомянутые исследования продемонстрировали важность отличных от цитокиновых регуляторов гомеостатической пролиферации, которые вызывают смещение к фенотипу эффекторной памяти при гомеостатической пролиферации.

Другой потенциальный подход к преодолению гомеостатической пролиферации в качестве барьера для трансплантации заключается в удалении потенциально патологических CD8<sup>+</sup> клеток, особенно у реципиентов трансплантата. Yamada et al. применили этот подход с использованием mAb к CD8 во время лимфодеплеции в модели смешанного химеризма трансплантации почек при несоответствии МНС у отличных от человека приматов; [54] их результаты о снижении ответов Tmem у деплецированных по CD8 животным являются перспективными. Та же группа впоследствии изучала алефасепт, гибридный белок внеклеточной CD2-связывающей части молекулы адгезии человеческого лейкоцитарного функционального антигена-3 (LFA-3). [55] Считается, что это средство прерывает пролиферацию цитотоксических эффекторных Т-клеток памяти, блокируя взаимодействие между CD2<sup>+</sup> клетками эффекторной памяти и LFA-3. Терапия алефасептом при псориазе преимущественно вызывала деплецию CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти, что коррелировало с клиническим улучшением кожных поражений. [56] Алефасепт преимущественно и обратимо вызывал деплецию CD8<sup>+</sup> эффекторных (CD28<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>) клеток памяти в модели трансплантации у отличных от человека приматов [57]; CD28<sup>-</sup> клетками в этой модели выступали CD2hi, что помогает объяснить способность алефасепта преимущественно вызывать деплецию CD8<sup>+</sup> клеток.

Посттрансплантационное введение циклофосфида является перспективным подходом к предупреждению GVHD за счет деплеции аллореактивных CD8<sup>+</sup> клеток, которые в противном случае могли бы выжить при индукционной терапии. [58, 59] Недавние данные указывают на то, что посттрансплантационное введение циклофосфида в первую очередь нацелено на быстро делящиеся аллоспецифические клетки, сравнительно сохраняющиеся наивные клетки, необходимые для поддержания иммунокомпетентности после HSCT. [60] CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg, по-видимому, являются устойчивыми к циклофосфиду и быстро восстанавливаются после индукции циклофосфидом при аллогенной трансплантации костного мозга. [61] Сохранение Treg может частично лежать в основе механизма, с помощью которого циклофосфид предупреждает GVHD.

Thangavelu et al., (2005) продемонстрировали длительную выраженную CD4<sup>+</sup> Т-лимфопению у пациентов с ревматоидным артритом (РА) после терапии на основе деплеции лимфоцитов. Слабое восстановление могло быть результатом либо снижения продуцирования de novo Т-клеток тимусом, либо недостаточной периферической экспансии остаточных Т-клеток. Интерлейкин-7 (IL-7), как известно, стимулирует тимус продуцировать новые Т-клетки и способствует экспансии циркулирующих зрелых Т-клеток, тем самым играя критическую роль в Т-клеточном гомеостазе. В настоящем исследовании мы продемонстрировали снижение уровней циркулирующего IL-7 в кросс-секционном исследовании пациентов с РА. Продуцирование IL-7 культурами стромальных клеток костного мозга также была нарушена при РА. Для исследования того, может ли такая недостаточность IL-7 объяснять пролонгированную лимфопению, наблюдаемую при РА после терапевтической лимфодеплеции, сравнили пациентов с РА и пациентов с солидными видами рака, получавших высокодозную химиотерапию и трансплантацию аутологических клеток-предшественников. Химиотерапия вызвала у всех пациентов одинаковую лимфопению, однако она сохранялась у пациентов с РА через 12 месяцев по сравнению с восстановлением, которое происходило у пациентов, больных раком, через 3-4 месяца. Обе группы продуцировали наивные Т-клетки, содержащие Т-рецепторные эксцизионные кольца. Основной отличительной характеристикой между группами была неспособность вызывать экспансию периферических Т-клеток при РА, в частности, клеток памяти, в течение первых 3 месяцев после лечения. Наиболее важным является то, что отсутствовало повышение уровней IL-7 в сыворотке крови при РА по сравнению с четырехкратным повышением у контрольных лиц без РА во время лимфопении. Таким образом, наши данные предполагают, что пациенты с РА имеют относительную недостаточность IL-7 и что эта недостаточность, вероятно, является важным фактором, способствующим слабому восстановлению Т-лимфоцитов при РА после терапевтической лимфодеплеции. Кроме того, у пациентов с РА со стабильным, хорошо контролируемым заболеванием уровни IL-7 положительно коррелировали с содержанием Т-рецепторных эксцизионных колец Т-клеточных CD4<sup>+</sup>, демонстрируя прямое влияние IL-7 на активность тимуса в этой когорте.

### Примеры

Следующие примеры демонстрируют, что агонисты глюкокортикоидных рецепторов в высоких дозах могут вызывать почти полную лимфодеплецию лимфоцитов периферической крови, а также уменьшать количество зародышевых центров в лимфоидных органах и вызывать деплецию лимфоцитов тимуса. Эти эффекты достигаются без существенного влияния на количество нейтрофилов, тромбоцитов, эритроцитов и стволовых клеток (как HSC, так и MSC).

Эти примеры также демонстрируют, что этот профиль лимфодеплеции агонистов глюкокортикоидов в высоких дозах аналогичен профилю стандартных режимов химиотерапии (на основе циклофосфида (Cy) и флударабина (Flu)), но не вызывает ассоциированной потери массы тела (общий показатель токсичности таких химиотерапевтических режимов).

Таким образом, высокие дозы агонистов глюкокортикоидов представляют собой отличный от миело-

аблативного режим, который может приводить к "иммунологической перезагрузке" с эффективностью, сопоставимой с химиотерапией, но без ассоциированной токсичности. Соответственно, агонисты глюкокортикоидных рецепторов в высоких дозах представляют собой перспективную терапию для применения в лечении заболеваний, опосредованных иммунными клетками, такими как лимфоциты.

Пример 1. Иммуносупрессорное уменьшение вторичных и первичных лимфатических областей.

Дексаметазон в острых высоких дозах может также называться в настоящем документе Dex, AugmenStem™, PlenaStem™ или AVM0703.

В случае мышей самцам мышей внутрибрюшинно вводили дексаметазона фосфат натрия в дозе 114,6 мг/кг основания дексаметазона (9,32 мг/кг HED) в 0-й день и умерщвляли через 96 ч после инъекции дексаметазона. Мышей умерщвляли обескровливанием и затем вымывали остаточные клетки крови с помощью 5U гепарина/мл PBS ретроградным промыванием в грудную яремную вену. Селезенки удаляли, взвешивали во влажном состоянии и затем фиксировали в 10% растворе формалина. Впоследствии селезенки разделяли запатентованными способами и затем инкубировали с FITC-PNA при 4°C в течение 24 ч, промывали, помещали на предметные стекла и получали иммунофлуоресцентные изображения. Программное обеспечение MetaMorph использовали для количественной оценки иммунофлуоресцентного сигнала. Изображения образцов и результаты, нормализованные по отношению к площади селезенки, изображены на фиг. 1.

Контрольные мыши имели значительную иммунофлуоресценцию FITC-PNA, в то время как мыши, которым вводили дексаметазона фосфат натрия, почти не имели иммунофлуоресцентного сигнала. FITC-PNA маркирует зародышевые центры, которые не исключительно связаны с селезенкой и лимфатическими узлами. Этот пример демонстрирует способность дексаметазона в высоких дозах уменьшать количество зародышевых центров (GC) в лимфоидных органах, что может устранять аутореактивную иммунологическую память. Уменьшение количества зародышевых центров в лимфоидных органах также может заставить передвигаться раковые клетки (например, лимфомы зародышевых центров) или остаточные HIV-инфицированные Т-клетки, которые связываются с нишами в этих центрах, в кровотоке, где они могут быть устранены иммунной системой или стандартными видами терапии.

На фиг. 2 изображена доза-ответ дексаметазона в острых высоких дозах (в HED) в отношении количества зародышевых центров в селезенке мышей. Уменьшение зародышевых центров заметно при 6 мг/кг HED, но не снижается значимо до доз 9 и 12 мг/кг HED.

Крысам HED дексаметазона вводили от 3,23, 6,45 до 12,9 мг/кг (дозы для крыс 20, 40 и 80 мг/кг) (в/в или п/о) для определения ингибирования GC и маргинальной зоны через 48 ч. У крыс доза 12,9 мг/кг HED Dex максимально ингибировала как GC, так и количество и площадь маргинальных зон, как изображено на фиг. 3 и 4. Фиксированные формалином селезенки разрезали на 5 частей, обрезали и заливали парафином, разделяли и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Измерения диаметра периартериолярной лимфоидной муфты (PAL) и ширины маргинальной зоны (MZ) в областях белой пульпы, которые имели PAL с наибольшим диаметром, проводили с помощью окулярного микрометра. Иммуногистохимическое окрашивание с помощью BCL-6 в селезенке крыс оценивали для определения площади GC с использованием способов автоматического анализа изображений.

Дексаметазон в острых высоких дозах также снижал массу и объем тимуса (фиг. 5). В случае мышей самцам мышей перорально вводили носитель или дексаметазона фосфат натрия в дозе 3, 6, 9 и 12 мг/кг HED основания дексаметазона в исходный 0-й день и умерщвляли через 48 ч после обработки дексаметазоном. Мышей умерщвляли обескровливанием и затем вымывали остаточные клетки крови с помощью 5U гепарина/мл PBS ретроградным промыванием в грудную яремную вену. Тимус у каждой мыши удаляли, взвешивали во влажном состоянии, отображали в виде массы тимуса/масса тела.

Пример 2. Иммуносупрессорная лимфодеплеция у мышей и крыс через 24-48 ч после острого введения дексаметазона, обладающего свойствами сохранения нейтрофилов, эритроцитов, тромбоцитов и стволовых клеток.

Предварительные исследования с повышением дозы, проведенные на экспериментальных моделях мышей и крыс, продемонстрировали, что введение дексаметазона в высоких дозах приводило к полной лимфодеплеции (фиг. 11, справа). Высокие дозы дексаметазона были способны индуцировать ~98% снижение популяции CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Treg и В-клеток, измеряемое через 48 ч после введения, поддерживая быструю абляцию аутоиммунных патофизиологических субстратов. Проверка на ранней стадии продемонстрировала, что дексаметазон в острых высоких дозах имеет период полураспада 2-3 часа, в соответствии с фармакокинетическими и фармакодинамическими данными период полувыведения составляет 4-5 дней, что исключает длительное подавление иммунитета. Кроме того, пероральное введение дексаметазона в острых высоких дозах имеет эффекты, сопоставимые с в/в введением, что поддерживает применение дексаметазона в острых высоких дозах в качестве единственного перорального лечения.

