

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034350**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(21) Номер заявки
201691576

(22) Дата подачи заявки
2015.02.04

(51) Int. Cl. **C07K 14/55** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНТЕРЛЕЙКИН-2, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/936,564**

(32) **2014.02.06**

(33) **US**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/EP2015/052312**

(87) **WO 2015/118016 2015.08.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Клайн Кристиан, Умана Пабло,
Мёсснер Эккехард, Хоссе Ральф (CH),
Петерсон Лоренс Бернارد, Ункер
Линда (GB)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2012178137
WO-A2-03048334
WO-A1-2010085495
WO-A1-2012146628
US-A1-2004175357**

(57) В патенте описаны в целом слитые белки, содержащие иммуноглобулины и интерлейкин-2 (IL-2). Более конкретно описаны слитые белки, содержащие слитые белки, содержащие иммуноглобулины и мутантный IL-2, которые обладают улучшенными свойствами для применения в качестве терапевтических средств, например, при лечении аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний. Кроме того, описаны полинуклеотиды, кодирующие указанные слитые белки, и векторы и клетки-хозяева, содержащие указанные полинуклеотиды. Описаны также способы получения слитых белков, предлагаемых в изобретении, и способы их применения для лечения заболевания.

B1**034350****034350****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к целому к слитым белкам иммуноглобулинов и интерлейкина-2 (IL-2). Более конкретно, изобретение относится к слитым белкам иммуноглобулинов и мутантного IL-2, которые обладают улучшенными свойствами с точки зрения применения в качестве терапевтических средств, например, при лечении аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний. Кроме того, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим указанные слитые белки, и к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим указанные полинуклеотиды. Изобретение относится также к способам получения слитых белков, предлагаемых в изобретении, и к способам их применения для лечения заболеваний.

Предпосылки создания изобретения

Регуляторные Т-клетки (Трег-клетки) представляют собой специфические субпопуляции Т-лимфоцитов, которые имеют решающее значение для поддержания аутоотолерантности. Эти CD4⁺CD25^{hi}-клетки, обладающие супрессорной функцией, могут отличаться от эффекторных Т-клеток внутриклеточной экспрессией фактора транскрипции FOXP3, а также других клеточных маркеров, таких как CD127^{lo}, CTLA-4⁺, LAP, CD39⁺, PD-1⁺, GARP и т.д. FOXP3 имеет решающее значение для дифференцировки и функции Трег, и дефицит и мутации гена FOXP3, как это имеет место у scurfy-мышей (мыши, гемизиготные по X-сцепленной мутации, приводящей к лимфопролиферативным заболеваниям), и у пациентов со сцепленным с X-хромосомой синдромом иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии (IPEX), приводят к нарушению аутоотолерантности и развитию аутоиммунных заболеваний в результате дефицита или отсутствия функции Трег.

С дефицитом Трег-клеток или функции Трег коррелируют аутоиммунные ответы, проявляющиеся в виде диабета типа 1, системной красной волчанки (SLE), рассеянного склероза и многих других болезней. Данные, полученные на животных моделях, подтвердили гипотезу о том, что возникновению указанных аутоиммунных ответов способствует нарушение способности Трег-клеток контролировать деструктивный аутоиммунный ответ, в значительной степени вследствие воздействий аутореактивных эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти. Диабет типа 1 представляет собой аутоиммунное заболевание, которое возникает после деструкции основной части продуцирующих инсулин β-клеток в поджелудочной железе. Частота встречаемости диабета типа 1 составляет ~0,3% в популяции жителей США и его встречаемость продолжает возрастать в США, Европе и, в частности, в Скандинавии (около 1%), и ожидается, что в течение следующих 20 лет число случаев заболевания увеличится вдвое.

Цитокин IL-2 играет основную роль в активации и функции как Трег-клеток, так и эффекторных Т-клеток (Teff). Дефицит производства IL-2 или снижение чувствительности к нему приводит главным образом к снижению функции Трег и повышению вероятности проявления аутоиммунитета. Поскольку Трег-клетки конститутивно экспрессируют более высокие уровни высокоаффинного рецептора IL-2 по сравнению с Teff-клетками, то низкие дозы IL-2 поддерживают главным образом Трег-, а не Teff-клетки.

С учетом того, что IL-2 воздействует, прежде всего, на активацию Трег *in vitro* и *in vivo*, можно предполагать, что терапия на основе применяемого в низких дозах IL-2, характеризующегося продолжительным временем жизни, должна с высокой вероятностью оказывать благоприятное воздействие на аутоиммунные заболевания. В конце 2013 г. было начато двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое испытание IL-2 (Proleukin®, рекомбинантный человеческий IL-2) на 200 пациентах с диабетом типа 1. В современных клинических испытаниях продемонстрировано, что ежедневное применение пролекина в низких дозах облегчало некоторые признаки и симптомы хронической реакции "трансплантат-против-хозяина" (GVHD) и индуцированного вирусом гепатита С васкулита (Koreth и др., New Engl J Med 365, 2011, сс. 2055-2066, Saadoun и др., New Engl J Med 365, 2011, сс. 2067-2077). В обоих исследованиях установлено, что низкие дозы Proleukin® индуцировали Трег и повышали соотношение Трег:Teff. Однако фармакокинетические (ФК) свойства Proleukin® оказались неудовлетворительными, что не позволяло оптимальным образом поддерживать низкие постоянные уровни IL-2 в организме человека. Другие изученные в клинических испытаниях методы предусматривали размножение Трег-клеток конкретного индивидуума *ex vivo* с последующей реинфузией, но этот подход оказался не очень удачным из-за проблем с контролем качества.

Таким образом, новый терапевтический подход, который восстанавливает опосредуемую естественными регуляторными Т-клетками (Трег) доминантную иммунную толерантность и существенно минимизировать любые стимулирующие воздействия на эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти, может в значительной степени повышать возможность лечения пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, такими как диабет типа 1, рассеянный склероз, системная красная волчанка, болезнь Крона, а также другими аутоиммунными заболеваниями и имеющими иммунную основу провоспалительными заболеваниями, такими как хроническая реакция "трансплантат-против-хозяина", астма, легочный фиброз, хроническое обструктивное заболевание легких, сердечно-сосудистыми болезнями, такими как атеросклероз и острый коронарный синдром, и реакция отторжения трансплантата, как солидного органа, так и костного мозга.

В WO 2009/135615 описано применение уже известного мутеина IL-2 (IL-2 N88R, BAY50-4798,

описанного в WO 1999/60128) для терапии или профилактики аутоиммунного заболевания. Установлено, что мутеин IL-2 обладает более высокой активностью в отношении Treg-клеток по сравнению с IL-2 дикого типа, при этом он оказывает слабое воздействие на CD8⁺-Т-клетки и NK-клетки. Не описаны слитые белки, содержащие мутеин IL-2.

В WO 2010/85495 описаны варианты IL-2, которые избирательно стимулируют активность Treg-клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками, предназначенные для лечения воспалительных нарушений. Описанные варианты IL-2 содержат комбинацию восьми или большего количества аминокислотных замен, которые оказывают влияние на связывание с различными субъединицами рецептора IL-2.

Содержащие IL-2 слитые белки, предлагаемые в настоящем изобретении, активируют преимущественно человеческие и нечеловеческие Treg-клетки, сдвигая баланс в сторону более высокого соотношения Treg:Teff, и снижают аутоиммунный ответ. Они имеют продолжительное время жизни, что позволяет применять удобные схемы дозирования, и у них отсутствуют эффекторные функции, что снижает потенциальные побочные действия и негативное влияние на эффективность.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из объектов изобретения является слитый белок, содержащий (I) молекулу иммуноглобулина, и (II) две мутантные молекулы интерлейкина-2 (IL-2), которые содержат аминокислотную мутацию, снижающую аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью Fc-рецептору по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу иммуноглобулина IgG-класса, прежде всего молекулу иммуноглобулина IgG₁-подкласса. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу человеческого иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина обладает способностью специфически связываться с антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой моноклональное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина не обладает способностью к специфическому связыванию с антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vh3-23. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vk3-20. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина не обладает способностью к специфическому связыванию с антигеном и содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vh3-23, и содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vk3-20.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит модификацию, снижающую аффинность связывания молекулы иммуноглобулина с Fc-рецептором по сравнению с соответствующей молекулой иммуноглобулина без указанной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор, прежде всего, человеческий Fcγ-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный Fc-рецептор выбирают из группы, включающей FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89). В конкретном варианте осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой FcγRIIIa, прежде всего, человеческий FcγRIIIa. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация снижает эффекторную функцию молекулы иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная эффекторная функция представляет собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в Fc-области, прежде всего, в CH2-области указанной молекулы иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотную замену в положении 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-

нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные аминокислотные замены представляют собой L234A и L235A (LALA). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены в положениях 234, 235 и 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) в тяжелых цепях иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 88 человеческого IL-2 (SEQ ID NO: 1). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой N88D. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные молекулы IL-2 дополнительно содержат аминокислотную мутацию, которая не изменяет аффинность связывания указанных молекул IL-2 с рецептором IL-2 по сравнению со встречающимся в естественных условиях нативным IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные молекулы IL-2 содержат аминокислотную мутацию в положении, которое соответствует остатку 125 человеческого IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену C125A. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная мутантная молекула IL-2 дополнительно содержит аминокислотную мутацию, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2 представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K и T3P. В конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2, представляет собой T3A. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 представляют собой молекулы человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64, прежде всего последовательность SEQ ID NO: 58. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 имеют последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64, прежде всего последовательность SEQ ID NO: 58. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных мутантных молекул IL-2 слита на своей N-концевой аминокислоте с C-концевой аминокислотой одной из иммуноглобулиновых тяжелых цепей указанной молекулы иммуноглобулина, необязательно через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных мутантных молекул IL-2 слита с указанной молекулой иммуноглобулина через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит по меньшей мере 10, прежде всего по меньшей мере 15 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

В конкретном варианте осуществления изобретения, указанный слитый белок содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 50. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный слитый белок содержит легкую цепь иммуноглобулина, имеющую SEQ ID NO: 19, и слитый полипептид: тяжелая цепь иммуноглобулина-IL-2, имеющий SEQ ID NO: 50. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок практически состоит из молекулы иммуноглобулина, двух мутантных молекул интерлейкина-2 (IL-2), содержащих аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа, и необязательно один или несколько пептидных линкеров. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок практически состоит из двух легких цепей иммуноглобулина, имеющих SEQ ID NO: 19, и двух слитых полипептидов: тяжелая цепь иммуноглобулина-IL-2, имеющих SEQ ID NO: 50.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки по сравнению с эффекторными Т-клетками, прежде всего с каноническими CD4⁺-Т-клетками и CD8⁺-Т-клетками. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки по сравнению с каноническими CD4⁺-Т-клетками памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок активирует регуляторные Т-клетки по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз в большей степени, чем канонические CD4⁺-Т-клетки памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения указанную активацию определяют путем измерения уровня фосфорилирования внутриклеточного STAT, прежде всего STAT5. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное измерение уровней фосфорилирования внутриклеточного STAT осуществляют с помощью анализа методом проточной цитометрии.

В изобретении предложен также полинуклеотид, кодирующий слитый белок, предлагаемый в изобретении. Кроме того, предложен вектор, прежде всего экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, предлагаемый в изобретении. Следующим объектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор, предлагаемый в изобретении. В изобретении предложен также способ получения слитого белка, предлагаемого в изобретении, который заключается в том, что осуществляют стадии, на которых

(I) культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии слитого белка, и (II) выделяют слитый белок. Предложен также слитый белок, содержащий (I) молекулу иммуноглобулина и

(II) две молекулы интерлейкина-2 (IL-2), содержащие аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 с обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа, полученный указанным способом.