Как продемонстрировано на фиг. 6, в/в или п/о введение дексаметазона в дозе 20 мг/кг (3,2 HED), 40 мг/кг (6,5 HED) или 80 мг/кг (12,9 HED) самцам крыс Lewis с массой тела 250-300 г значимо снижает количество лимфоцитов при всех дозах по сравнению с плацебо через 48 ч после введения. В отличие от этого, как изображено на фиг. 7, количество нейтрофилов не уменьшалось при введении дексаметазона в острых высоких дозах. Фактически количество нейтрофилов увеличивается при введении всех доз декса-

метазона, вероятно, за счет демаргинационного эффекта. Обработка дексаметазоном не влияла на эритроциты, тромбоциты, Hct, Hgb.

Острое пероральное введение дексаметазона самцам мышей C57B1 в дозе 3 мг/кг HED (n=4), 6 мг/кг HED (n=6), 9 мг/кг (n=4), 12 мг/кг (n=4), 15 мг/кг (n=4) или 17,5 мг/кг (n=4) по сравнению с плацебо (n=7) снижало количество CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 65% и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 75% (фиг. 8), снижало количество CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 56% и Treg на 78% (фиг. 9), снижало количество естественных клеток-киллеров (NK) на 87% и В-лимфоцитов на 83% (фиг. 10), снижало абсолютное количество лимфоцитов на 84%, но способствовало сохранению нейтрофилов (фиг. 11), эритроцитов (фиг. 12) и тромбоцитов (фиг. 13). Кровь брали для проведения полного биохимического анализа крови (СВС) и проточной цитометрии через 24-48 ч после введения дексаметазона через желудочный зонд. В дозах более 12 мг/кг HED у нормальных мышей наблюдали почти полную лимфоабляцию. У опухоленесущих мышей доза, близкая к полной лимфоабляционной дозе, будет составлять более 6 мг/кг HED.

Дексаметазон в острых высоких дозах активирует апоптоз, опосредованный рецепторами, посредством каспазного пути и приводит к лимфодеплекции или лимфоабляции всех лимфоцитов в зависимости от применяемой дозы. Как и ожидалось вследствие его рецептор-опосредованного действия, дексаметазон индуцирует лимфодеплекцию с сохранением нейтрофилов, тромбоцитов и эритроцитов (RBC) благодаря отсутствию или благодаря различным глюкокортикоидным рецепторам на этих клетках. При применении высоких доз дексаметазона наблюдали тенденцию к увеличению количества нейтрофилов по сравнению с плацебо как в периферической крови, так и в костном мозге, что поддерживает возможную защиту от инфекций во время лимфодеплекционных видов лечения.

Примечательно, что высокие дозы дексаметазона значительно не изменяли количество гемопоэтических стволовых клеток у мышей (фиг. 13). Таким образом, отличный от миелоаблативного режим, представленный дексаметазоном в острых высоких дозах, может устранять необходимость переливаний стволовых клеток для восстановления кроветворения после иммунологической перезагрузки.

Пример 3. Иммуносупрессорная лимфодеплекция у человека через 36-48 ч после острого введения дексаметазона, обладающего свойствами сохранения нейтрофилов, эритроцитов, тромбоцитов и стволовых клеток.

Проводили острое пероральное введение 3 мг/кг эквивалента основания дексаметазона (все введенные дозы в этих примерах представляли собой эквивалент основания дексаметазона) четырем пациентам, трем с остеоартритом коленного сустава и одному с аневризмой аорты. Кровь брали до лечения препаратом и через 48 ч после лечения для анализа СВС и проточной цитометрии для определения лимфоцитов и других популяций клеток крови. Сыворотку крови анализировали в отношении уровня цитокинов. У одного пациента СВС до лечения не получали, и, таким образом, нормализованные данные проточной цитометрии изображены только для 3 пациентов. Исходя из ненормализованных данных проточной цитометрии только 2 из 4 пациентов отвечали на дексаметазон лимфодеплекцией (фиг. 14-16), в то время как 2 из 4 пациентов продемонстрировали ответ в виде лимфоцитоза в CD3 и CD4 лимфоцитах и 1 из 4 пациентов продемонстрировал ответ в виде лимфоцитоза в CD8, В-лимфоцитах и NK-клетках на эту дозу дексаметазона. У 3 из 4 пациентов наблюдали повышенные уровни IL-2, а у 4 из 4 - повышенные уровни IL-15 через 48 ч после острого перорального введения основания дексаметазона (3 мг/кг) (фиг. 17). Уровень IL-6, цитокина, который, как известно, является основным фактором синдрома высвобождения потенциально фатальных цитокинов (CRS), не был повышен ни у одного пациента. На основании ответа в виде лимфоцитоза, наблюдаемого у 2 из 4 пациентов, не больных раком, при дозе 3 мг/кг, предпочтительные лимфодеплекционные дозы будут составлять 3 мг/кг или выше, исходя из повышенной чувствительности опухоленесущих мышей к дексаметазону, где самая низкая летальная доза составляла 43 мг/кг HED у опухоленесущих мышей по сравнению с 114 мг/кг HED у здоровых мышей (Scorza Barcellona, 1984).

Костный мозг отбирали через 48 ч после введения дексаметазона, и количество мезенхимальных стволовых клеток (MSC) определяли с помощью анализа колониеобразующей активности фибробластов (CFU-F). Пероральное введение основания дексаметазона в дозе 3 мг/кг повышало количество MSC костного мозга (BM) гребня подвздошной кости почти в два раза (фиг. 18). Способность к трехлинейной дифференцировке MSC BM также определяли в исследовании у лошадей. Доза 6 мг/кг HED приводила к удвоению количества стволовых клеток MSC BM грудины через 48 ч после введения в/в инфузии лошадям в течение одного часа, но не изменяло способность MSC к трехлинейной дифференцировке в направлении остеоцитов, хондроцитов или адипоцитов.

Пример 4. Сравнение острой дозы 12 и 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона со стандартным режимом химиотерапии Су (циклофосфамидом) и Flu (флударабином).

Основание дексаметазона вводили через желудочный зонд взрослым самцам мышей в дозе 12 или 17,5 мг/кг HED во -2-й день. Другой группе мышей Су вводили в/б в дозе 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5- и -4-й дни и флударабин в дозе 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-, -4-, -3-, -2-й дни. Третьей группе мышей Су вводили в/б в дозе 166 мг/кг (500 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-й день и флударабин в дозе 10 мг/кг (30 мг/м<sup>2</sup> HED) в -5-й день, затем вводили 12 или 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона перорально во -2-й день. Результаты СВС и проточной цитометрии изображены на фиг. 19-24, а массы тела изображены на фиг. 25.

Доза 12 или 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона, вводимая за 12-72 ч до забора крови, приводит

ла к сопоставимому профилю лимфодепрессии по сравнению со стандартным 2-дневным введением Су с 4-дневным введением Flu, как и комбинация однократного введения Су в -5-й день и однократного введения Flu в -5-й день с 12 мг/кг HED дексаметазона во 2-й день (фиг. 23). Однократную дозу Су и однократную дозу Flu можно вводить в -6-, -4- или -3-й дни с одинаковым эффектом. Профиль лимфодепрессии одного дексаметазона может быть предпочтительным, потому что абсолютное количество лимфоцитов не подвергаются депрессии так значительно, как при введении СуFlu, и степень лимфодепрессии может быть связана с нейроэдемой, когда адаптивную клеточную терапию вводят после СуFlu.

Стандартный повторный режим СуFlu значительно снижал массу тела в качестве общего показателя токсичности, в то время как доза 12 мг/кг или 17,5 мг/кг HED основания дексаметазона не влияла на массу тела. Комбинация однократной дозы Су и однократной дозы Flu в -5-й день с 12 мг/кг HED дексаметазона влияла на массу тела значимо меньше, чем стандартный режим СуFlu, в то время как комбинация однократной дозы Су и однократной дозы Flu в -5-й день с 17,5 мг/кг HED дексаметазона не влияла на массу тела (фиг. 25). Это демонстрирует, что дексаметазон в острых высоких дозах имеет профиль лимфодепрессии, эквивалентный стандартной химиотерапии на основе циклофосфида (Су) и флударабина (Flu), но без ассоциированной с этим потери массы тела, что подтверждает безопасность состава дексаметазона по сравнению с химиотерапией.

Кроме того, в двойном слепом контролируемом испытании у лошадей с введением дексаметазона в острых высоких дозах в течение 70 дней не наблюдали никаких побочных эффектов.

Данные, собранные к настоящему времени, предполагают, что дексаметазон в острых высоких дозах имеет профиль безопасности, соответствующий профилю безопасности одобренных препаратов DSP. Предлагаемые дозы дексаметазона в острых высоких дозах (3-18 мг/кг HED) эквивалентны или меньше кумулятивных доз DSP, которые безопасно и эффективно применяют для пульс-терапии ежедневно в течение 5 дней для различных состояний, и DSP хорошо переносился при клиническом применении в пульс-терапии по инициативе врача (Han et al., 2014; Annane et al., 2004; Ayache et al., 2014). Предварительное исследование, проведенное на небольшом количестве пациентов-людей с остеоартритом, продемонстрировало, что дексаметазон в острых высоких дозах повышает уровни цитокинов IL-2 и IL-15 в плазме крови, не влияя на концентрацию провоспалительных цитокинов (например, IL-6), как заметно после режимов химиотерапии (US9855298B2). Полный анализ клинических биохимических показателей у мышей, обработанных дексаметазоном в острых высоких дозах в возрастающих дозах HED (6-12 мг/кг), продемонстрировал, что острые пероральные дозы безопасны и не повышают уровни клинических биохимических показателей за пределы нормального диапазона, включая холестерин и общий белок. Более того, несмотря на то, что было продемонстрировано, что хронические низкие дозы DSP вызывают нежелательные побочные явления, включая прибавку массы тела и повышение уровня глюкозы (Ferris & Kahn, 2012), уровень глюкозы после введения дексаметазона в острых высоких дозах, как было обнаружено, не превышал нормальный диапазон. В целом, лимфодепрессивная активность дексаметазона в острых высоких дозах и его безопасный профиль значительно поддерживают его применение в качестве лечения для иммунологической перезагрузки аутоиммунных заболеваний с эффективностью, сравнимой с химиотерапией.

Другие стандартные химиотерапевтические схемы, которые можно вводить в виде однократной (однократных) дозы (доз) в -1-, или -2-, или -3-, или -4-, или -5-й день и комбинировать с дексаметазоном от приблизительно 3 до приблизительно 12 мг/кг во -2-й день, включают Су 120 мг/кг и Flu 75 мг/м<sup>2</sup>; 30 мг/м<sup>2</sup> Flu и 50 мг/кг Су и 200 cGy TBI; Су 1500 мг/м<sup>2</sup> и бендамустин 120 мг/м<sup>2</sup>; Су от приблизительно 300 до приблизительно 2300 мг/м<sup>2</sup>; Flu от приблизительно 10 до приблизительно 900 мг/м<sup>2</sup>; Су 600 мг/м<sup>2</sup> и Flu 30 мг/м<sup>2</sup>; бусульфан, мелфалан и Flu; бусульфан (доза корректируется в зависимости от массы тела), тиотепа (10 мг/кг) и флударабин (160 мг/м<sup>2</sup>); Flu 30 мг/м<sup>2</sup>, Су 300 мг/м<sup>2</sup> и менса 300 мг/м<sup>2</sup>; Flu 30 мг/м<sup>2</sup>, Су 60 мг/м<sup>2</sup> и алемтузумаб 0,2 мг/кг.

Пример 5. Лечение пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Пациента с аутоиммунным заболеванием, таким как, но не ограничиваясь ими, SLE, псориаз, ревматоидный артрит, псориазический артрит, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз, синдром Шегрена, склеродермия, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, целиакия, болезнь Аддисона, миастения гравис, аутоиммунный гепатит, антифосфолипидный синдром, билиарный холангит, можно лечить глюкокортикоидным иммуносупрессором или дозой дексаметазона. Дозы дексаметазона в острых высоких дозах (в виде основания) находятся в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 24 мг/кг, при этом предпочтительные дозы составляют от приблизительно 9 до приблизительно 18 мг/кг.

Количества В-лимфоцитов снижаются более чем на 90% при введении доз дексаметазона в острых высоких дозах, а поскольку В-клетки памяти составляют примерно 50% компартмента В-клеток у людей старше 20 лет, популяции В-клеток памяти также сокращаются на более чем 90%. Аутоиммунные атакующие В-клетки пациента подвергались апоптозу, и у пациента прекращаются активные атаки на собственный иммунитет. Физические симптомы пациента улучшаются или исчезают. Ремиссия аутоиммунного заболевания длится неопределенно долго у большинства пациентов, однако в случае рецидива можно вводить повторную дозу глюкокортикоидного иммуносупрессора, дозы дексаметазона или антагонист CD26. При необходимости повторные виды лечения можно проводить не реже одного раза в месяц, но предпочтительно не чаще одного раза в год и наиболее предпочтительно не чаще одного раза в 5 лет.

Пример 6. Лечение остаточного HIV.

Пациента с остаточным HIV лечили глюкокортикоидным иммуносупрессором или дексаметазоном. Дозы дексаметазона в острых высоких дозах (в виде основания) находятся в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 24 мг/кг, при этом предпочтительные дозы составляют от приблизительно 9 до приблизительно 18 мг/кг. Лечение устраняет ниши в селезенке, где находится HIV и отправляет инфицированные Т-клетки в кровоток, где они могут быть уничтожены стандартными видами терапии HIV, которые включают антиретровирусные препараты, включая, помимо прочего, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NTRI), нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), ингибиторы протеазы (PI), ингибиторы слияния и проникновения, фармакокинетические усилители и ингибиторы переноса цепи интегразы (INSTI).

Пример 7. Лечение лимфомы зародышевого центра, например лимфомы Беркитта.

Пациента с лимфомой зародышевого центра, такой как, но без ограничения ими, лимфома Беркитта или диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), лечат глюкокортикоидным иммуносупрессором или дексаметазоном. Дозы дексаметазона в острых высоких дозах (в виде основания) находятся в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 24 мг/кг, при этом предпочтительные дозы составляют от приблизительно 9 до приблизительно 18 мг/кг. Лечение устраняет ниши в селезенке, где лимфомы зародышевого центра связываются, и отправляет клетки в кровоток, где они могут быть устранены более полно или более низкими дозами стандартной химиотерапии, такой как R-CHOP, или антителами к CD20, такими как ритуксан, бексар или зевалин, или антителами к CD22 или CD70, такими как лимфоцид или ворсетузумаб, мафодотин, или ингибиторами Bcl-2, такими как облимерсен натрия, АВТ-737 (пероральная форма навитоклак, АВТ-263) или фенретинид, или ингибиторами Syk, такими как фостаматиниб или таматиниб, или ингибиторами протеасом, такими как бортезомиб (велкейд) или COMPADME, CODOX-M/IVAC. Снижается частота рецидивов и увеличивается выживаемость без рецидивов.

Пример 8. Преобразование дозы дексаметазона в эквивалентную дозу другого глюкокортикоида.

Для расчета эквивалентной дозы для другого глюкокортикоида дозу дексаметазона вводят в общедоступный калькулятор преобразования глюкокортикоидов, предпочтительно по адресу <http://www.medcalc.com>. Затем определяют общую дозу, исходя из периода полувыведения глюкокортикоида. Например, 3-12 мг/кг дексаметазона преобразуется в 19-75 мг/кг преднизона. Поскольку биологический период полувыведения преднизона составляет приблизительно 20 ч, а биологический период полувыведения дексаметазона составляет от 36 до 54 ч, то преднизолон будет вводиться от 19 до 75 мг/кг каждые 24 ч в качестве эквивалентной биологической дозы.

Пример 9. Лечение пациентов с аутоиммунными заболеваниями преднизолоном.

Пациента с аутоиммунным заболеванием, таким как, но не ограничиваясь ими: SLE, псориаз, ревматоидный артрит, псориатический артрит, сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, синдром Шегрена, склеродермия, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, целиакия, болезнь Аддисона, миастения гравис, аутоиммунный гепатит, антифосфолипидный синдром, билиарный холангит, можно лечить преднизолоном в острых высоких дозах. Дозы преднизона в острых высоких дозах находятся в диапазоне от приблизительно 19 до приблизительно 150 мг/кг, при этом предпочтительные дозы составляют от приблизительно 56 до приблизительно 112 мг/кг, с повторным (вторым) введением этой дозы через 24 ч и, необязательно, повторным (третьим) введением этой дозы через 48-72 ч после начальной дозы.

Количества В-лимфоцитов снижаются более чем на 90% при введении доз преднизона в острых высоких дозах, а поскольку В-клетки памяти составляют примерно 50% компартмента В-клеток у людей старше 20 лет, популяции В-клеток памяти также сокращаются более чем на 90%. Аутоиммунные атакующие В-клетки пациента подвергались апоптозу, и у пациента прекращаются активные атаки на собственный иммунитет. Физические симптомы пациента улучшаются или исчезают. Ремиссия аутоиммунного заболевания длится неопределенно долго у большинства пациентов, однако в случае рецидива можно вводить повторную дозу преднизона. При необходимости повторные виды лечения можно проводить не реже одного раза в месяц, но предпочтительно не чаще одного раза в год и наиболее предпочтительно не чаще одного раза в 5 лет.

Пример 10. Сравнение 15 мг/кг HED основания дексаметазона со стандартным режимом химиотерапии.

Предыдущие исследования продемонстрировали, что стандартный режим химиотерапии агрессивной неходжкинской лимфомы имеет значительные виды токсичности в модели В-клеточной лимфомы A20 у мыши (Bascus et al., 2016).

Стандартный режим химиотерапии у пациентов с агрессивной NHL, а также наиболее часто применяемый режим для вялотекущей NHL представляет собой комбинацию циклофосфида, доксорубина, винкристина и преднизона/стероидов (CHOP), вводимых каждый 21 день в течение 6-8 циклов. Bascus et al. (2016) оценивали эффективность и токсичность CHOP в модели В-клеточной лимфомы A20 у мыши.

В исследовании Bascus et al. (2016) в экспериментах *in vivo* использовали самок мышей BALB/c в возрасте 8-10 недель. Животных содержали в условиях цикла свет/темнота 12:12 ч в стойках с фильтрованным воздухом, где пищу и воду предоставляли *ad libitum*. Клеточная линия A20 происходила из В-лимфоцитов встречающейся в природе ретикулярно-клеточной саркомы от старой мыши BALB/cAnN и

ее получали из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США). В каждом цикле химиотерапии использовали следующие дозы: циклофосфамид 100 мг/кг в/б, доксорубин 6 мг/кг в/б, винкристин 0,1 мг/кг в/б и дексаметазон 0,2 мг/кг в/б. На 25-й день после имплантации опухоли (p.t.i.) группы мышей (n=9), которым инокулировали клеточную линию A20, обрабатывали либо одним циклом химиотерапии (СНОР×1), либо двумя циклами химиотерапии (СНОР×2), либо PBS в качестве контроля и контролировали рост опухоли. Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) измеряли каждые 2-3 дня. Для оценки токсичности *in vivo* измеряли массу тела до и после введения СНОР.

В настоящем исследовании мышей содержали, инокулировали и обрабатывали так же, как описано в исследовании Bascus et al. (2016). Мышей обрабатывали либо 15 мг/кг HED основания дексаметазона, либо PBS в качестве контроля и наблюдали за ростом опухоли. Введение дексаметазона проводили в дозе 15 мг/кг HED в 7-, 10-, 18-, 23-, 24-, 28-, 35- и 42-й дни после инокуляции опухолевых клеток A20 2M. Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) измеряли каждые 2-3 дня. Для оценки токсичности *in vivo* измеряли массу тела до и после введения дексаметазона.

Эффективность 15 мг/кг HED основания дексаметазона по сравнению с контролем СНОР и PBS изображена на фиг. 26. Как можно заметить на фиг. 26, эффективность 15 мг/кг HED основания дексаметазона является более высокой, чем 1 цикла СНОР, но не так эффективной, как 2 циклов СНОР с точки зрения контроля объема опухоли.

Однако фиг. 27 демонстрирует, что доза 15 мг/кг HED основания дексаметазона имеет благоприятный профиль токсичности по сравнению с 2 циклами СНОР. Снижение массы тела, наблюдаемое у мышей, получавших 2 цикла СНОР (фиг. 27В), является намного более высоким, чем наблюдаемое для мышей, обработанных 15 мг/кг HED основания дексаметазона (фиг. 27А). Кроме того, 18% мышей, обработанных 2 циклами СНОР, погибали в результате обработки СНОР, тогда как ни одна мышь не погибла в результате обработки дексаметазоном. Таким образом, можно сделать вывод, что дексаметазон может быть таким же эффективным, как и традиционное химиотерапевтическое лечение, без ассоциированных с ним видов токсичности.

Результаты статистического анализа дозы 15 мг/кг HED основания дексаметазона по сравнению с контролем PBS изображены на фиг. 28А. Они демонстрируют значимую разницу объема опухоли во многих временных точках во время исследования, при этом мыши, обработанные дексаметазоном, имели значительно уменьшенный объем опухоли.

Пример 11. Сенсibilизация к химиотерапии.