Одним из объектов изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение относится также к слитому белку или фармацевтической композиции, предлагаемому/предлагаемой в изобретении, для применения в качестве лекарственного средства, и к применению для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания, в частности, диабета типа 1, рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE), воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона или неспецифического язвенного колита, более конкретно диабета типа 1 или реакции "трансплантат-против-хозяина" или отторжения трансплантата. Предложено также применение слитого белка, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом, и способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, которая содержит слитый белок, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанное аутоиммунное заболевание представляет собой диабет типа 1, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанное аутоиммунное заболевание представляет собой диабет типа 1. В другом варианте осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат-против-хозяина". В одном из вариантов осуществления изобретения указанный индивидуум представляет собой млекопитающее, прежде всего человека.

Предложен также слитый белок, предлагаемый в изобретении, предназначенный для применения для избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная активация включает индукцию пролиферации регуляторных Т-клеток и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор, прежде всего фосфорилирования STAT5, в регуляторных Т-клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное применение представляет собой применение *in vitro*, и указанный слитый белок используют в концентрации примерно 10 нг/мл или менее, прежде всего примерно 1 нг/мл или менее. В другом варианте осуществления изобретения указанное применение представляет собой применение *in vivo*, и указанный слитый белок используют в дозе примерно 100 мкг/кг веса тела или менее, прежде всего примерно 25 мкг/кг веса тела или менее, более конкретно примерно 10 мкг/кг веса тела или менее.

В изобретении предложен также способ избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*, заключающийся в том, что приводят в контакт указанные регуляторные Т-клетки со слитым белком, предлагаемым в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная активация включает индукцию пролиферации регуляторных Т-клеток и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор, прежде всего фосфорилирования STAT5, в регуляторных Т-клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный способ представляет собой способ *in vitro*, и указанный слитый белок используют в концентрации примерно 10 нг/мл или менее, прежде всего примерно 1 нг/мл или менее. В другом варианте осуществления изобретения указанный способ представляет собой способ *in vivo*, и указанный слитый белок используют в дозе примерно 100 мкг/кг веса тела или менее, прежде всего примерно 25 мкг/кг веса тела или менее, более конкретно примерно 10 мкг/кг веса тела или менее.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - результаты очистки слитого белка DP47GS IgG-IL-2 (см. SEQ ID NO: 13, 15, 19). (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии на белке А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. Выход 4 мг/л. (В) Результаты аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (система Caliper) конечного продукта. Были обнаружены следующие полосы: невосстанавливающие условия: 7,5% площади соответствует 111 кДа, 92,5% площади соответствует 174 кДа; восстанавливающие условия: 23,6% площади соответствует 29 кДа, 23,5% площади соответствует 67 кДа, 52,9% площади соответствует 82 кДа. Продукт содержал примерно 7,5% "половин-

ного IgG". (Г) Результаты аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке TSKgel G3000 SW XL (содержание мономеров: 91%);

на фиг. 2 - результаты очистки слитого белка DP47GS IgG-(IL-2)₂ (см. SEQ ID NO: 17, 19). (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии на белке А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. Выход 13 мг/л. (В) Результаты аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (система Caliper) конечного продукта. Были обнаружены следующие полосы: невосстанавливающие условия: 2,3% площади соответствует 172,5 кДа, 97,7% площади соответствует 185 кДа; восстанавливающие условия: 18,3% площади соответствует 27,3 кДа, 0,6% площади соответствует 29,2 кДа, 81,1% площади соответствует 78,3 кДа. (Г) Результаты аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке Супердекс 200 (содержание мономеров: 100%);

на фиг. 3 - результаты очистки слитого белка DP47GS IgG-IL-2 N88D (см. SEQ ID NO: 15, 19, 48). (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии на белке А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. Выход 23,7 мг/л. Собранные фракции выделены рамкой. (В) Результаты аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (система Caliper) конечного продукта. Были обнаружены следующие основные полосы: невосстанавливающие условия: 100% площади соответствует 167,0 кДа; восстанавливающие условия: 31,5% площади соответствует 28,6 кДа, 31,7% площади соответствует 63,5 кДа, 35,3% площади соответствует 77,5 кДа. (Г) Результаты аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке TSKgel G3000 SW XL (содержание мономеров 97,3%);

на фиг. 4 - результаты очистки слитого белка DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 50). (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии на белке А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. Выход 32,9 мг/л. Собранные фракции выделены рамкой. (В) Результаты аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (система Caliper) конечного продукта. Были обнаружены следующие основные полосы: невосстанавливающие условия: 20,7% площади соответствует 180,4 кДа, 78,0% площади соответствует 184,0 кДа; восстанавливающие условия: 16,2% площади соответствует 27,3 кДа, 82,7% площади соответствует 76,0 кДа. (Г) Результаты аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке TSKgel G3000 SW XL (содержание мономеров 98,3%);

на фиг. 5 - результаты очистки слитого белка DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 52). (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии на белке А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. Выход 8,0 мг/л. Собранные фракции выделены рамкой. (В) Результаты аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (система Caliper) конечного продукта. Были обнаружены следующие основные полосы: невосстанавливающие условия: 10,3% площади соответствует 166,0 кДа, 61,4% площади соответствует 175,5 кДа, 28,2% площади соответствует 181,2 кДа; восстанавливающие условия: 16,0% площади соответствует 26,1 кДа, 83,1% площади соответствует 75,0 кДа. (Г) Результаты аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке TSKgel G3000 SW XL (содержание мономеров 100%);

на фиг. 6 - данные об экспрессии CD25 (IL-2RA) и CD122 (IL-2RB) на субпопуляциях CD4⁺-Treg, субпопуляциях NK-клеток и NKT-клетках. Для определения субпопуляций CD4⁺-Treg, NK-клеток и NK-клеток применяли маркеры клеточной поверхности. Для оптимизации окрашивания CD25 и CD122 не осуществляли внутриклеточное FOXP3-окрашивание. (А, Б) Три популяции регуляторных CD4⁺-Т-клеток (Treg): наивные (CD45RA⁺, CD25⁺; пунктирная линия), клетки памяти (CD45RA⁻, CD25⁺; сплошная линия) и активированные (CD45RA⁻, CD25^{hi}; штриховая линия). (В, Г) NKT (пунктирная линия), CD56^{bright} NK-клетки (штриховая линия), CD56^{intermediate} NK-клетки (сплошная линия). Серым цветом обозначены результаты для контроля изотипа (IC);

на фиг. 7 - данные об экспрессии CD25 (IL-2RA) и CD122 (IL-2RB) на CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляциях канонических Т-клеток. Применяли маркеры клеточной поверхности для определения наивных (CD45RA⁺; пунктирная линия) и канонических CD4⁺-Т-клеток памяти (CD45RA⁻; сплошная линия) (А, Б), канонических CD8⁺-Т-клеток памяти (CD45RA⁻; сплошная линия) и CD45RA⁺-CD8-Т-клеток (комбинация субпопуляций наивных клеток и TEMRA; TEMRA означает эффекторные клетки памяти, перенаправленные на экспрессию CD45RA; пунктирная линия) (В, Г). Серым цветом обозначены результаты для контроля изотипа (IC);

на фиг. 8 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови в ответ на обработку DP47GS IgG-IL-2. Для трех различных доноров (C4-C6) оценивали в различные моменты времени воздействия различных доз DP47GS IgG-IL-2 на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций CD4⁺-Treg: активированные, клетки памяти и наивные Treg; канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти; CD56^{bright} NK-клетки; эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти; наивные эффекторные CD4⁺-Т-клетки; NK-клетки; NKT-клетки; и наивные эффекторные CD8⁺-Т-клетки + CD45RA⁺-клетки памяти;

на фиг. 9 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови в ответ на обработку DP47GS IgG-(IL-2)₂. Для пяти различных доноров (N1, N2, C4-C6) оценивали в различные моменты времени воздействия различных доз иммуноконъюгата DP47GS IgG-(IL-2)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций CD4⁺-

Treg: активированные, клетки памяти и наивные Treg; канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти; CD56^{bright}-NK-клетки; эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти; наивные эффекторные CD4⁺-Т-клетки; NK-клетки; NKT-клетки; и наивные эффекторные CD8⁺-Т-клетки + CD45RA⁺-клетки памяти;

на фиг. 10 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови: сравнение DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂. Результаты, полученные для каждой субпопуляции клеток, стандартизовали относительно максимального обнаруженного воздействия на каждую субпопуляцию и приблизительные величины EC₅₀ для Treg представлены в табл. 2. (А) стандартизованные результаты для DP47GS IgG-IL-2, (Б) стандартизованные результаты для DP47GS IgG-(IL-2)₂;

на фиг. 11 - детализированная сравнительная оценка чувствительности к DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂ субпопуляции Treg трех доноров. На графиках представлены средние значения ± СКО величин MFI (средняя интенсивность флуоресценции) pSTAT5a для трех доноров. (А) общее количество CD3⁺, CD4⁺, FoxP3⁺-Treg, (Б) активированные Treg, (В) Treg памяти, (Г) наивные Treg;

на фиг. 12 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови в ответ на обработку DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂. Для трех различных доноров (C4-C6) оценивали в различные моменты времени воздействия различных доз DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций CD4⁺-Treg: активированные, клетки памяти и наивные Treg; канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти; CD56^{bright}-NK-клетки; эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти; наивные эффекторные CD4⁺-Т-клетки; NK-клетки; NKT-клетки; и наивные эффекторные CD8⁺CD45RA⁺-Т-клетки;

на фиг. 13 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови в ответ на обработку DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂. Для пяти различных доноров (C4, C5, C6, N1, N2) оценивали в различные моменты времени воздействия различных доз DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций CD4⁺-Treg: активированные, клетки памяти и наивные Treg; канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти; CD56^{bright}-NK-клетки; эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти; наивные эффекторные CD4⁺-Т-клетки; NK-клетки; NKT-клетки; и наивные эффекторные CD8⁺CD45RA⁺-Т-клетки;

на фиг. 14 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови: сравнение DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ и DP47GS IgG-IL-2N88D. Представлены результаты для субпопуляций CD4⁺-Treg (А-В): активированных (А), клеток памяти (В) и наивных (Б) Treg; канонических эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти (Г); CD56^{bright}-NK-клеток (Д);

на фиг. 15 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях человеческих клеток периферической крови в ответ на обработку обоими конъюгатами, и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂. Для десяти различных доноров оценивали в различные дни воздействия DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ в широком диапазоне доз (≥6 log) на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций клеток: (А) Treg памяти, (Б) наивные Treg, (В) CD56^{bright}-NK-клетки, (Г) все NK-клетки, (Д) центральные CD4⁺-Т-клетки памяти, (Е) эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти, (Ж) наивные CD4⁺-Т-клетки, (З) центральные CD8⁺-Т-клетки памяти, (И) эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти, (К) наивные CD8⁺-Т-клетки, (Л) Temra [RA⁺-Teff-клетки памяти] CD8⁺-Т-клетки, (М) NKT-клетки и (Н) CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD56⁺-Т-клетки. Все результаты представлены в виде средних значений ± СОС (стандартная ошибка среднего) (n=10 доноров);

на фиг. 16 - сравнение воздействий in vitro DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ на человеческие NK-клетки и CD8⁺-Т-клетки. PBMC из организма здоровых доноров (n=10) культивировали с плотностью 5×10 клеток/лунку планшетов с U-образным дном в присутствии 50 нг/мл DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (незакрашенные символы) или DP47GS IgG-(IL-2)₂ (закрашенные серым цветом символы) в течение 6 дней, после чего количественно оценивали число клеток с помощью проточной цитометрии. Воздействия на NK-клетки количественно оценивали на CD56^{dim}- и CD56^{bright}-NK-клетках (А). Воздействия на CD8⁺-Т-клетки проиллюстрированы на панели (Б). Результаты представлены в виде медианных значений ± межквартильный интервал, статистические различия определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни;