Этот пример демонстрирует, что терапия глюкокортикоидами снижает дозу, необходимую для эффективной химиотерапии.

Модель В-клеточной лимфомы A20 у мыши использовали по сути, как описано в примере 10, но с самцами, а не самками мышей. Мышей инокулировали в 0-й день. Мыши, обработанные только PBS ("контроль") или 15 мг/кг HED основания дексаметазона в 11- и 14-й дни ("AVM0703"), демонстрировали рост опухоли с высокой скоростью роста через 20 дней (см. фиг. 29). "Комбинированная терапия" представляла собой введение 15 мг/кг HED основания дексаметазона в 11-й день с последующим введением терапии Су/Flu (13,5 мг/кг HED циклофосфамида и 0,8 мг/кг HED флударабина) в 14-й день с устойчивым снижением в объеме опухоли, который через 24 и 26 дней уменьшался в той же степени, что и размер опухоли у мышей, обработанных двумя введениями химиотерапии Су/Flu (13,5 мг/кг HED циклофосфамида и 0,8 мг/кг HED флударабина) в 11- и 14-й дни (фиг. 29). У субъектов, обработанных либо комбинированной терапией, либо двойной дозой Су/Flu, через 14 дней наблюдали уменьшение объема опухоли.

Пример 12. Опухолевая селективность глюкокортикоида при лимфоме.

Этот пример демонстрирует, что введение высокой дозы дексаметазона предпочтительно влияет на раковые клетки.

Модель В-клеточной лимфомы A20 у мыши использовали по сути, как описано в примере 10, но с самцами, а не самками мышей. Мышей инокулировали в 0-й день и обрабатывали либо PBS (плацебо), либо 15 мг/кг HED дексаметазона в 28-й день.

Содержание клеток измеряли с использованием анализатора общего анализа крови (анализатор CBC), и результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исследование	1907100234 7/10/2019	1907100232 7/10/2019	1907100231 7/10/2019	1907100230 7/10/2019
Обработка	15 мг/кг дексаметазона		Плацебо	
ID животного	12	7	4	1
Лейкоциты	860	1150	2170	1,7
Эритроциты	9,32	9,76	8,90	8,87
HGB	14,8	15,2	13,8	14,0
HCT	44,3	47,6	42,3	42,4
MCV	47,5	48,8	47,6	47,8
MCH	15,9	15,6	15,5	15,7
MCHC	33,5	31,9	32,7	32,9
Тромбоциты	423	402	496	764
NEU%	70	44	27	23
LYM%	30	53	68	76
MON%	0	3	4	0
EOS%	0	0	1	1
BAS%	0	0	0	0
NEUCT	550	280	488	391
LYMCT	134	683	1473	1292
MONCT	10	35	23	0
EOSCT	158	92	86	17
BASCT	38	57	21	0
Meta%	0	0	0	0
NRBC	0 *	0 *		
RETIC	н.	н.	н.	н.
Комментарии	Невозможно получить точное количество тромбоцитов в связи с агглютинацией. 50 подсчетов отдельных видов клеток.	Невозможно получить точное количество тромбоцитов в связи с агглютинацией. Присутствует полихромазия, которая находится в пределах нормы для этого вида.	Невозможно получить точное количество тромбоцитов в связи с агглютинацией. Присутствует полихромазия, которая находится в пределах нормы для этого вида.	Невозможно получить точное количество тромбоцитов в связи с агглютинацией. Присутствует полихромазия, которая находится в пределах нормы для этого вида.
PTR	н.	н.	н.	н.
GLU	155	133	112	132
BUN	29	28	31	24
CRE	0,5	0,5	0,5	0,5
CA	9,9	10,0	8,6	9,1
PHOS	10,7	9,2	7,7	7,7
TP	5,5	5,4	4,3	4,4
ALB	3,6	3,3	2,8	3,0
GLO	1,9	2,1	1,5	1,4
A/G	1,9	1,6	1,9	2,1
TBIL	0,2	0,1	0,1	0,1
ALP	37	72	78	75
GGT	0	0	0	0
ALT	94	74	41	31
AST	250	267	196	120
CHOL	231	208	112	106

Данные, представленные в табл. 2, подтверждают обнаружение повышенной чувствительности к дексаметазону опухоленесущих мышей (обсуждается в настоящем документе; см., например, пример 3). У опухоленесущих мышей не наблюдается периферической лимфодеплеции, поскольку дексаметазон, по видимому, абсорбируется опухолью. В отличие от этого, у здоровых мышей наблюдается лимфодеплеция. Это указывает на то, что дексаметазон оказывает прямое действие на опухоль, повышая вероятность глубокой лимфодеплеции в опухоли и, таким образом, приводя к лучшему профилю нацеливания на опухоль

для видов терапии глюкокортикоидами в высоких дозах, описанных в настоящем документе. Дексаметазон является более специфичным к лимфоцитам, инфильтрирующим опухоль (ТИЛ), чем к периферическим лимфоцитам, при исследовании опухоленесущих мышей.

Пример 13. Опухолевый ответ на лечение возрастающими дозами глюкокортикоидов.

Целью этого исследования была оценка влияния различных доз дексаметазона на опухоли. После подтверждения опухоли у 10-недельных мышей BALB/c, мышей рандомизировали с помощью Excel на четыре группы с примерно эквивалентными средними объемами опухолей. Мышам вводили 6 мг/кг HED дексаметазона еженедельно, 15 мг/кг HED дексаметазона еженедельно или 21 мг/кг HED дексаметазона еженедельно в течение четырех циклов (по 5 мышей в каждой группе введения). Мышей считали находящимися в конечной точке и умерщвляли, когда опухоли достигли объема 1500 мм<sup>3</sup>, используя опубликованную формулу  $V=L \times W^2 \times 0,5$ . Как изображено на фиг. 30, возрастающие дозы дексаметазона снижают среднее количество клеток на плотность опухоли.

Список литературных источников.

Выше цитируется ряд публикаций для более полного описания и раскрытия настоящего изобретения и уровня техники, к которому настоящее изобретение относится. Полные ссылки на эти литературные источники приведены ниже:

Aker, A. M. *et al.* Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. *Environ. Res.* 151, 30–37 (2016)

Alexander, T. *et al.* Hematopoietic stem cell therapy for autoimmune diseases - Clinical experience and mechanisms. *J. Autoimmun.* 92, 35–46 (2018)

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90 (2014)

American Diabetes Association. Type 1 Diabetes. (2018)

Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michels, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* 383, 69–82 (2014) autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*; 1:147–153 (2001)

Autoimmune disease: Updates from Europe and the United States. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(1 Suppl): S48–S56. doi:10.1016/j.bbmt.2009.10.034 (2010)

Baraldo, S., Kim Lokar Oliani, Graziella Turato, Renzo Zuin and Marina Saetta, “ The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD”, *Current Medicinal Chemistry* 14: 2250. (2007)

Bascus T., Moreno M., Mónaco A., Reyes L, Paolino A., Oliver P., Kramer M.G., Engler H., Pacheco J.P., Grille S., Chabalgoity J. A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario. *J Transl Med.* 2016 Nov 22;14(1):323

Bone, R. N. & Evans-Molina, C. Combination Immunotherapy for Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 17, 50 (2017)

Broder, M. S. *et al.* The Cost of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in the United States. *Am. Heal. drug benefits* 10, 366–374 (2017)

Burger, J. A. & Montserrat, E., Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling; *Blood* 2013 vol. 121 no. 9 1501-1509, doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-452607> (2013)

*Burkitt's Lymphoma National Treatment Guidelines.* Health, IMA World. 2009

Burkit, D. *A sarcoma involving the jaws in African children.* *The British Journal of Surgery.*, Vols. 46 (197): 218–23 (1958)

Cantu-Rodriguez, O. G. *et al.* Long-Term Insulin Independence in Type 1 Diabetes Mellitus Using a Simplified Autologous Stem Cell Transplant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 2141–2148 (2016)

Couri, C. E. B., Malmegrim, K. C. R. & Oliveira, M. C. New Horizons in the Treatment

of Type 1 Diabetes: More Intense Immunosuppression and Beta Cell Replacement. *Front. Immunol.* 9, 1086 (2018)

Daikeler, T., Tichelli, A. & Passweg, J. Complications of autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with autoimmune diseases. *Pediatr. Res.* 71, 439–444 (2012)

Darbre, P. D. & Harvey, P. W. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J. Appl. Toxicol.* 34, 925–938 (2014)

DeFranco, A. L. Germinal centers and autoimmune disease in humans and mice. *Immunol. Cell Biol.* 94, 918–924 (2016)

Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of in vivo hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on in vitro expression of lymphocyte function. *Clinical and Experimental Immunology*; 24(1):54-62 (1976)

Flammer, J. R. & Rogatsky, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 25, 1075–1086 (2011)

Henig, I. & Zuckerman, T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med. J.* 5, e0028 (2014)

Kim, J. H., Jin, S.-M., Kim, H. S., Kim, K.-A. & Lee, M.-S. Immunotherapeutic treatment of autoimmune diabetes. *Crit. Rev. Immunol.* 33, 245–281 (2013)

Loh, Y. *et al.* Development of a secondary autoimmune disorder after hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: role of conditioning regimen used. *Blood* 109, 2548–2643 (2007)

Lu, Y., Suzuki, J., Guillioli, M., Umland, O., & Chen, Z. Induction of self-antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the periphery by lymphodepletion treatment with anti-mouse thymocyte globulin in mice. *Immunology* 134, 50-59 (2011)

Magdalena, W. *et al.* Lack of persistent remission following initial recovery in patients with type 1 diabetes treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Diabetes Res. Clin. Pract.* (2018). doi:10.1016/j.diabres.2018.07.020

Malmegrim, K. C. R. *et al.* Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* 8, 167 (2017)

Medicines Agency, E. Benzyl alcohol and benzoic acid group used as excipients. (2017)

Menke, A. *et al.* The prevalence of type 1 diabetes in the United States. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 24, 773–774 (2013)

Orem, J., *et al.* *Burkitt's Lymphoma in Africa, a Review of the Epidemiology and Etiology.* s.l. : African Health Sciences, Vols. 7.3: 166–175 (2007)

Pallera, A. M. & Schwartzberg, L. S. Managing the toxicity of hematopoietic stem cell transplant. *J. Support. Oncol.* 2, 223-228-247 (2004)

Pasricha, J. Current regimen of pulse therapy for pemphigus: Minor modifications, improved results. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 74;3, pp217-221 (2008)

Patt H, Bandgar T, Lila A, Shah N. Management issues with exogenous steroid therapy. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism.* 17(Suppl 3):S612-S617. doi:10.4103/2230-8210.123548 (2013)

Peng, B.-Y. *et al.* Addressing Stem Cell Therapeutic Approaches in Pathobiology of Diabetes and Its Complications. *J. Diabetes Res.* 2018, 7806435 (2018)

Ponchel *et al.*, Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Res Ther*, 7:R80-R92 (DOI 10.1186/ar1452) (2005)

Savage, J. H., Matsui, E. C., Wood, R. A. & Keet, C. A. Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 453–60.e7 (2012)

Serafin, V., Capuzzo, G., Milani, G., Minuzzo, S. A., Pinazza, M., Bortolozzi, R., Bresolin, S., Porcù, E., Frasson, C., Indraccolo, S., Basso, G., & Accordi, B. Glucocorticoid resistance is reverted by LCK inhibition in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 130(25), 2750-2761 (2017)

Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic

Snarski, E. *et al.* Immunoablation and autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of new-onset type 1 diabetes mellitus: long-term observations. *Bone Marrow Transplant.* 51, 398–402 (2016)

Spanier, A. J., Fausnight, T., Camacho, T. F. & Braun, J. M. The associations of triclosan and paraben exposure with allergen sensitization and wheeze in children. *Allergy asthma Proc.* 35, 475–481 (2014)

Sullivan, K., Muraro, P., & Tyndall, A. Hematopoietic cell transplantation for

Swart, J. F. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 13, 244–256 (2017)

Thomas SL, Griffiths C, Smeeth L, Rooney C, Hall AJ. Burden of Mortality Associated With Autoimmune Diseases Among Females in the United Kingdom. *American Journal of Public Health.* 100(11):2279-2287. doi:10.2105/AJPH.2009.180273 (2010)

Thangavelu G1, Parkman JC, Ewen CL, Uwiera RR, Baldwin TA, Anderson CC. Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis. *Arthritis Res Ther.* 7(1):R80-92. (2005)

U.S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. *Pharmacology and Toxicology* July (2005)

Voltarelli, J. C. *et al.*, Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 297, 1568–1576 (2007)

Yan, SX *et al.*, Prednisone treatment inhibits the differentiation of B lymphocytes into plasma cells in MRL/MpSlac-lpr mice, *Acta Pharmacologica Sinica* volume 36, pages 1367–1376 (2015)

Zwang Homeostatic expansion as a barrier to lymphocyte depletion strategies *Curr Opin Organ Transplant.* August ; 19(4): 357–362 (2014)

Пронумерованные абзацы.

Следующие пронумерованные абзацы, описывающие аспекты предложений, являются частью настоящего описания.

1. Фармацевтическая композиция, содержащая глюкокортикоид, для применения в лечении лимфоцит-опосредованного заболевания у субъекта, для которой лечение включает введение дозы фармацевтической композиции пациенту для доставки глюкокортикоида в дозе, пересчитанной приблизительно на 3-26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED), при этом фармацевтическая композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, консервантов и/или хелатирующих средств.

2. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 1, для которой лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

3. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 1, для которой заболевание, опосредованное лимфоцитами, представляет собой связанные с HIV остаточные явления заболевания.

4. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 1, для которой лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой лимфому зародышевого центра.

5. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 1, для которой лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина".

6. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 1, для которой лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аллергическое нарушение, необязательно при этом аллергическое нарушение представляет собой астму.

7. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 2, для которой аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из сахарного диабета I типа, рассеянного склероза, латерального амиотрофического склероза, склеродермии, пузырчатки и волчанки.

8. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, при этом фармацевтическая композиция содержит консервант, при этом консервант представляет собой сульфит.

9. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, при этом фармацевтическая композиция содержит хелатирующее средство, при этом хелатирующее средство представляет собой ЭДТА.

10. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, в которой глюкокортикоид представляет собой дексаметазон, необязательно при этом дексаметазон выбирают из группы, состоящей из основания дексаметазона, дексаметазона фосфата натрия и дексаметазона ацетата.

11. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с абзацем 10, в которой дексаметазон представляет собой дексаметазона фосфат натрия.

12. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, для которой доза фармацевтической композиции представляет собой однократную острую дозу или суммарную дозу, вводимую в течение приблизительно 72-часового периода.

13. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, при этом фармацевтическую композицию вводят в виде внутривенной (в/в) или пероральной дозы, необязательно при этом внутривенную или пероральную дозу вводят в виде однократной в/в или пероральной дозы.

14. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, при этом фармацевтическая композиция представляет собой водный раствор глюкокортикоидов.

15. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, при этом фармацевтическую композицию вводят в дозе, эквивалентной по меньшей мере приблизительно 4 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 6 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 7 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 8 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 9 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 11 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 12 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 15 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 18 мг/кг или по меньшей мере приблизительно 24 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED).

Настоящее изобретение следует толковать со ссылкой на формулу изобретения, которая приводится ниже.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической композиции, содержащей глюкокортикоид, для лечения лимфоцит-опосредованного заболевания у субъекта, причем лечение включает введение дозы фармацевтической композиции пациенту для доставки глюкокортикоида в дозе, пересчитанной на 6-26 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED),

при этом фармацевтическая композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, консервантов и/или хелатирующих средств, и

при этом лимфоцит-опосредованное заболевание выбрано из аутоиммунного заболевания, рака, связанных с HIV остаточных явлений заболевания, реакции "трансплантат против хозяина" и аллергического нарушения.

2. Применение фармацевтической композиции по п.1, в котором лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аллергическое нарушение, которое представляет собой астму.

3. Применение фармацевтической композиции по п.1, в котором лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой рак, который представляет собой лимфому зародышевого центра.

4. Применение фармацевтической композиции по п.1, в котором лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой рак, который представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

5. Применение фармацевтической композиции по п.1, в котором лимфоцит-опосредованное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, латерального амиотрофического склероза, склеродермии, пузырчатки и волчанки.

6. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическая композиция содержит консервант, при этом консервант представляет собой сульфит.

7. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическая композиция содержит хелатирующее средство, при этом хелатирующее средство представляет собой ЭДТА.

8. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором глюкокортикоид представляет собой дексаметазон, необязательно при этом дексаметазон выбран из группы, состоящей из основания дексаметазона, дексаметазона натрия фосфата и дексаметазона ацетата.

9. Применение фармацевтической композиции по п.8, в котором дексаметазон представляет собой дексаметазона натрия фосфат.

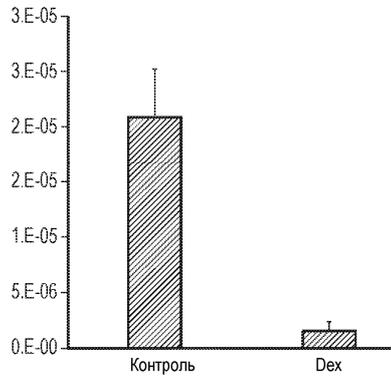
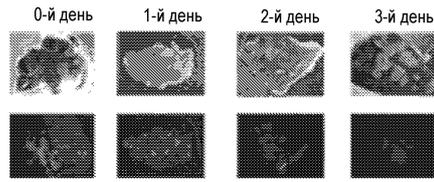
10. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором доза фармацевтической композиции представляет собой однократную нагрузочную дозу или суммарную дозу, вводимую в течение 72-часового периода.

11. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическую композицию вводят в виде внутривенной (в/в) или пероральной дозы, необязательно при этом внутривенную или пероральную дозу вводят в виде однократной в/в или пероральной дозы.

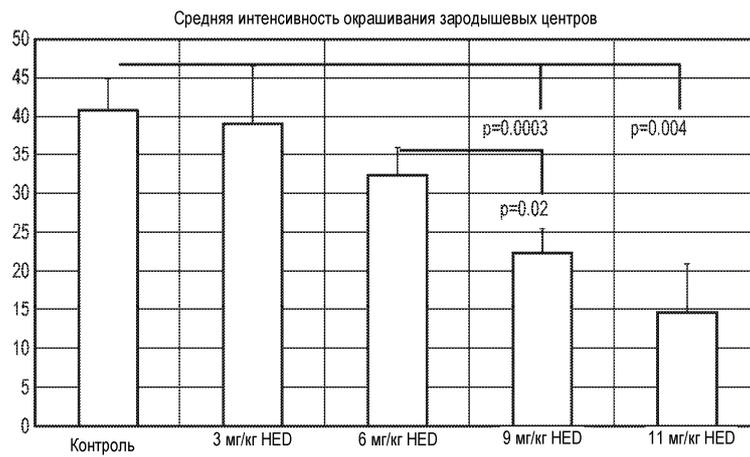
12. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическую композицию вводят в виде однократной в/в дозы в течение 0,25-2 ч.

13. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическая композиция представляет собой водный раствор глюкокортикоидов.

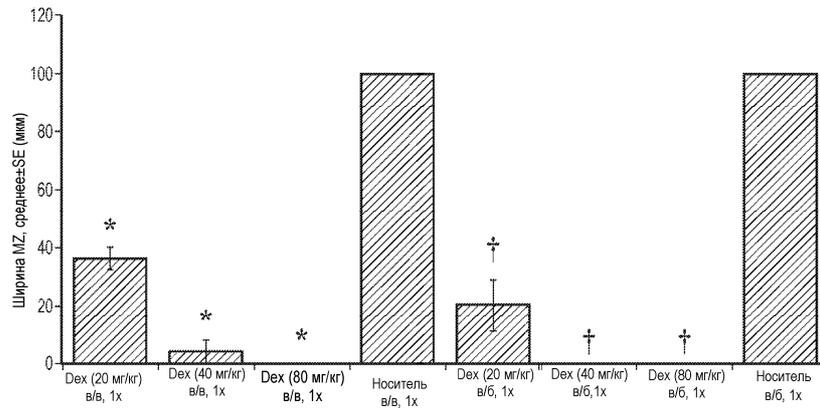
14. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, в котором фармацевтическую композицию вводят в дозе, пересчитанной по меньшей мере на 7 мг/кг, по меньшей мере 8 мг/кг, по меньшей мере 9 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 11 мг/кг, по меньшей мере 12 мг/кг, по меньшей мере 15 мг/кг, по меньшей мере 18 мг/кг или по меньшей мере 24 мг/кг эквивалентной дозы основания дексаметазона для человека (HED).