на фиг. 17 - сравнение воздействий in vivo DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ на несущих стволовые CD34⁺-клетки гуманизированных мышей. Через 10-12 недель после приживления трансплантированных стволовых CD34⁺-клеток мышей обрабатывали дважды в неделю наполнителем (DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ или DP47GS IgG-(IL-2)₂. Максимальное увеличение количеств человеческих Treg и NK-клеток в крови было выявлено после 3 обработок, результаты представлены на панели (А) для Treg и на панели (Б) для NK-клеток. Результаты представлены в виде медианных значений ± межквартильный интервал; наполнитель (n=21), IgG-(IL-2N88D)₂ (n=22) и IgG-(IL-2)₂ (n=24);

на фиг. 18 - сравнение воздействий in vivo DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ на выживание несущих стволовые CD34⁺-клетки гуманизированных мышей. Через 10-12 недель после приживления трансплантированных стволовых CD34⁺-клеток мышей обрабатывали дважды в неделю наполните-

лем (DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ или DP47GS IgG-(IL-2)₂ до тех пор, пока серьезность реакции человеческий ксенотрансплантат против хозяина не достигала заранее определенного уровня (потеря веса $\geq 15\%$), требующего исключения животных из исследования. Результаты представлены на графиках в виде кривых выживаемости Каплана-Мейера, построенных с помощью программы GraphPad Prism для наполнителя (n=7), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=12) и DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=13);

на фиг. 19 - сравнение воздействий *in vivo* DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ на Treg, NK-клетки и CD8⁺-Т-клетки в организме несущих стволовые CD34⁺-клетки гуманизированных мышей. Через 10-12 недель после приживления трансплантированных стволовых CD34⁺-клеток мышей обрабатывали дважды в неделю наполнителем (DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ или DP47GS IgG-(IL-2)₂ до тех пор, пока серьезность реакции человеческий ксенотрансплантат против хозяина не достигала заранее определенного уровня (потеря веса $\geq 15\%$), требующего исключения животных из исследования, после чего проводили анализ крови в отношении индивидуальных субпопуляций человеческих клеток. Результаты оценки количества человеческих Treg, NK-клеток и CD8⁺-клеток в крови представлены в виде % относительно количества человеческих CD45⁺-клеток. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС для наполнителя (n=6), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=9) или DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=9);

на фиг. 20 - результаты оценки индукции pSTAT5a Treg в крови обезьян циномолгус в ответ на DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Для трех здоровых доноров (C1-C3) одновременно оценивали воздействия максимальной дозы (20 нг/мл) DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a в Treg. (А) Идентификацию субпопуляций CD4⁺CD25⁺-Treg: наивных Treg (CD45RA⁺FOXP3⁺), Treg памяти (CD45RA⁺FOXP3⁺) и активированных (CD45RA⁺FOXP3^{hi}) осуществляли с помощью метода проточной цитометрии с применением стратегии, основанной на использовании дискриминационного окна для FOXP3 (y-ось) и CD45RA⁺(x-ось). На панели (Б) представлены данные об уровне окрашивания поверхности CD25⁺-клеток в субпопуляциях Treg до стимуляции. На панели (В) представлены pSTAT5a-ответы для субпопуляций CD4⁺CD25⁺-Treg: субпопуляций активированных клеток, клеток памяти и наивных клеток для каждой из трех обезьян циномолгус (C1-C3);

на фиг. 21 - данные об активации pSTAT5a канонических эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти в крови обезьян циномолгус в ответ на обработку DP47GS IgG-(IL-2)₂ или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Индукцию pSTAT5a в канонических эффекторных CD4⁺-Т-клетках памяти анализировали с использованием тех же стимулированных (20 нг/мл) образцов крови трех обезьян-доноров, указанных в описании к фиг. 11. (А) результаты идентификации канонических эффекторных CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁻-Т-клеток памяти, которую осуществляли с помощью метода проточной цитометрии с применением стратегии, основанной на использовании дискриминационного окна для CD45RA по y-оси и CD25 по x-оси. На панели (Б) представлены pSTAT5a-ответы для всех эффекторных CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁻-Т-клеток памяти. На панели (В) представлены pSTAT5a-ответы для эффекторных Т-клеток памяти, которые являлись также CD25⁺-клетками. На панели (Г) представлены pSTAT5a-ответы для эффекторных Т-клеток памяти, которые являлись также CD25⁺-клетками;

на фиг. 22 - данные об индукции pSTAT5a в субпопуляциях Т-клеток периферической крови обезьян циномолгус в ответ на обработку DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Для двух здоровых взрослых доноров оценивали воздействия различных доз (0,03-300 нг/мл) DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a. Представлены результаты для следующих субпопуляций CD4⁺-Treg (А-В): активированные (А), клетки памяти (В) и наивные (Б) Treg и канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти (Г). Для обеих обезьян были получены сходные результаты и для иллюстрации воздействий DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ приведены результаты для одного донора;

на фиг. 23 - полученные на мышах данные, свидетельствующие о том, что DP47GS IgG-IL-2 обладал более высокими фармакокинетическими (ФК) характеристиками по сравнению с DP47GS IgG-(IL-2)₂, в то время как характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ находились на промежуточном уровне. (А) данные для NOD- и NOD.scid-мышей, которым вводили путем внутривенной инъекции (i.v.) 0,3 мг/кг DP47GS IgG-IL-2 или 0,3 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2)₂. (Б) данные для NOD.scid.IL2R $\alpha^{-/-}$ -мышей, которым вводили i.v. 0,1 мг/кг DP47GS IgG-IL-2, 0,3 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2)₂ или 0,1 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Человеческий IL-2 оценивали в образцах сыворотки в указанные моменты времени с помощью анализа на основе захвата с использованием МАТ;

на фиг. 24 - данные, свидетельствующие о том, что уровни и CD25, и FoxP3 повышаются в мышиных Treg после обработки Proleukin®, DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. BALB/c-мышей обрабатывали Proleukin® (20000 и 100000 МЕ/мышь, n=3), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300 или 1500 МЕ/мышь, n=3), обработанных наполнителем мышей включали в качестве нестимулированных контролей (n=4). Через 24 ч после обработки оценивали уровни CD25 и FOXP3 в Treg селезенки. Для всех четырех содержащих IL-2 молекул были выявлены зависящие от дозы изменения уровней CD25 на клеточной поверхности (А) и зависящие от дозы изменения уровней внутриклеточного FoxP3 (Б). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО, черные

столбики соответствуют наибольшей примененной дозе, а серые столбики соответствуют наиболее низкой дозе;

на фиг. 25 - результаты оценки ФК-характеристик DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂ в организме здоровых взрослых "биологически наивных" обезьян циномогус. (А): данные для животных, которым вводили внутривенно (i.v.) DP47GS IgG-IL-2 в виде кратковременной болюсной инъекции в дозах 10, 25 и 100 мкг/кг (n=2 на дозу). (Б): данные для животных, которым инъецировали i.v. DP47GS IgG-(IL-2)₂ в виде кратковременной болюсной инъекции в дозах 10 и 25 мкг/кг (n=2 на дозу). Человеческий IL-2 оценивали в образцах сыворотки в указанные моменты времени с помощью анализа на основе захвата с использованием МАТ;

на фиг. 26 - данные, свидетельствующие о том, что DP47GS IgG-IL2 оказывает зависящее от дозы действие на обезьян циномогус, увеличивая количество регуляторных Т-клеток. Изменения количества регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клеток (Treg) в цельной крови в день 7 после обработки представлены в виде (А) абсолютного количества Treg-клеток на мм³ цельной крови и (Б) кратности изменения количества Treg-клеток. Все данные представлены в виде средних значений ± СКО. Незакрашенные столбики: DP47GS IgG-IL-2 (n=6); затененные столбики: наполнитель (n=3);

на фиг. 27 - зависимости воздействий от времени и низких доз DP47GS IgG-IL-2 на уровне Treg-клеток в организме обезьян циномогус. (А) изменения в зависимости от времени кратности увеличения уровней Treg-клеток после введения DP47GS IgG-IL-2 в дозе 2 или 6 мкг/кг (n=4 и 6 соответственно). (Б) изменения в зависимости от времени абсолютных количеств Treg-клеток в крови после введения DP47GS IgG-IL-2 в дозе 2 или 6 мкг/кг (n=4 и 6 соответственно). Все данные представлены в виде средних значений ± СКО;

на фиг. 28 - данные, свидетельствующие о том, что введение однократной дозы пролейкина стимулирует кратковременный зависящий от дозы Treg-ответ у обезьян циномогус. (А) изменения количества Treg-клеток в периферической крови после однократного введения пролейкина в дозе от 3×10⁴ до 3×10⁵ МЕ/кг. (Б) изменения уровней pSTAT5a Treg после однократного введения пролейкина в дозе от 3×10⁴ до 3×10⁵ МЕ/кг. Данные представлены в виде средних значений ± СКО;

на фиг. 29 - данные, свидетельствующие о том, что низкая доза DP47GS IgG-IL-2 является более эффективной, чем высокая доза Proleukin® с точки зрения индукции Treg у обезьян циномогус. Нормальных здоровых обезьян циномогус (группы по n=5) обрабатывали DP47GS IgG-IL-2 в низкой дозе или пролейкином в высокой дозе и анализировали изменения количества регуляторных Т-клеток в день 10. В дни 0 и 7, вводили DP47GS IgG-IL-2 в дозе 16800 МЕ/кг (12 мкг/кг). Обработку пролейкином (200000 МЕ/кг) осуществляли SC 3 раза в неделю (MWF), вводя в общей сложности 5 доз. Результаты представлены в виде средних значений ± СКО для (А) изменения общего количества Treg-клеток на мм³ крови, (Б) кратности изменения количества Treg-клеток, и (В) изменения отношения количества Treg к количеству канонических CD4⁺FOXP3⁺-клеток. Незакрашенные столбики соответствуют обработке IL-2, а затененные столбики соответствуют обработке наполнителем в качестве контроля;

на фиг. 30 - данные, свидетельствующие о том, что уровень фосфорилированного STAT5 в цельной крови, полученные ex vivo, является чувствительным биомаркером активации с помощью DP47GS IgG-IL-2 Treg-клеток in vivo. Через один и три дня после введения in vivo однократной низкой дозы DP47GS IgG-IL-2 (12 мкг/кг) здоровым обезьянам циномогус (n=5), собирали образцы цельной крови и сразу же без стимуляции анализировали в отношении фосфорилированного STAT5 (pSTAT5a). У каждой обезьяны брали кровь в день 0 перед обработкой, измеряли количество pSTAT5a (затененные столбики) и индивидуальные результаты использовали для оценки кратности изменения после обработки (незакрашенные столбики). Представлены: (А) кратность изменения pSTAT5a в Treg-клетках в дни 1 и 3, (Б) кратность изменения уровней pSTAT5a в канонических CD4⁺CD45⁺-Т-клетках памяти, и (В) кратность изменения STAT5a в наивных Т-клетках. Данные представлены в виде средних значений ± СКО;

на фиг. 31 - данные, свидетельствующие о том, что уровень фосфорилированного STAT5 в цельной крови, полученный ex vivo, является чувствительным биомаркером активации Treg-клеток in vivo с помощью DP47GS IgG-IL-2 при его применении в низкой дозе. Через один-семь дней после введения in vivo однократной низкой дозы DP47GS IgG-IL-2 здоровым обезьянам циномогус, собирали образцы цельной крови и сразу же без стимуляции анализировали в отношении фосфорилированного STAT5 (pSTAT5a). У каждой обезьяны брали кровь в день 0 перед обработкой для определения нестимулированных уровней pSTAT5a и проводили сравнение с ними для определения изменений уровней pSTAT5a после обработки. (А) Уровни pSTAT5a Treg-клеток до и после обработки DP47GS IgG-IL-2 в дозе 2 мкг/кг (n=4). (Б) Уровни pSTAT5a Treg-клеток до и после обработки DP47GS IgG-IL-2 в дозе 6 мкг/кг (n=6). Данные представлены в виде средних значений ± СКО;

на фиг. 32 - данные, свидетельствующие о том, что уровень Ki-67 в цельной крови обезьян циномогус, полученный ex vivo, является маркером индуцируемой DP47GS IgG-IL-2 пролиферации Т-клеток in vivo. Для обезьян циномогус, обработанных DP47GS IgG-IL-2 в дозах 2 и 6 мкг/кг как указано в описании к фиг. 14, осуществляли также ex vivo мониторинг изменений уровней внутриклеточного маркера Ki-67 для оценки степени пролиферации in vivo. Осуществляли количественную оценку процента нахо-

дящихся в нормальном стационарном состоянии клеток в клеточном цикле (Ki-67⁺) в день 0 перед обработкой и затем осуществляли ежедневно мониторинг в течение следующих 7-11 дней. Представлены: (А) % Ki-67⁺ для Treg-клеток, (Б) Ki-67⁺ для канонических CD4⁺CD45⁺-Т-клеток памяти/эффекторных Т-клеток и (В) % Ki-67⁺ для наивных CD4⁺CD45RA⁺-Т-клеток. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО;

на фиг. 33 - зависимости от времени и низкой дозы воздействий DP47GS IgG-(IL-2)₂ на уровни Treg в организме наивных здоровых обезьян циномогус. (А) зависимость от времени изменения абсолютных количеств Treg после введения 6 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2)₂. (Б) зависимость от времени изменений pSTAT5a Treg-клеток после обработки, (В) зависимость от времени изменений кратности увеличения Treg-клеток и (Г) сравнение кратности изменений количества Treg-клеток у обработанных DP47GS IgG-IL-2 обезьян (незакрашенные столбики, 2-36 мкг/кг) и обработанных DP47GS IgG-(IL-2)₂ обезьян (затененный столбик, 6 мкг/кг). Все данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО (n=4-6);

на фиг. 34 - зависимости от времени и дозы воздействий DP47GS IgG-(IL-2)₂ при его применении в очень низких дозах на уровни Treg в организме наивных здоровых обезьян циномогус. (А) зависимость от времени изменений кратности увеличения Treg после введения DP47GS IgG-(IL-2)₂ в дозе 0,7 и 2 мкг/кг, (Б) зависимость от времени изменений pSTAT5a Treg-клеток, измеренных в день 0 перед обработкой и в дни 1-4 после обработки, (В) зависимость от времени изменений pSTAT5a Teff/мем-клеток. Все данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО (n=3 для 0,7 мкг/мл и n=8 для 2 мкг/кг);

на фиг. 35 - сравнение зависимостей от дозы воздействий DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂ и их способности увеличивать количество Treg в цельной крови обезьян циномогус. Все данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО (n=3-6);

на фиг. 36 - результаты применения технологии секвенирования следующего поколения (NGS) применяли для анализа специфического для субпопуляции Т-клеток деметилирования ДНК фактора транскрипции FOXP3 и иммуносупрессорной молекулы CTLA-4. Анализировали образцы крови взрослых биологически наивных обезьян циномогус до и после обработки оптимальной дозой DP47GS IgG-IL-2 (25 мкг/кг, n=4) и DP47GS IgG-(IL-2)₂ (6 мкг/кг, n=4). Субпопуляции CD4⁺-Т-клеток выделяли с помощью BD FACSAria из PBMC цельной крови и использовали по 100000 клеток на субпопуляцию для генспецифического деметилирования ДНК. Для обеих обработок были получены сходные результаты, и данные, полученные на обработанных DP47GS IgG-(IL-2)₂ обезьянах представлены для FOXP3 на верхней панели и для CTLA-4 на нижней панели (n=4, среднее значение $\pm$ СКО);

на фиг. 37 - результаты оценки ФК-характеристик DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в организме нормальных здоровых биологически наивных обезьян циномогус. (А) результаты, полученные для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, который вводили внутривенно (iv) путем кратковременной болюсной инъекции в дозах 30 и 100 мкг/кг (n=2 на дозу). (Б) результаты, полученные для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, который вводили путем подкожной инъекции (sc) в объеме 0,2 мл в боковую область спины в дозах 30 и 100 мкг/кг (n=2 на дозу). Человеческий IL-2 оценивали в образцах плазмы в указанные моменты времени с помощью анализа захвата, основанного на использовании моноклонального антитела. (В) В качестве биомаркера экспозиции IL-2 проводили измерения растворимого CD25 в плазме после инъекции IgG-(IL-2N88D)₂ в дозах 30 и 100 мкг/кг; уровни sCD25 циномогус измеряли с помощью анализа захвата на основе МАт к человеческому sCD25, в отношении которого известно, что оно вступает в перекрестную реакцию с sCD25 циномогус. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС (n=4);

на фиг. 38 - зависимости от времени и дозы воздействий in vivo DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на Treg в организме наивных здоровых обезьян циномогус. Представлены зависимости от времени изменений абсолютного количества ($\times 10^6$ /мл крови) общих Treg, CD4⁺-Treg памяти, наивных CD4⁺-Treg и CD8⁺FOXP3⁺-Treg после инъекции (А) 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ или (Б) 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂. Представлены зависимости от времени изменений Treg в виде % от CD4⁺- или CD8⁺-Т-клеток для общих Treg, CD4⁺-Treg памяти, наивных CD4⁺-Treg и CD8⁺FOXP3⁺-Treg после инъекции 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (В) или 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (Г). Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС (n=4);

на фиг. 39 - зависимости от времени и дозы воздействий in vivo DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на лимфоциты в организме наивных здоровых обезьян циномогус. Изменения в зависимости от времени эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти представлены в виде % от общего количества CD4⁺-Т-клеток после инъекции 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ или 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (А). Изменения в зависимости от времени эффекторных CD4⁺CD25^{hi}-Т-клеток памяти представлены в виде % от количества эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти после инъекции 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ или 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (Б). Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС (n=4);

на фиг. 40 - данные, свидетельствующие о том, что уровень pSTAT5a в цельной крови, полученный ex vivo, является чувствительным биомаркером активации IL-2 in vivo. Через 1-11 дней после введения in vivo однократной дозы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ обезьянам циномогус собирали образцы цельной крови и сразу же без стимуляции анализировали в отношении pSTAT5a. У каждой обезьяны брали образцы крови в день 0 перед обработкой для определения нестимулированных уровней pSTAT5a, которые срав-

нивали для определения изменений уровней pSTAT5a после обработки. (А) pSTAT5a (MFI, максимальная средняя интенсивность флуоресценции) до и после обработки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) pSTAT5a до и после обработки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СОС для указанных субпопуляций клеток;

на фиг. 41 - полученные *ex vivo* данные, свидетельствующие о том, что окрашивание CD25 на поверхности клеток в цельной крови является чувствительным биомаркером активации IL-2 *in vivo*. Через 1-14 дней после введения *in vivo* однократной дозы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ обезьянам циномогус собирали образцы цельной крови и сразу же без стимуляции анализировали в отношении CD25 на поверхности указанных типов клеток. У каждой обезьяны брали образцы крови в день 0 перед обработкой для определения нестимулированных уровней CD25, с которыми проводили сравнение для определения изменений уровней CD25 после обработки. (А) окрашивание CD25 (максимальная MFI, средняя интенсивность флуоресценции) до и после обработки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) окрашивание CD25 до и после обработки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СОС для указанных субпопуляций клеток;

на фиг. 42 - полученные *ex vivo* данные, свидетельствующие о том, что окрашивание внутриклеточного Ki-67 в цельной крови является чувствительным биомаркером пролиферации клеток после активации IL-2 *in vivo*. Через 1-14 дней после введения *in vivo* однократной дозы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ обезьянам циномогус собирали образцы цельной крови и сразу же без стимуляции анализировали в отношении внутриклеточного Ki-67 в указанных типах клеток. У каждой обезьяны брали образцы крови в день 0 перед обработкой для определения нестимулированных уровней Ki-67⁺-клеток, с которыми проводили сравнение для определения изменений % Ki-67⁺-клеток после обработки. (А) окрашивание Ki-67 (% от Ki-67⁺-клеток) до и после обработки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) окрашивание Ki-67 (% от Ki-67⁺-клеток) до и после обработки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС для указанных субпопуляций клеток;

на фиг. 43 - итоговое сравнение воздействий *in vivo* IL-2 на Treg циномогус. Представлено максимальное увеличение общих Treg в виде % от CD4⁺-Т-клеток для пролейкина, IgG-IL-2, IgG-(IL-2)₂ и IgG-(IL-2N88D)₂; для целей сравнения все дозы *in vivo* выражены в пмолях/кг. Пролейкин вводили 3 раза в неделю (MWF (понедельник/среда/пятница)) в течение 2 недель, а содержащие IL-2 слитые белки вводили в виде однократной инъекции. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ СОС; пролейкин (n=5), IgG-IL-2 (n=6), IgG-(IL-2)₂ (n=6) и IgG-(IL-2N88D)₂ (n=4);

на фиг. 44 - данные, свидетельствующие о том, что IL-2 в высоких дозах индуцирует эозинофилию у обезьян циномогус. Осуществляли мониторинг изменения количества эозинофилов в крови при проведении всех тестов, как с использованием пролейкина, так и иммуноконъюгатов IL-2. Эозинофилия была выявлена в период с 7 по 14 день после обработки пролейкином в высокой дозе (2×10^5 МЕ/кг, 3 раза в неделю в течение 2 недель) или высокими дозами DP47GS IgG-IL-2, но не DP47GS IgG-(IL-2)₂ или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Исходные количества эозинофилов, обозначенные незакрашенными кружками, показаны на графике в положении, соответствующем дозе IL-2, равной 0, их определяли дважды, один раз при тестировании молекулы IL-2 дикого типа и один раз при тестировании DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО;

на фиг. 45 - данные, свидетельствующие о том, что обработка *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 подавляет у мышей гиперчувствительность замедленного типа, индуцированную бараньими эритроцитами (DTH). Все данные представлены для индивидуальных мышей, обработанных наполнителем (ответ 100%), IgG-IL-2 (4000 МЕ/мышь) или мышиным CTLA-4-Ig в качестве положительного контроля (200 мкг/мышь). (А) результаты для NOD-мышей и (Б) для C57BL/6-мышей. Величины DTH-ответов в день четыре представлены в виде изменения массы лапы по сравнению с неиммунизированными мышами (Δ массы лапы). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО;

на фиг. 46 - Данные, свидетельствующие о том, что обработка *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 (4000 МЕ/мышь) подавляет ответы в виде мышиного антитела IgG-класса на KLH у (А) C57BL/6-мышей через 21 день после иммунизации и (Б) у NOD-мышей через семь дней после иммунизации. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СКО.

Подробное описание изобретения

Определения

Понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, общепринятые в данной области, если ниже специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "слитый белок" относится к слитой молекуле полипептида, содержащей молекулу иммуноглобулина и молекулу IL-2, где компоненты слитого белка сцеплены друг с другом с помощью пептидных связей либо непосредственно, либо через пептидные линкеры. Следует отметить, что индивидуальные пептидные цепи компонента слитого белка, представляющего собой иммуноглобулин, могут быть связаны нековалентно, например, с помощью дисульфидных связей.

Понятие "слитые" относится к компонентам, которые сцеплены пептидными связями либо непосредственно, либо с помощью одного или нескольких пептидных линкеров.