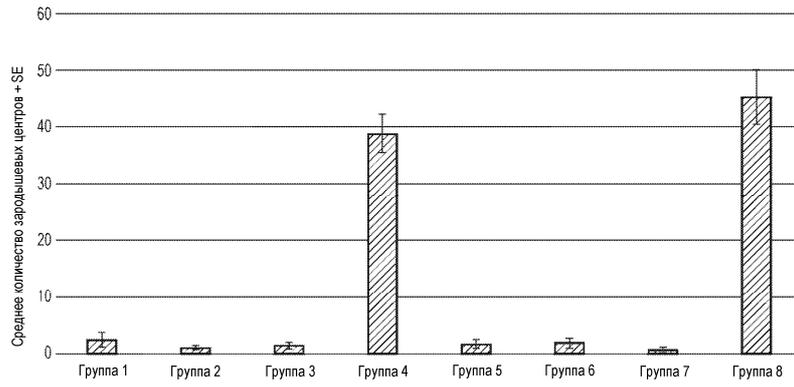
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

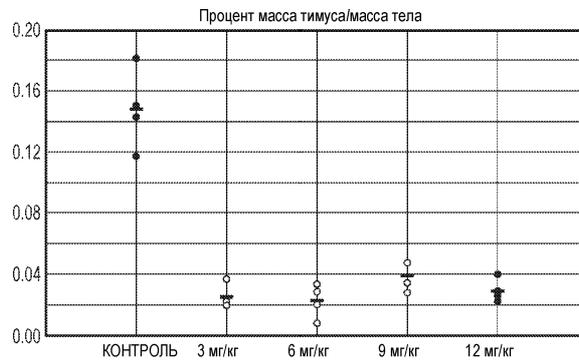


Фиг. 4

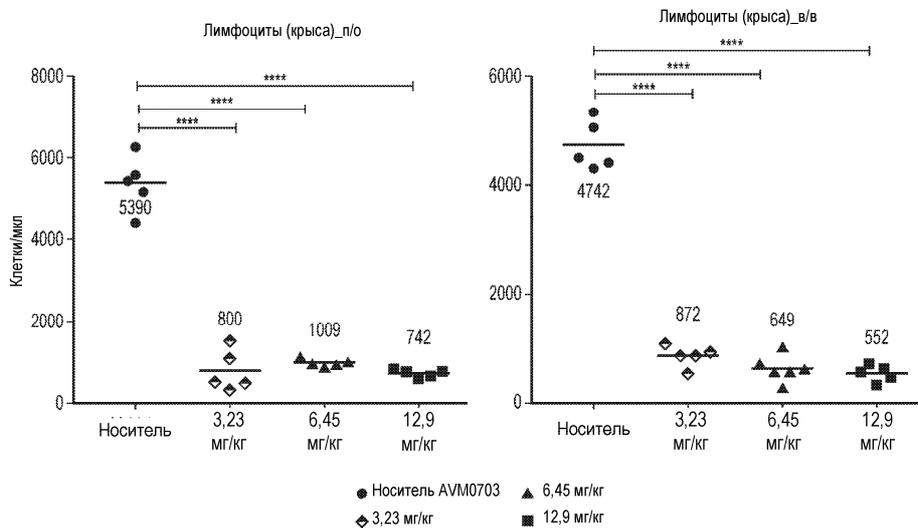
Тимус: Плацебо x 1 группа обработки



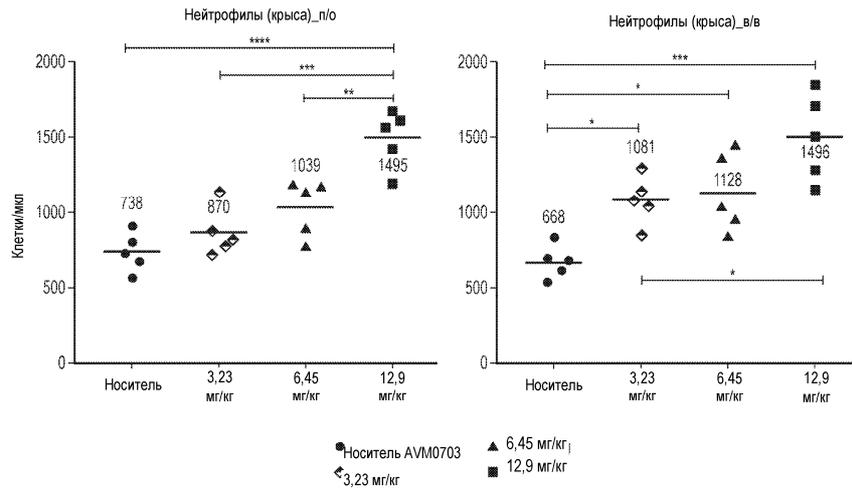
Тимус: 6 мг/кг АVM0703 x 1 группа обработки