Понятие "специфическое связывание" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность иммуноглобулина связываться со специфическим антигеном можно определять либо с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), либо с помощью других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (осуществляя анализ с помощью устройства BIAcore) (Liljeblad и др., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329) и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одном из вариантов осуществления изобретения степень связывания иммуноглобулина с несоответствующим белком составляет менее примерно 10% от связывания иммуноглобулина с антигеном, при оценке, например, с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноглобулин, который связывается с антигеном, характеризуется константой диссоциации (K_D), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

Понятие "аффинность" или "аффинность связывания" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, антитела и антигена) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации (K_D), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании. Конкретным методом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Понятие "пониженное связывание", например, пониженное связывание с Fc-рецептором или рецептором IL-2, относится к снижению аффинности соответствующего взаимодействия, при оценке, например, с помощью SPR. Следует отметить, что понятие включает также снижение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического метода), т.е. полное отсутствие взаимодействия. И наоборот, понятие "повышенное связывание" относится к повышению аффинности связывания для соответствующего взаимодействия.

В контексте настоящего описания понятие "антигенная детерминанта" является синонимом понятия "антиген" и относится к сайту (например, участку, состоящему из смежных аминокислот, или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антитело с образованием комплекса антитело-антиген. Пригодные антигенные детерминанты можно обнаружить, например, на поверхности клеток, молекул, находящихся в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM).

В контексте настоящего описания понятие "одноцепочечная" относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно сцепленные пептидными связями.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерные антитела (диабоды), линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и однодоменные антитела.

Понятие "молекула иммуноглобулина" относится к белку, имеющему структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к С-концу каждая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит вариабельную область (VH), которую называют также вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой расположены три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, в направлении от N-конца к С-концу каждая легкая цепь иммуноглобулина содержит вариабельную область (VL), которую называют также вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой расположен константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из пяти классов, обозначенных как α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых

дополнительно подразделяют на подклассы, например, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) и α_2 (IgA₂). Легкая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из двух типов, обозначенных как каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин, как правило, состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые соединены через шарнирную область иммуноглобулина.

В контексте настоящего описания понятие "Fab-фрагмент" относится к фрагменту иммуноглобулина, содержащему VL-домен и константный домен легкой цепи (CL) и VH-домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи.

Понятие "класс" антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, который/которая содержится в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина или антитела, который участвует в связывании иммуноглобулина или антитела с антигеном. Однако иммуноглобулин, входящий в слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать вариабельные области, которые не обуславливают антигенсвязывающую специфичность. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) иммуноглобулина или антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Для обеспечения специфичности связывания антигена может быть достаточно одного VH- или VL-домена.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена иммуноглобулина или антитела, последовательности которых являются гипервариабельной, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гипервариабельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Приведенные в качестве примеров гипервариабельные петли включают аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917). Приведенные в качестве примеров CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) включают аминокислотные остатки 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 и 95-102 H3 (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Кроме CDR1, присутствующего в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гипервариабельные петли. CDR содержат также "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые представляют собой остатки, которые контактируют с антигеном. SDR находятся внутри областей CDR, обозначенных как сокращенные-CDR или a-CDR. Приведенные в качестве примера a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 и a-CDR-H3) включают аминокислотные остатки 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35B H1, 50-58 H2 и 95-102 H3 (см. Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, сс. 1619-1633). Если не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) в контексте настоящего описания нумеруют согласно Кэботу с соавторами, выше (обозначают как "нумерация Кэбота").

Понятие "каркасный участок" или "FR" относится к остаткам вариабельных доменов, отличным от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Человеческий иммуноглобулин" представляет собой иммуноглобулин, который имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности иммуноглобулина, продуцируемого в организме человека или в человеческой клетке, или происходящего из нечеловеческого источника, который использует спектры человеческих иммуноглобулинов или другие кодирующие человеческий иммуноглобулин последовательности. Из указанного определения человеческого иммуноглобулина специально исключен гуманизированный иммуноглобулин, содержащий нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

В контексте настоящего описания понятие "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. входящие в популяцию индивидуальные антитела являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, которые, например, содержат встречающиеся в естественных условиях мутации или мутации, возникающие в процессе получения препарата моноклональных антител, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В противоположность препаратам поли-

клональных антител, которые, как правило, включают различные антигены, мишенью которых являются различные детерминанты (эпитопы), мишенью каждого моноклонального антитела из препарата моноклональных антител является одна детерминанта на антигене. Таким образом, прилагательное "моноклональный" относится к характеристике антитела, указывающей на получение из практически гомогенной популяции антител, и его не следует рассматривать как требование, ограничивающее получение антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно получать различными методиками, включая (но, не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, включающие применение трансгенных животных, содержащих весь локус человеческого иммуноглобулина или его часть, указанные методы и другие, приведенные в качестве примера, методы создания моноклональных антител представлены в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-домен" или "Fc-область" применяют для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Под понятие попадают имеющие нативную последовательность Fc-области и варианты Fc-областей. Fc-область IgG содержит CH2-домен IgG и CH3-домен IgG. "CH2-домен" Fc-области человеческого IgG, как правило, простирается от аминокислотного остатка, расположенного примерно в положении 231, до аминокислотного остатка, расположенного примерно в положении 340. В одном из вариантов осуществления изобретения к CH2-домену присоединена углеводная цепь. В контексте настоящего описания CH2-домен может представлять собой имеющий нативную последовательность CH2-домен или вариант CH2-домена. "CH3-домен" содержит сегмент из остатков С-концевых относительно CH2-домена в Fc-области (т.е., начиная с аминокислотного остатка, расположенного примерно в положении 341, до аминокислотного остатка, расположенного примерно в положении 447 IgG). В контексте настоящего описания CH3-участок может представлять собой имеющий нативную последовательность CH3-домен или вариант CH3-домена (например, CH3-домен с интродуцированной "выпуклостью" ("выступ") в одной цепи и соответствующей интродуцированной "полостью" ("впадина") в другой цепи; см. US № 5821333, специально включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Указанные варианты CH3-доменов можно применять для усиления гетеродимеризации двух неидентичных тяжелых цепей иммуноглобулина, согласно указанному в настоящем описании методу. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо может отсутствовать. Если в настоящем описании специально не указано иное, то нумерацию аминокислотных остатков в Fc-области или константной области осуществляли согласно системе нумерации EU, которую называют также EU-индексом, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Понятие "эффекторные функции" относится к видам биологической активности, присущим Fc-области иммуноглобулина, которые варьируются в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Примерами эффекторных функций иммуноглобулинов являются: способность связываться с C1q и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредуемое иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора); и активация В-клеток.

"Активирующий Fc-рецептор" представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью иммуноглобулина вызывает процесс передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку в отношении осуществления эффекторных функций. Активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89). Конкретным активирующим Fc-рецептором является человеческий FcγRIIIa (см. UniProt, регистрационный № P08637 (версия 141)).

В контексте настоящего описания понятие "интерлейкин-2" или "IL-2", если не указано иное, относится к любому нативному IL-2 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы). Под понятие попадает непротессированный IL-2, а также любая форма IL-2, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие попадают также встречающиеся в естественных условиях варианты IL-2, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Приведенная в качестве примера аминокислотная последовательность человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Непротессированный человеческий IL-2 дополнительно содержит расположенный на N-конце состоящий из 20 аминокислот сигнальный пептид, который отсутствует в зрелой молекуле IL-2.

Под "нативным IL-2", который обозначают также как "IL-2 дикого типа", подразумевается встречающийся в естественных условиях IL-2. Последовательность молекулы нативного человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Для целей настоящего изобретения под понятие дикого типа попадают также формы IL-2, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций, которые не изменяют свя-

звание с рецептором IL-2 по сравнению с встречающимся в естественных условиях нативным IL-2, например, замену цистеина в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2, на аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения IL-2 дикого типа для целей настоящего изобретения содержит аминокислотную замену C125A (см. SEQ ID NO: 3).

В контексте настоящего описания понятие "CD25" или " α -субъединица рецептора IL-2", если не указано иное, относится к любой нативной форме CD25 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы). Под это понятие подпадает "полноразмерная" непротессированная форма CD25, а также любая форма CD25, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты CD25, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD25 представляет собой человеческую форму CD25. В качестве примера аминокислотная последовательность человеческой формы CD25 (с сигнальной последовательностью, Avi-меткой и His-меткой) представлена в SEQ ID NO: 25. В контексте настоящего описания понятие "высокоаффинный рецептор IL-2" относится к гетеротримерной форме рецептора IL-2, состоящей из рецепторной γ -субъединицы (которая известна также как общая γ -субъединица цитокинового рецептора, γ_c , или CD 132), рецепторной β -субъединицы (известной также как CD122 или p70) и рецепторной α -субъединицы (известной также как CD25 или p55). В противоположность этому, понятие "рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью" или рецептор IL-2 $\beta\gamma$ относится к рецептору IL-2, который включает только γ -субъединицу и β -субъединицу, но не содержит α -субъединицы (см., например, обзор Olejniczak и Kasprzak, Med Sci Monit 14, 2008, RA179-189). Служащие в качестве примеров аминокислотные последовательности человеческих CD122 и CD132 (слитых с Fc-областью с помощью His-метки) представлены в SEQ ID NO: 21 и 23 соответственно.

Под "регуляторной Т-клеткой" или "Трег-клеткой" подразумевается специализированный тип CD4⁺-Т-клетки, которая может подавлять ответы других Т-клеток (эффекторных Т-клеток). Трег-клетки отличаются способностью экспрессировать α -субъединицу рецептора IL-2 (CD25) и фактор транскрипции forkhead box P3 (FOXP3) (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 2004, сс. 531-562), и они играют решающую роль в индукции и поддержании периферической аутоотолерантности к антигенам, включая те антигены, которые экспрессируются опухолями.

Под "каноническими CD4⁺-Т-клетками" подразумевают CD4⁺-Т-клетки, отличные от регуляторных Т-клеток. Канонические CD4⁺-Т-клетки памяти отличаются тем, что они экспрессируют CD4, CD3, но не экспрессируют FOXP3. "Канонические CD4⁺-Т-клетки памяти" представляют собой субпопуляцию канонических CD4⁺-Т-клеток, которые дополнительно отличаются тем, что не экспрессируют CD45RA в отличие от "канонических наивных CD4⁺-Т-клеток", которые экспрессируют CD45RA.

Под "избирательной активацией Трег-клеток" подразумевается активация Трег-клеток практически без сопутствующей активации других субпопуляций Т-клеток (таких как CD4⁺-Т-клетки-хелперы, цитотоксические CD8⁺-Т-клетки, NK-Т-клетки) или естественные клетки-киллеры (NK)). Методы идентификации и различения этих типов клеток описаны в примерах. Активация может включать индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор (что измеряют, например, путем оценки фосфорилированного STAT5a), индукцию пролиферации (что измеряют, например, путем оценки Ki-67) и/или повышающую регуляцию экспрессии маркеров активации (таких, например, как CD25).

Понятие "пептидный линкер" относится к пептиду, содержащему одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот. Пептидные линкеры известны в данной области и указаны в настоящем описании.

Приемлемые неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры (G₄S)_n, (SG₄)_n или G₄(SG₄)_n - "n" обычно означает число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

Понятие "модификация" относится к любой манипуляции, затрагивающей пептидный каркас (например, аминокислотную последовательность), или к посттрансляционным модификациям (например, гликозилирование) полипептида.

Понятие "модификация по типу "knob-into-hole" (обеспечение взаимодействия по типу "выступ-во впадину") относится к модификации в поверхности раздела между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина в СНЗ-доме, при которой I) в СНЗ-доме одной тяжелой цепи аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость ("выступ") на поверхности раздела в СНЗ-доме одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость ("впадину") в поверхности раздела СНЗ-доме другой тяжелой цепи, и II) в СНЗ-доме другой тяжелой цепи аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость ("впадину") в поверхности раздела второго СНЗ-доме, в которую может помещаться выпуклость ("выступ") на поверхности раздела первого СНЗ-доме. В одном из вариантов осуществления изобретения "модификация knob-into-hole" включает аминокислотную замену T366W и необязательно аминокислотную замену S354C в одной из тяжелых цепей антитела и аминокислотные замены T366S, L368A, Y407V и необязательно Y349C в другой одной из тяжелых цепей антитела. Технология "knob-into-hole" описана, например, в US № 5731168; US №

7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и у Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15. Как правило, метод заключается в том, что интродуцируют выпуклость ("выступ") на поверхность раздела первого полипептида и соответствующую полость ("впадину") в поверхности раздела второго полипептида, так, чтобы выпуклость могла помещаться в полость, облегчая образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости создают путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Компенсирующие полости размера, идентичного или сходного с размером выпуклости, создают в поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с боковыми цепями меньшего размера (например, аланин или треонин). Интродукция двух остатков цистеина в положение S354 и Y349 соответственно приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя тяжелыми цепями антитела в Fc-области, дополнительно стабилизирующего димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

Аминокислотная "замена" означает замену в полипептиде одной аминокислоты на другую аминокислоту. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислоту заменяют на другую аминокислоту, имеющую сходные структурные и/или химические свойства, например, осуществляют консервативные аминокислотные замены. "Консервативные" аминокислотные замены можно осуществлять на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобной, гидрофильной и/или амфипатической природы остатков. Например, к неполярным (гидрофобным) аминокислотам относятся аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; к полярным нейтральным аминокислотам относятся глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; к положительно заряженным (основным) аминокислотам относятся аргинин, лизин и гистидин; и к отрицательно заряженным (кислотным) аминокислотам относятся аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Неконсервативные замены должны приводить к обмену представителя одного из этих классов на представителя другого класса. Например, аминокислотные замены могут приводить также к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства, например, замену аминокислоты из одной группы (например, полярную) на другую аминокислоту из другой группы (например, основную). Аминокислотные замены можно создавать, используя генетические или химические методы, хорошо известные в данной области. Генетические методы могут включать сайгнправленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно использовать методы изменения группы боковой цепи аминокислоты с помощью методов, отличных от методов генетической инженерии, таких как химическая модификация. В контексте настоящего описания можно применять различные обозначения одной и той же аминокислотной замены. Например, замену пролина в положении 329 тяжелой цепи иммуноглобулина на глицин можно обозначать как 329G, G329, G₃₂₉. P329G или Pro329Gly.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться. В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей для данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б (что другими словами можно обозначать как то, что данная аминокислотная последовательность А имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б), рассчитывают следующим образом:

$100 \times \text{частное } X/Y,$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и Б с помощью указанной программы, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности Б не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", которое применяют взаимозаменяемо в контексте настоящего описания, относится к полимерам нуклеотидов любой длины и включает ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который можно включать в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимераз или с помощью реакции синтеза. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. В последовательности нуклеотидов могут присутствовать соединения, не относящиеся к нуклеотидам. Полинуклеотид может содержать модификацию(и), созданную(ые) после синтеза, такую(ие) как конъюгация с меткой.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевается нуклеотидная последовательность полинуклеотида, идентичная референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

В контексте настоящего описания понятие "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью увеличивать количество другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые

векторы обладают способностью обеспечивать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. В контексте настоящего описания указанные векторы обозначают как "экспрессионные векторы".

В контексте настоящего описания понятия "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки, а также выведенное из них потомство, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, которую можно использовать для создания слитых белков, предлагаемых в настоящем изобретении. Клетки-хозяева включают (но, не ограничиваясь только ими) культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как CHO-клетки, BHK-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, YO-клетки миеломы, P3X63-клетки мышинной миеломы, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или культивируемой ткани растения или животного.

Понятие "эффективное количество" агента относится к количеству, необходимому для достижения физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

"Терапевтически эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, означает количество, эффективное в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата. Агент в терапевтически эффективном количестве, например, элиминирует, снижает, замедляет, минимизирует или предупреждает нежелательные действия заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, в которой он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие "аутоиммунное заболевание" относится к незлокачественному заболеванию или нарушению, возникающему в собственных тканях пациента и направленному против собственных тканей. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают (но, не ограничиваясь только ими) воспалительные ответы, такие как кожные воспалительные заболевания, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); ответы, ассоциированные с воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта (такие как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит); дерматит; аллергические состояния, такие как экзема и астма; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (SLE) (включая (но, не ограничиваясь только ими) волчаночный нефрит, кожную волчанку); сахарный диабет (например, сахарный диабет типа 1 или инсулинзависимый сахарный диабет); рассеянный склероз и юношеский диабет.

Слитые белки, предлагаемые в изобретении В изобретении предложены новые слитые белки иммуноглобулин-IL-2, обладающие наиболее предпочтительными свойствами для применения в терапевтических методах, представленных в настоящем описании.

Первым объектом настоящего изобретения является слитый белок, содержащий (I) молекулу иммуноглобулина и (II) две мутантные молекулы интерлейкина-2 (IL-2), имеющие аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок практически состоит из молекулы иммуноглобулина, двух мутантных молекул интерлейкина-2 (IL-2), имеющих аминокислотную мутацию, снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа, и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров.

Как продемонстрировано в разделе "Примеры", неожиданно было установлено, что слитый белок, содержащий две молекулы IL-2, обладает существенно более высокой эффективностью и селективностью в отношении активации регуляторных Т-клеток по сравнению с соответствующим слитым белком, содержащим одну молекулу IL-2. Кроме того, только слитый белок, содержащий две (в отличие от содержащего только одну) мутантные молекулы IL-2 с пониженной способностью к связыванию с обладающим промежуточной аффинностью рецептором IL-2, сохраняет значительную стимулирующую активность в отношении регуляторных Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу иммуноглобулина IgG-класса, прежде всего молекулу иммуноглобулина IgG₁-подкласса. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой человеческую молекулу иммуноглобулина, т.е. она содержит полностью человеческие переменные и константные области. Приведенная в качестве примера последовательность кон-

стантной области человеческого IgG₁ представлена в SEQ ID NO: 8. Молекула иммуноглобулина IgG-класса содержит (I) две легкие цепи иммуноглобулина, каждая из которых содержит в направлении от N-к С-концу вариабельный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL), и (II) две тяжелые цепи иммуноглобулина, каждая из которых содержит в направлении от N-конца к С-концу вариабельный домен тяжелой цепи (VH), константный домен 1 тяжелой цепи (CH1), шарнирную область иммуноглобулина, CH2-домен и CH3-домен. Два последних домена образуют часть Fc-области молекулы иммуноглобулина. Две тяжелые цепи димеризованы в Fc-области.

В одном из вариантов слитого белка, предлагаемого в изобретении, каждая из указанных двух молекул мутантного IL-2 слита на своей N-концевой аминокислоте с С-концевой аминокислотой одной из иммуноглобулиновых тяжелых цепей указанной молекулы иммуноглобулина, необязательно через пептидный линкер. Слияние двух (идентичных) молекул IL-2 с тяжелыми цепями иммуноглобулина облегчает получение слитого белка, позволяя избежать образования нежелательных побочных продуктов и позволяя устранять необходимость в модификациях, усиливающих гетеродимеризацию неидентичных тяжелых цепей, таких как модификация "knob-into-hole".

В некоторых вариантах слитого белка, предлагаемого в изобретении, указанные две мутантные молекулы IL-2 слиты с указанной молекулой иммуноглобулина через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных двух мутантных молекул IL-2 слита с указанной молекулой иммуноглобулина через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных двух мутантных молекул IL-2 слита на своей N-концевой аминокислоте с С-концевой аминокислотой одной из иммуноглобулиновых тяжелых цепей указанной молекулы иммуноглобулина через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных мутантных молекул IL-2 слита с указанной молекулой иммуноглобулина через пептидный линкер, имеющий идентичную аминокислотную последовательность. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит по меньшей мере 10 аминокислот. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит по меньшей мере 15 аминокислот. Не вдаваясь в конкретную теорию, можно считать, что пептидный линкер такой длины может обеспечивать гибкость для оптимального связывания мутантных молекул IL-2 с рецептором IL-2, прежде всего с высокоаффинным (гетеротримерным) рецептором IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит 15 аминокислот. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер имеет длину 15 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер состоит из 15 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

Слияние молекул IL-2 с молекулой иммуноглобулина обеспечивает благоприятные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке (вследствие рециркуляции из-за связывания с FcRn и благодаря тому, что молекулярный размер в достаточной степени превышает пороговый для почечной фильтрации), по сравнению со свободным (неслитым) IL-2. Кроме того, присутствие молекулы иммуноглобулина может облегчать также очистку слитых белков, например, с использованием аффинной хроматографии на белке А. Важно отметить, что, как продемонстрировано в разделе "Примеры", слитый белок, содержащий две мутантные молекулы IL-2 с пониженной аффинностью к связыванию с обладающим промежуточной аффинностью рецептором IL-2, имеет более продолжительное время полужизни в сыворотке, чем соответствующий слитый белок, содержащий две молекулы IL-2 дикого типа. Слияние с молекулой иммуноглобулина, т.е. с встречающимся в естественных условиях типом молекулы, может также минимизировать токсичность слитого белка посредством образования антител к лекарственному средству.

Хотя присутствие молекулы иммуноглобулина, прежде всего Fc-области молекулы иммуноглобулина, оказывает благоприятное влияние на фармакокинетические характеристики слитого белка, оно может приводить в то же самое время к нежелательному направленному воздействию слитого белка на клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, а не на предпочтительные клетки, которые несут рецептор IL-2. Кроме того, вовлечение Fc-рецепторов может приводить к высвобождению (провоспалительных) цитокинов и нежелательной активации различных иммунных клеток, отличных от регуляторных Т-клеток. По этой причине указанная молекула иммуноглобулина, входящая в слитый белок, предлагаемый в изобретении, содержит модификацию, снижающую аффинность связывания молекулы иммуноглобулина с Fc-рецептором по сравнению с соответствующей молекулой иммуноглобулина без указанной модификации. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор, прежде всего, человеческий Fcγ-рецептор. Аффинность связывания с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя стандартный инструментальный, такой как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), а сами Fc-

рецепторы можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан ниже. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения аффинность связывания с Fc-рецептором измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare), при 25°C применяя лиганд (Fc-рецептор), иммобилизованный на CM5-чипах. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Рекомбинантный лиганд разводили 10мМ ацетатом натрия, pH 5,5 до концентрации 0,5-30 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин для достижения уровня связывания слитого белка, соответствующего примерно 100-5000 единиц ответа (RU). После инъекции лиганда инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали трех-пятикратные серийные разведения антитела (диапазон от ~0,01 до 300 нМ) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока примерно 30-50 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа оценки BIACORE® T100, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (K_D) рассчитывали в виде отношения k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Альтернативно этому, аффинность связывания антител с Fc-рецепторами можно оценивать, используя клеточные линии, которые, как известно, экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, например, NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

В одном из вариантов осуществления изобретения модификация включает одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания иммуноглобулина с Fc-рецептором. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. Как правило, одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций присутствуют в каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация снижает аффинность связывания иммуноглобулина с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В вариантах осуществления изобретения, в которых присутствовало более одной аминокислотной мутации, снижающей аффинность связывания иммуноглобулина с Fc-рецептором, комбинация этих аминокислотных мутаций могла снижать аффинность связывания иммуноглобулина с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или даже по меньшей мере в 50 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения для указанной молекулы иммуноглобулина характерно менее 20%, предпочтительно менее 10%, более предпочтительно менее 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для соответствующей молекулы иммуноглобулина без указанной модификации.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой активированный Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный Fc-рецептор выбирают из группы, включающей FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89). В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор, более конкретно рецептор FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa. Предпочтительно снижается аффинность связывания с каждым из этих рецепторов. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанный Fc-рецептор представляет собой FcγIIIa, прежде всего, человеческий FcγIIIa. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения снижается также аффинность связывания с компонентом системы комплемента, в частности, аффинность связывания с C1q. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения не снижается аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Практически такое же связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания молекулы иммуноглобулина с указанным рецептором, достигается, когда молекула иммуноглобулина характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn немодифицированной формы молекулы иммуноглобулина. Молекулы иммуноглобулина, входящие в слитые белки, предлагаемые в изобретении, могут характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной аффинности.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация, снижающая аффинность связывания молекулы иммуноглобулина с Fc-рецептором, находится в Fc-области, прежде всего, в CH2-области, молекулы иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотную замену в положении 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, прежде всего P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные аминокислотные замены представляют собой L234A и L235A (LALA). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит ами-

нокислотную замену в положении 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей антитела и дополнительную аминокислотную замену в положении, выбранном из положений 228, 233, 234, 235, 297 и 331 тяжелых цепей иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (LALA P329G) в тяжелых цепях иммуноглобулина. Указанная комбинация аминокислотных замен наиболее эффективно элиминирует связывание Fcγ-рецептора с человеческим иммуноглобулином IgG-класса, что описано в публикации PCT WO 2012/130831, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В публикации PCT WO 2012/130831 описаны также методы получения указанного модифицированного иммуноглобулина и методы определения его свойств, таких как связывание Fc-рецептора или эффекторные функции.