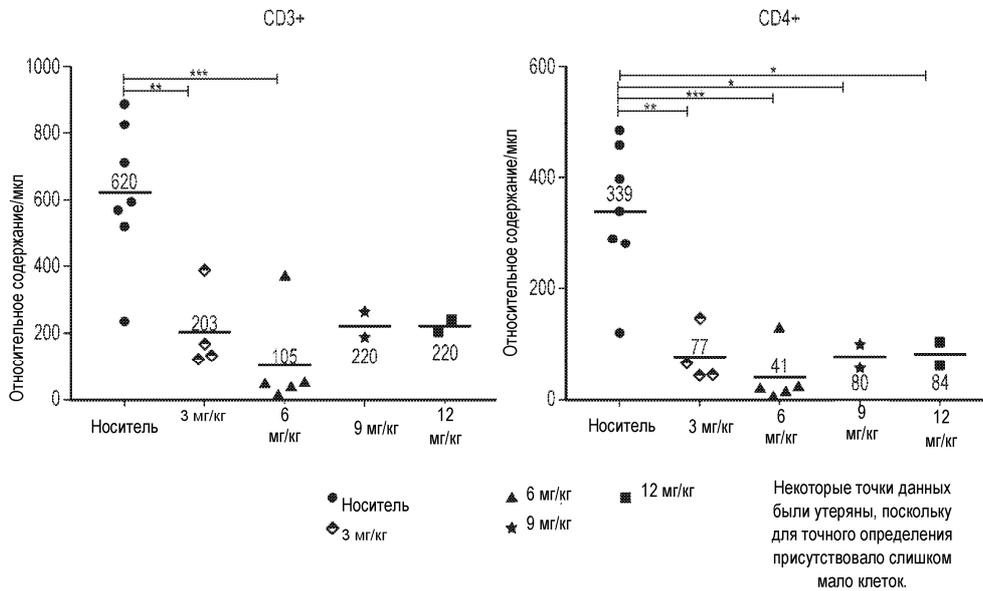
Фиг. 5



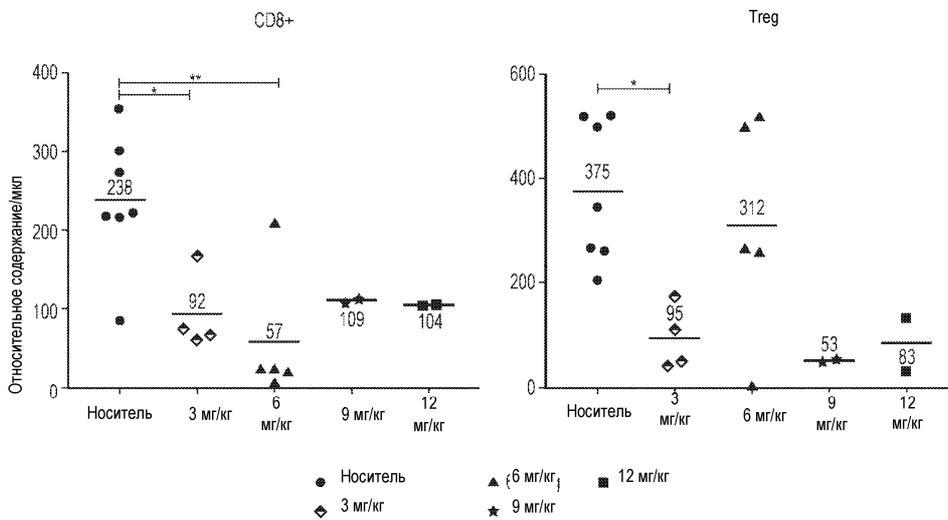
Фиг. 6



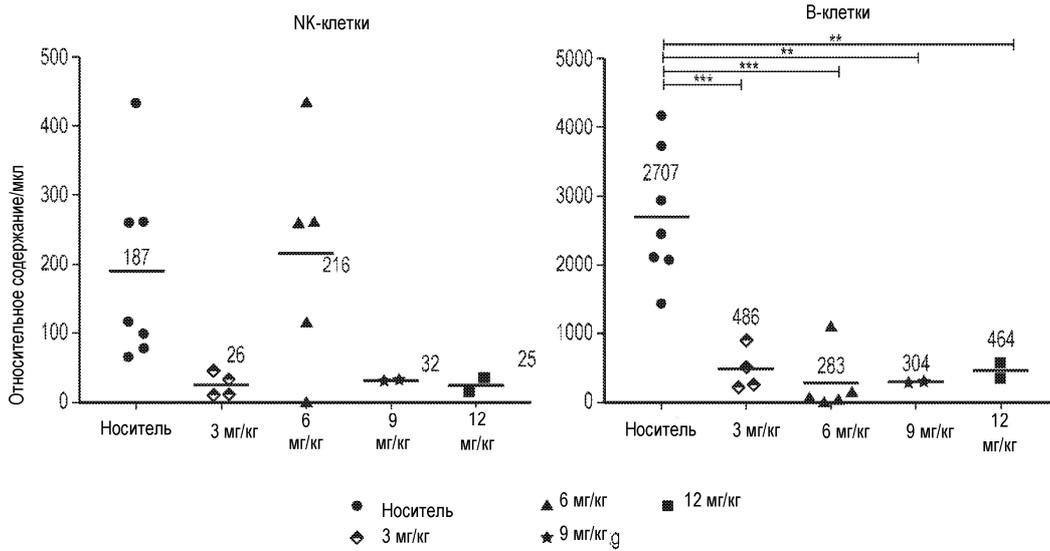
Фиг. 7



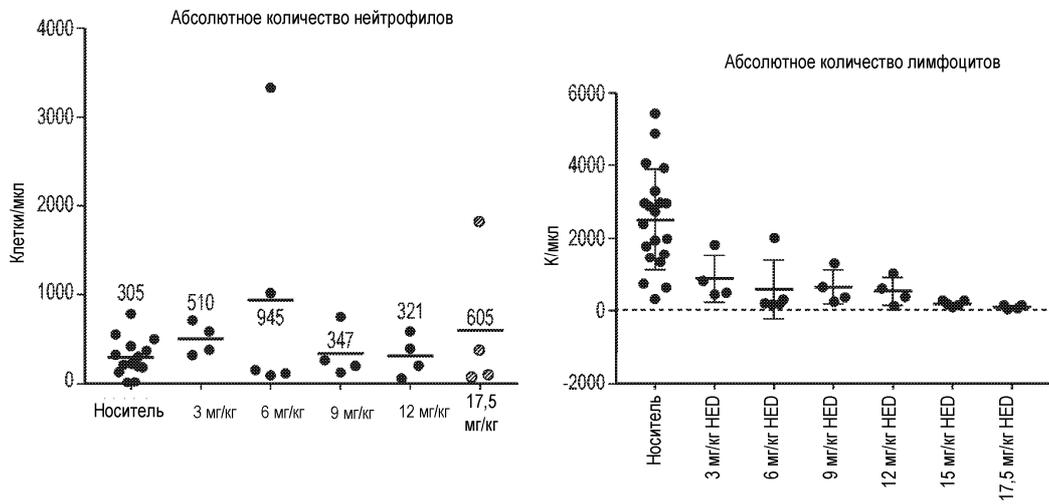
Фиг. 8



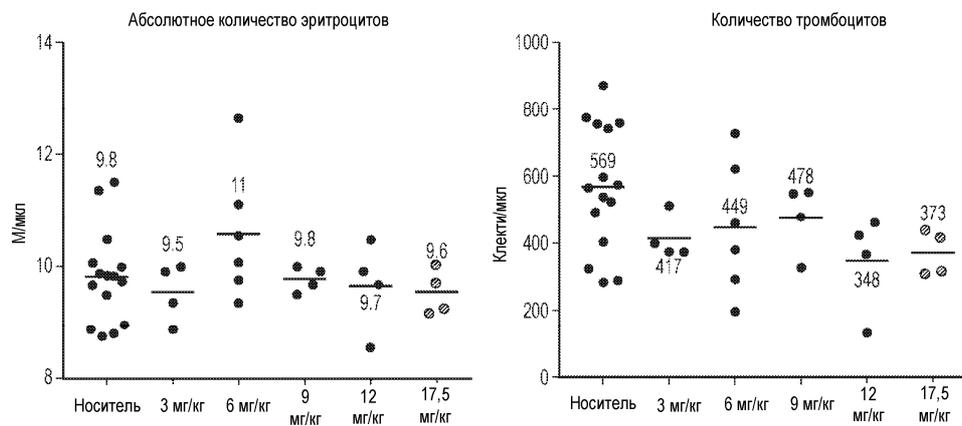
Фиг. 9



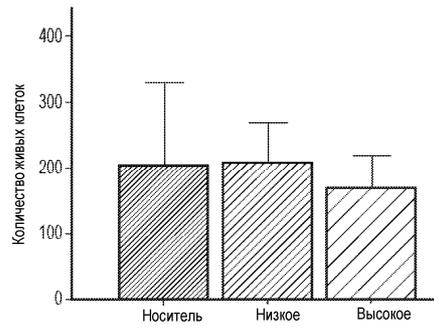
Фиг. 10



Фиг. 11



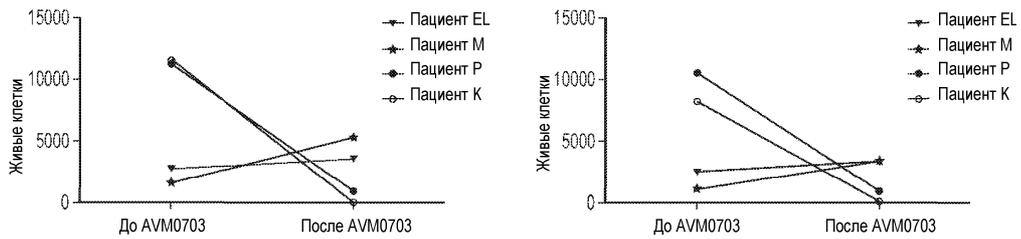
Фиг. 12



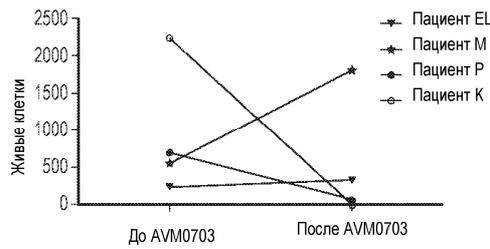
Фиг. 13

Данные на основе проточной цитометрии у человека: CD3+

Данные на основе проточной цитометрии у человека: CD4+

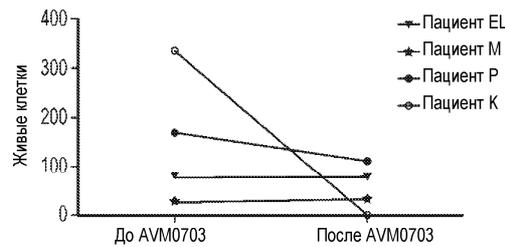


Данные на основе проточной цитометрии у человека: CD8+

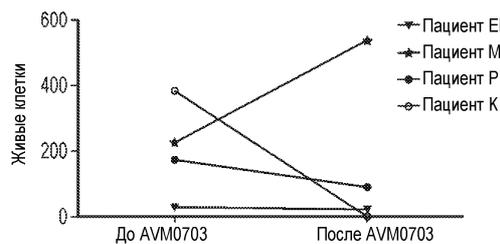


Фиг. 14

Данные на основе проточной цитометрии у человека: Treg

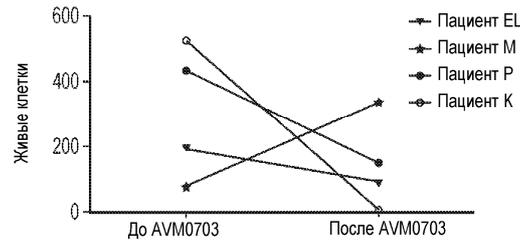


Данные на основе проточной цитометрии у человека: В-клетки

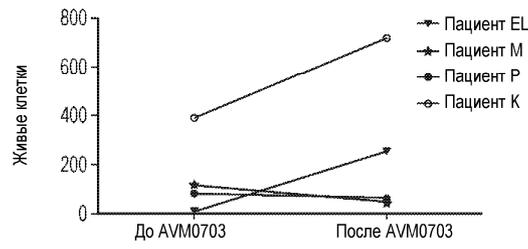


Фиг. 15

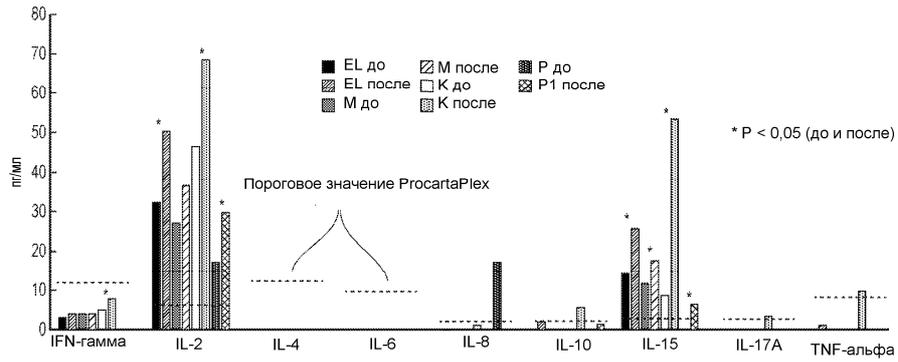
Данные на основе проточной цитометрии у человека: NK-клетки



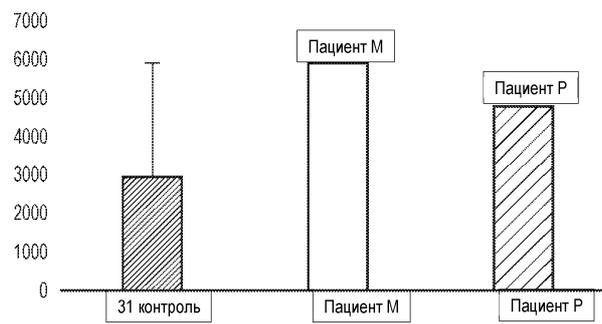
Данные на основе проточной цитометрии у человека: Гематопозитические стволовые клетки



Фиг. 16

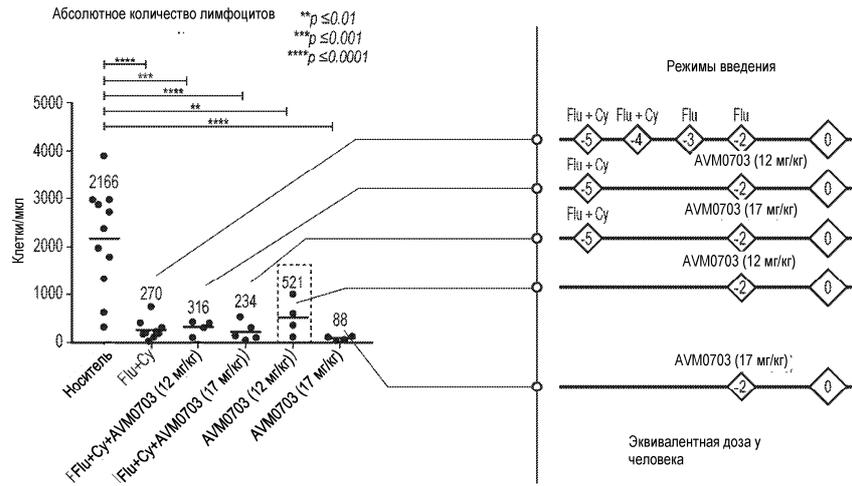


Фиг. 17

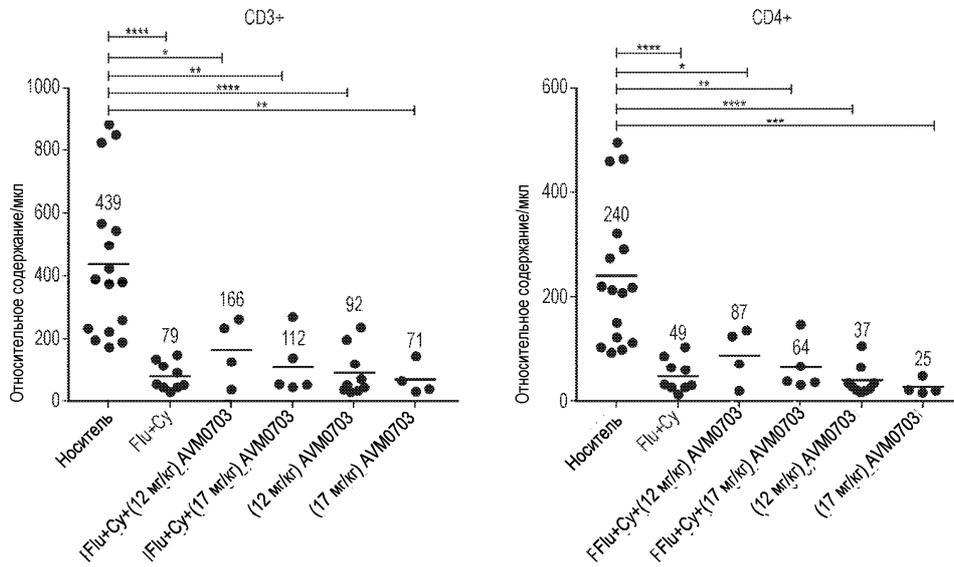


Фиг. 18

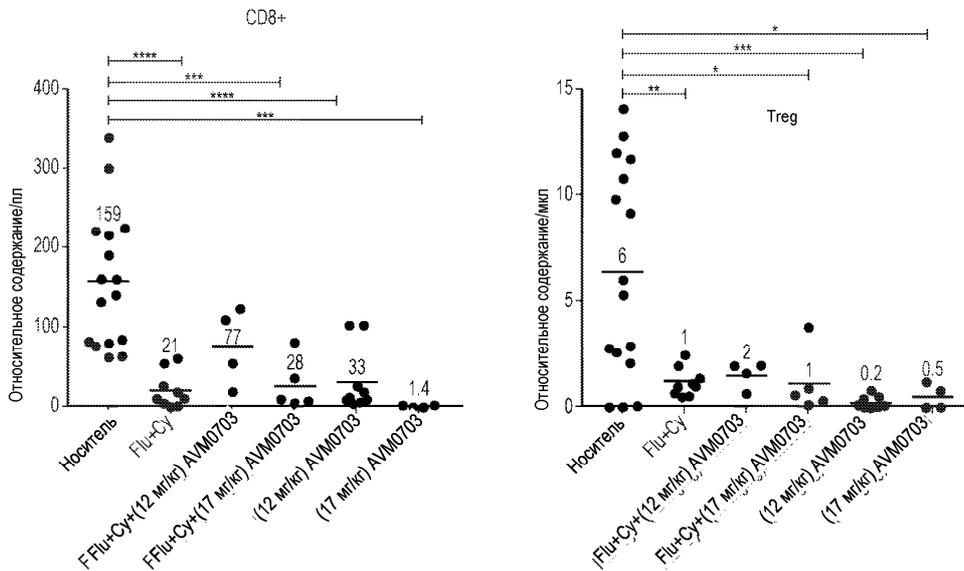
AVM0703 17 МГ/КГ В ОТДЕЛЬНОСТИ ВЫЗЫВАЕТ МАКСИМАЛЬНУЮ ЛИМФОДЕПЛЕЦИЮ



Фиг. 19

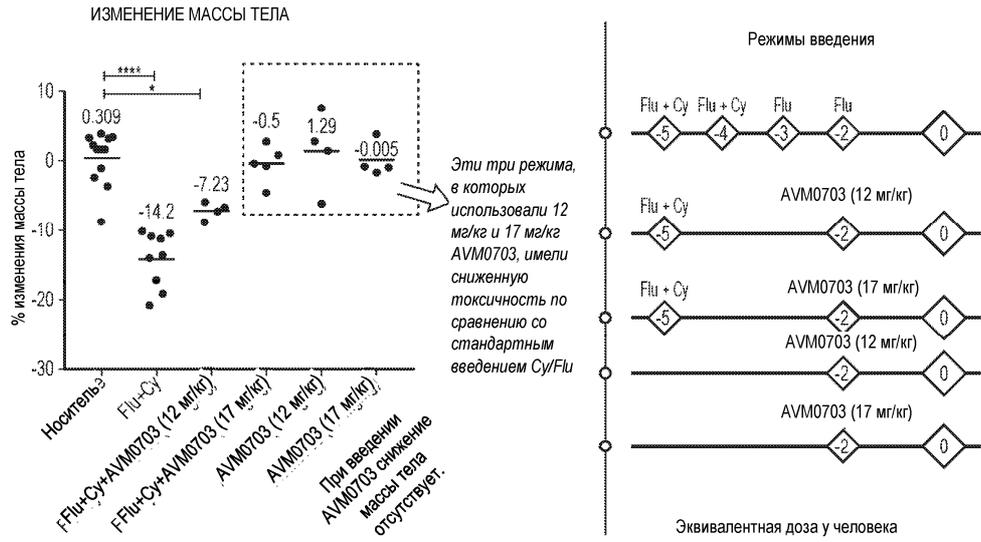


Фиг. 20

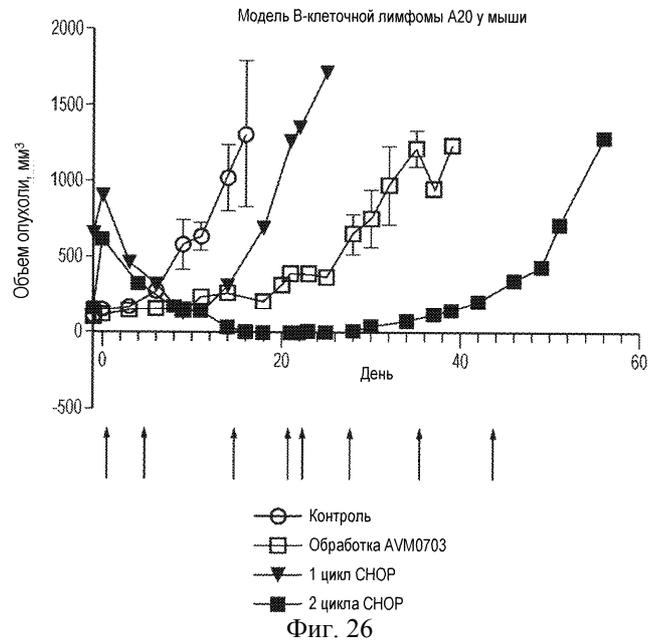


Фиг. 21

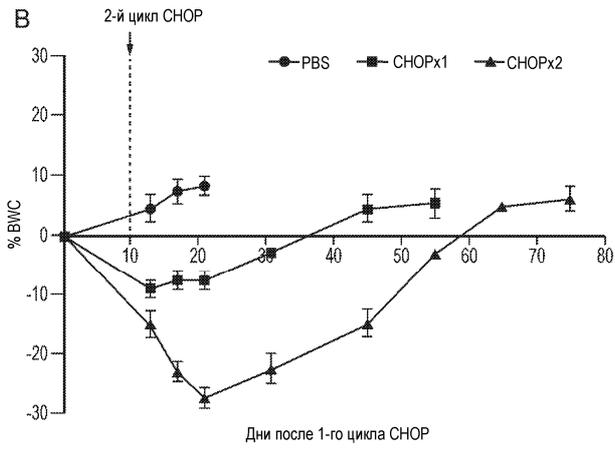
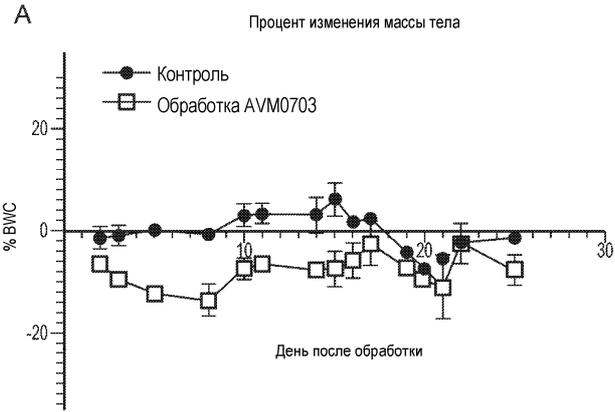




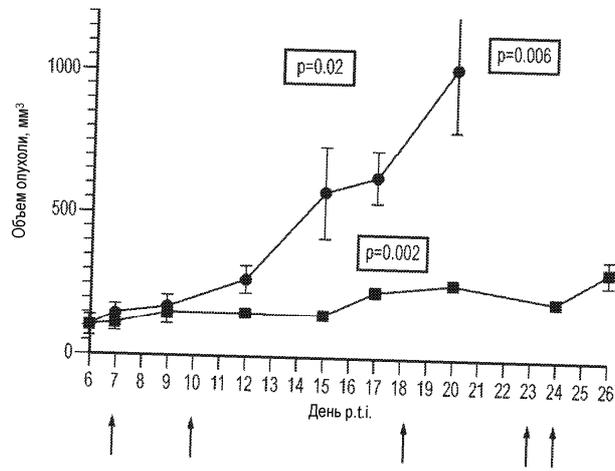
Фиг. 25



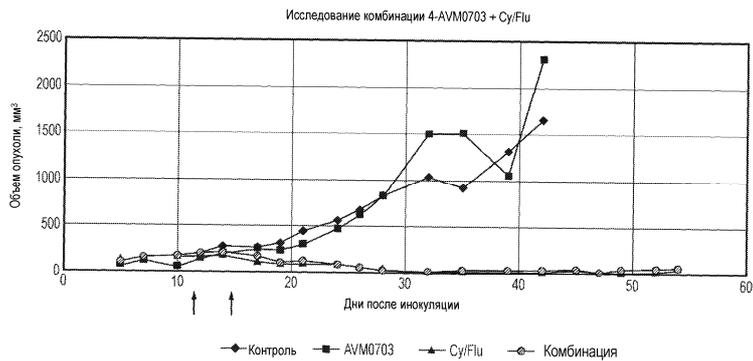
Фиг. 26



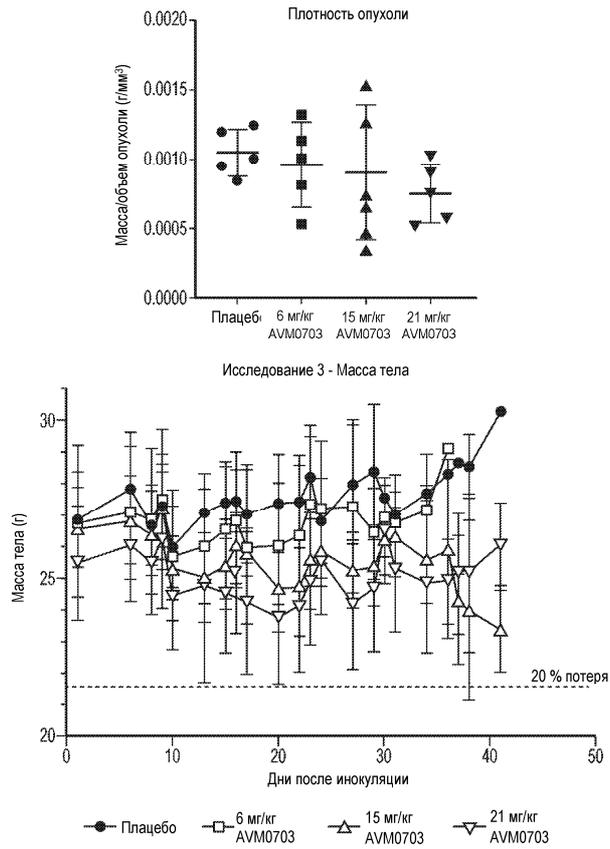
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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