Иммуноглобулины, содержащие модификации в тяжелых цепях иммуноглобулина, можно получать путем аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации, используя генетические или химические методы, хорошо известные в данной области. Генетические методы могут представлять собой сайтнаправленный мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильные нуклеотидные замены можно подтверждать, например, секвенированием.

Иммуноглобулины или антитела, которые содержат модификации, снижающие связывание с Fc-рецептором, как правило, обладают пониженными эффекторными функциями, прежде всего пониженной ADCC, по сравнению с соответствующими немодифицированными иммуноглобулинами или антителами. Так, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация, снижающая аффинность связывания молекулы иммуноглобулина с Fc-рецептором, снижает эффекторную функцию молекулы иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная эффекторная функция представляет собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC). В одном из вариантов осуществления изобретения ADCC снижается до уровня, составляющего менее 20% от ADCC, индуцируемой соответствующей молекулой иммуноглобулина без указанной модификации. Эффекторную функцию иммуноглобулина или антитела можно оценивать с помощью методов, известных в данной области. Примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы описаны в US № 5500362; у Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann и др., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы анализы, не основанные на измерении радиоактивности (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью шт. Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Ценными эффекторными клетками для таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, описанной у Clynes и др., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается также связывание молекулы иммуноглобулина с компонентом системы комплемента, в частности, с C1q. Таким образом, можно снизить также компонентзависимую цитотоксичность (CDC). Анализы связывания C1q можно осуществлять для решения вопроса о том, обладает ли иммуноглобулин способностью связываться с C1q и, следовательно, обладает ли он CDC-активностью (см., например, анализ связывания C1q и C3c с помощью ELISA, описанный в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для анализа активации комплемента можно осуществлять CDC-анализ (см., например, Gazzano-Santoro и др., J Immunol Methods 202, 1996, с.163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

Помимо молекул иммуноглобулина, описанных выше и в публикации PCT WO 2012/130831, иммуноглобулины с пониженной способностью связываться с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией включают также иммуноглобулины с заменой в Fc-области одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (US № 6737056). Указанные Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или большем количестве аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc-мутант "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

Иммуноглобулины IgG₄-подкласса обладают пониженной аффинностью связывания с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с IgG₁-иммуноглобулинами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина, входящая в слитый белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой иммуноглобулин IgG₄-подкласса, прежде всего человеческий иммуноглобулин IgG₄-подкласса. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный иммуноглобулин IgG₄-подкласса содержит аминокислотные замены в Fc-области в положении S228 (EU-нумерация), в частности, аминокислотную замену S228P. Для дополни-

тельного снижения его аффинности связывания с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции в одном из вариантов осуществления изобретения указанный иммуноглобулин IgG₄-подкласса содержит аминокислотную замену в положении L235 (EU-нумерация), в частности, аминокислотную замену L235E. В другом варианте осуществления изобретения указанный иммуноглобулин IgG₄-подкласса содержит аминокислотную замену в положении P329 (EU-нумерация), в частности, аминокислотную замену P329G. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный иммуноглобулин IgG₄-подкласса содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329 (EU-нумерация), в частности, аминокислотные замены S228P, L235E и P329G. Такие модифицированные иммуноглобулины IgG₄-подкласса и их способности связываться с Fcγ-рецепторами описаны в публикации PCT WO 2012/130831, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина обладает способностью специфически связываться с антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина представляет собой моноклональное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина не обладает способностью специфически связываться с антигеном, прежде всего не обладает способностью специфически связываться с человеческим антигеном. Отсутствие способности к специфическому связыванию указанной молекулы иммуноглобулина с антигеном (т.е. отсутствие какого-либо связывания, которое можно отличить от неспецифического взаимодействия) можно определять, например, с помощью ELISA или поверхностно плазмонного резонанса, указанного в настоящем описании. Указанная молекула иммуноглобулина является наиболее ценной, например, для удлинения времени полужизни в сыворотке слитого белка, для которого не требуется направленное воздействие на конкретную ткань.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vh3-23. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 9. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vk3-20. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 11. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11. Молекулы иммуноглобулинов, содержащие указанные последовательности вариабельных областей, не обладают способностью специфически связываться с антигеном, прежде всего человеческим антигеном. У них отсутствует способность связываться со здоровыми тканями, а также PBMC, они не обладают множественной реактивностью и для них не характерно неспецифическое накопление *in vivo* по данным визуализации (данные не представлены). Последовательности вариабельных областей полностью основаны на последовательностях человеческих зародышевых линий за исключением того, что в CDR3 тяжелой цепи интродуцирована последовательность GSG для создания несвязывающегося иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 88 человеческого IL-2 (SEQ ID NO: 1). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена выбирают из группы N88D, N88R, N88I и N88G. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой N88D. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 представляют собой человеческие молекулы IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат последовательность SEQ ID NO: 60 (IL-2 N88D). В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат только одну аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 не содержат аминокислотную мутацию, которая изменяет аффинность мутантной молекулы IL-2 к высокоаффинному рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат только одну аминокислотную мутацию, которая изменяет аффинность мутантной молекулы IL-2 к рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 дополнительно содержат аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой C125A. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат последовательность SEQ ID NO: 62 (IL-2 N88D с аминокислотной заменой C125A). В альтер-

нативном варианте цистеин в положении 125 можно заменять на другую нейтральную аминокислоту, такую как серин, треонин или валин, получая C125S IL-2, C125T IL-2 или C125V IL-2 соответственно, как описано в U.S. № 4518584. Как указано в этом патенте, можно также исключать N-концевой остаток аланина в IL-2, получая в результате такие мутанты, как des-A1 C125S или des-A1 C125A. Альтернативно или дополнительно молекула IL-2 может включать мутацию, в результате которой метионин, который, как правило, присутствует в естественных условиях в положении 104 человеческого IL-2 дикого типа, заменен на нейтральную аминокислоту, такую как аланин (см. U.S. № 5206344). Такие модификации в человеческом IL-2 могут придавать дополнительные преимущества, такие как повышенная экспрессия или стабильность.

Мутантные молекулы IL-2, входящие в слитый белок, предлагаемый в изобретении, могут представлять собой также негликозилированные молекулы IL-2. Например, элиминация сайта О-гликозилирования в молекуле IL-2 позволяет получать более гомогенный продукт при экспрессии слитого белка в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO или HEK. Так, в некоторых вариантах осуществления изобретения мутантные молекулы IL-2 дополнительно содержат модификацию, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2, представляет собой аминокислотную замену. Примерами аминокислотных замен являются T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K и T3P. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой аминокислотную замену T3A. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат последовательность SEQ ID NO: 64 (IL-2 T3A N88D).

В конкретном варианте осуществления изобретения мутантные молекулы IL-2 содержат аминокислотные замены T3A, N88D и C125A. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные мутантные молекулы IL-2 содержат последовательность SEQ ID NO: 58 (IL-2 T3A N88D C125A). В одном из вариантов осуществления изобретения связывание слитого белка, предлагаемого в изобретении, с рецептором IL-2 $\beta\gamma$ снижают по меньшей мере в 1,5 раза, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза или по меньшей мере в 3 раза по сравнению со связыванием соответствующего слитого белка, содержащего две молекулы IL-2 дикого типа, с рецептором IL-2 $\beta\gamma$. В одном из вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в изобретении, связывается с рецептором IL-2 $\beta\gamma$ с константой аффинности (K_D), которая превышает по меньшей мере в 2 раза величину K_D соответствующего слитого белка, содержащего две молекулы IL-2 дикого типа, по данным измерений методом SPR при 25°C. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный рецептор IL-2 $\beta\gamma$ представляет собой человеческий указанный рецептор IL-2 $\beta\gamma$. В одном из вариантов осуществления изобретения связывание слитого белка, предлагаемого в изобретении, с рецептором IL-2 α примерно равно связыванию соответствующего слитого белка, содержащего две молекулы IL-2 дикого типа, с рецептором IL-2 α . В одном из вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в изобретении, связывается с рецептором IL-2 α с константой аффинности (K_D), которая примерно равна величине K_D соответствующего слитого белка, содержащего две молекулы IL-2 дикого типа, по данным измерений методом SPR при 25°C. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный рецептор IL-2 α представляет собой человеческий указанный рецептор IL-2 α . Метод оценки аффинности связывания с рецептором IL-2 $\beta\gamma$ или рецептором IL-2 α с помощью SPR представлен в настоящем описании. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения аффинность связывания (K_D) измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare), при 25°C с применением рецепторов IL-2, иммобилизованных на CM5-чипах или сенсibilизированных стрептавидином чипах. Константу аффинности (K_D) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

Конкретным объектом изобретения является слитый белок, содержащий (I) молекулу иммуноглобулина IgG₁-подкласса, которая содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (EУ-нумерация) в тяжелых цепях иммуноглобулина, и (II) две содержащие аминокислотную замену N88D мутантные молекулы интерлейкина-2 (IL-2), каждая из которых слита на N-концевой аминокислоте с C-концевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина через пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина и указанные молекулы IL-2 являются человеческими. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и последовательность вариabельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, каждая из указанных молекул IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58. В другом варианте осуществления изобретения указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанный слитый белок содержит полипептидную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% последовательности SEQ ID NO: 50, и полипептидную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80,

85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% последовательности SEQ ID NO: 19.

Как продемонстрировано в примерах, слитый белок, предлагаемый в изобретении, избирательно активирует регуляторные Т-клетки (т.е. практически без сопутствующей активации других субпопуляций Т-клеток и/или естественных клеток-киллеров (NK-клеток)). Так, один из объектов изобретения относится к слитому белку, содержащему молекулу иммуноглобулина и две мутантные молекулы IL-2, где указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки по сравнению с эффекторными Т-клетками и NK-клетками, прежде всего по сравнению с каноническими CD4⁺-Т-клетками, CD8⁺-Т-клетками и NK-клетками. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок активирует регуляторные Т-клетки по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз в большей степени, чем эффекторные Т-клетки и NK-клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки по сравнению с каноническими CD4⁺-Т-клетками памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный слитый белок активирует регуляторные Т-клетки по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз в большей степени, чем канонические CD4⁺-Т-клетки памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения указанную активацию определяют путем измерения уровней фосфорилирования внутриклеточного STAT, прежде всего STAT5. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное измерение уровней фосфорилирования внутриклеточного STAT осуществляют с помощью проточного цитометрического анализа. В одном из вариантов осуществления изобретения величина EC₅₀ для указанного слитого белка, характеризующая индукцию передачи сигнала рецептора IL-2 в регуляторных Т-клетках, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз меньше, чем величина EC₅₀, характеризующая индукцию передачи сигнала рецептора IL-2 в эффекторных Т-клетках и NK-клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная индукция передачи сигнала рецептора IL-2 представляет собой индукцию фосфорилирования STAT. В одном из вариантов осуществления изобретения величина EC₅₀, характеризующая индукцию передачи сигнала рецептора IL-2 в регуляторных Т-клетках, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз меньше, чем величина EC₅₀, характеризующая индукцию передачи сигнала рецептора IL-2 в канонических CD4⁺-Т-клетках памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная индукция передачи сигнала рецептора IL-2 представляет собой индукцию фосфорилирования STAT.

В другом объекте изобретения предложен слитый белок прежде всего для применения с целью избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное применение заключается в том, что приводят в контакт регуляторные Т-клетки с указанным слитым белком *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное применение заключается дополнительно в том, что приводят в контакт другие (отличные от регуляторных) Т-клетки с указанным слитым белком. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное применение представляет собой применение *in vitro*, и указанный слитый белок применяют в концентрации примерно 10 нг/мл или менее, предпочтительно примерно 1 нг/мл или менее. В другом варианте осуществления изобретения указанное применение представляет собой применение *in vivo*, и указанный слитый белок применяют в дозе, составляющей примерно 100 мкг/кг веса тела или менее, прежде всего примерно 25 мкг/кг веса тела или менее, более предпочтительно примерно 10 мкг/кг веса тела или менее (где понятие "вес тела" относится к весу тела индивидуума, которому вводят слитый белок).

Изобретение относится также к способу избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*, заключающемуся в том, что приводят в контакт указанные регуляторные Т-клетки со слитым белком, предлагаемым в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный способ заключается дополнительно в том, что приводят в контакт другие (отличные от регуляторных) Т-клетки с указанным слитым белком. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная активация включает индукцию пролиферации и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный способ представляет собой способ *in vitro*, и указанный слитый белок используют в концентрации примерно 10 нг/мл или менее, в частности, примерно 1 нг/мл или менее. В другом варианте осуществления изобретения указанный способ представляет собой способ *in vivo*, и указанный слитый белок используют в дозе примерно 100 мкг/кг веса тела или менее, предпочтительно примерно 25 мкг/кг веса тела или менее, более предпочтительно примерно 10 мкг/кг веса тела или менее (где понятие "вес тела" относится к весу тела индивидуума, которому вводят слитый белок).

В некоторых вариантах слитого белка, применения или способа, описанных в предыдущих параграфах, указанная активация включает индукцию пролиферации регуляторных Т-клеток и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор в регуляторных Т-клетках. Индукцию пролиферации можно измерять, например, путем определения внутриклеточного маркера пролиферации Ki-67 согласно методу, описанному в примерах. В одном из вариантов осуществления изобретения пролиферация регуляторных Т-клеток, активированных слитым белком, предлагаемым в изобретении, повышается по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза или по меньшей мере примерно в 3 раз по срав-

нению с пролиферацией неактивированных регуляторных Т-клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения пролиферация других (отличных от регуляторных) Т-клеток и/или НК-клеток, контактирующих со слитым белком, предлагаемым в изобретении, повышается менее чем примерно в 1,5 раза, менее чем примерно в 1,2 раза или менее чем примерно в 1,1 раза по сравнению с пролиферацией соответствующих клеток, которые не имели контакта с указанным слитым белком. Индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор можно измерять, например, путем определения фосфолированного STAT5 согласно методу, описанному в примерах. В одном из вариантов осуществления изобретения, передача сигналов через IL-2 рецептор в регуляторных Т-клетках, активированных слитым белком, предлагаемым в изобретении, повышается по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза или по меньшей мере примерно в 5 раз по сравнению с передачей сигналов через IL-2-рецептор в неактивированных регуляторных Т-клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения передача сигналов через IL-2-рецептор в других (отличных от регуляторных) Т-клетках и/или НК-клетках, контактирующих со слитым белком, предлагаемым в изобретении, повышается менее чем примерно в 1,5 раза или менее чем примерно в 1,2 раза, или менее чем примерно в 1,1 раза по сравнению с передачей сигналов через IL-2-рецептор в соответствующих клетках, которые не имели контакта с указанным слитым белком.

Полинуклеотиды

Изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим слитый белок, указанный в настоящем описании, или его фрагмент.

Полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают полинуклеотиды, последовательность которых по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 и 65, включая их функциональные фрагменты или варианты.

Полинуклеотиды, кодирующие слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полный слитый белок, или в виде нескольких (например, двух или большего количества) полинуклеотидов, для которых характерна совместная экспрессия. Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, которые совместно экспрессируются, могут быть связаны посредством, например, дисульфидных мостиков или других средств, с образованием функционального слитого белка. Например, область, содержащая легкую цепь иммуноглобулина, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего область, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны быть ассоциированы с полипептидами легкой цепи с образованием иммуноглобулина.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность вариативной области, представленную в SEQ ID NO: 9 или 11. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 или 50. Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 или 65. Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 или 65. Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую последовательность вариативной области, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или 11. Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, кодирующий слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 или 50. Изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую последовательности вариативных областей SEQ ID NO: 9 или 11 с консервативными аминокислотными заменами. Изобретение относится также к полинуклеотиду, кодирующему слитый белок, который содержит молекулу иммуноглобулина и две молекулы IL-2, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19 или 50 с консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представ-

ляет собой ДНК. В других вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

Методы рекомбинации

Слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазного синтеза Меррифила) или методами рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих слитый белок (фрагмент), например, описанный выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из вариантов осуществления изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность слитого белка (фрагмента) наряду с приемлемыми контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и *in vivo* рекомбинации/генетической рекомбинации (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий слитый белок (фрагмент) (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В контексте настоящего описания "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например, в индивидуальном векторе, или в различных полинуклеотидных конструкциях, например, в различных векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипептидов, которые пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с первым или вторым полинуклеотидом, который кодирует слитый белок (фрагмент), предлагаемый в изобретении, их или варианты или производные. Гетерологичные кодирующие области включают (но, не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного продукта, или не оказывает воздействия на способность ДНК-матрицы к транскрипции. Таким образом, промоторная область должна быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор обладает способностью осуществлять транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой специфический для клетки промотор, который обеспечивает значительную транскрипцию ДНК только в предварительно отобранных клетках. Другие контролирующие транскрипцию элементы, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, можно функционально связывать с полинуклеотидом для обеспечения специфической для клетки транскрипции.

Приемлемые промоторы и другие контролирующие транскрипцию области представлены в настоящем описании. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих транскрипцию областей. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных животных, такие как (но, не ограничиваясь только ими) сегменты промоторов и энхансеров из цитомегаловирусов (например, немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном -A), обезьяньего вируса 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, выведенные из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего

гормона роста и кроличьего β -глобина, а также другие последовательности, которые могут контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные приемлемые контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклином). Аналогично этому, обычным специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих трансляцию элементов. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) сайты связывания рибосом, кодоны инициации трансляции и терминирующие кодоны и элементы, выведенные из вирусных систем (в частности, внутренний сайт связывания (посадки) рибосом или IRES, который обозначают также как CITE-последовательность). Кассета экспрессии может включать также другие характерные структуры, такие как сайт инициации репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция слитого белка, то ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменять на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной β -глюкуронидазы. Примеры аминокислотных и полинуклеотидных последовательностей секреторных сигнальных пептидов представлены в SEQ ID NO: 39-47.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облегчения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку), или предназначенную для меченя слитого белка, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего слитый белок (фрагмент). Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в сочетании, указанными в настоящем описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит вектор (например, трансформирована или трансфектирована им), содержащим полинуклеотид, который кодирует слитый белок (часть слитого белка), предлагаемого в изобретении. В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения слитых белков, предлагаемых в изобретении, или их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии слитых белков, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения слитого белка в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, прежде всего в тех случаях, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток

беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁺-CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. B.K.C. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетку почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидную клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp20).

В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий либо тяжелую, либо легкую цепь иммуноглобулина, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходила экспрессия также других цепей иммуноглобулина, так, чтобы экспрессируемый продукт, представляя собой иммуноглобулин, который содержит как тяжелую, так и легкую цепь.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения слитого белка, предлагаемого в изобретении, где способ заключается в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, который кодирует слитый белок, представленный в настоящем описании, в условиях, пригодных для экспрессии слитого белка, и выделяют слитый белок из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

В слитых белках, предлагаемых в изобретении, компоненты (молекула иммуноглобулина и молекула IL-2) генетически сливают друг с другом. Слитые белки можно создавать так, чтобы их компоненты сливать друг с другом непосредственно или опосредованно через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать его эффективность. Дополнительные последовательности можно включать также в сайт расщепления для разделения при необходимости индивидуальных компонентов слитого белка, например, распознаваемую эндопептидазой последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения слитые белки, предлагаемые в изобретении, содержат по меньшей мере переменную область иммуноглобулина, которая обладает способностью связываться с антигеном. Переменные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут происходить из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в US № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей (см., например, US № 5969108 на имя McCafferty).

Согласно изобретению можно применять любые виды иммуноглобулинов животного происхождения. Примеры иммуноглобулинов, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают (но, не ограничиваясь только ими) иммуноглобулины мышей, приматов или человека. Если слитый белок предназначен для применения на человеке, то можно применять химерную форму иммуноглобулина, в которой константные области иммуноглобулина получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму иммуноглобулина можно получать также с помощью ме-

тодов, хорошо известных в данной области (см., например, US № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющие решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческий каркасный участок и константные области, или (в) трансплантация полностью нечеловеческих переменных доменов и их "маскировка" напоминающим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизированных антител и методов их получения см., например, у Almagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; U.S. №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immun* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (описание "повторного покрытия"); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR). Предпочтительные иммуноглобулины, предлагаемые в изобретении, представляют собой человеческие иммуноглобулины. Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать с помощью различных методик, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Человеческие переменные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно создавать также путем выделения последовательностей переменных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); и McCafferty и др., *Nature* 348, сс. 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv- (scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноглобулины, входящие в слитые белки, предлагаемые в настоящем изобретении, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания, например, с помощью методов, описанных в публикации PCT WO 2011/020783 (см. примеры, касающиеся созревания аффинности) или публикации заявки на патент США № 2004/0132066, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Способность слитых белков, предлагаемых в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными специалисту в данной области, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (Liljebäck и др., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в условиях конкуренции можно применять для идентификации антитела, конкурирующего с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается референс-антитело. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols" в: *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с антигеном, и второе немеченое антитело, которое подлежит тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с антигеном. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с антигеном.

(см. Harlow и Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Слитые белки, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается слитый белок. Для очистки, например, с помощью аффинной хроматографии слитых белков, предлагаемых в изобретении, можно использовать матрикс с белком А или белком G. Например, последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения слитого белка, практически согласно методу, описанному в разделе "Примеры". Чистоту слитых белков можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что слитые белки, которые экспрессировали согласно описанным в разделе "Примеры" методам, являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (см., например, фиг. 4).

Композиции, препаративные формы и пути введения Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любой из слитых белков, представленных в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из слитых белков, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из слитых белков, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное ниже.

Кроме того, представлен способ получения слитого белка, предлагаемого в изобретении, в форме, пригодной для введения *in vivo*, заключающийся в том, что (а) получают слитый белок, предлагаемый в изобретении, и (б) объединяют в препаративной форме слитый белок по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, где приготовленный препарат слитого белка пригоден для применения *in vivo*.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве один или несколько слитых белков, который(ые) растворен(ы) или диспергирован(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом, нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при соответствующем введении животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один слитый белок и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, очевидно, что препараты, предназначенные для введения животному (например, человеку), должны удовлетворять требованиям стандартов стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, разработанных отделением биологических стандартов FDA (Управление контроля пищевых продуктов и лекарственных средств) или соответствующим уполномоченным органом других стран. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибные агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие абсорбцию агенты, соли, белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители и подобные материалы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области (см., например, справочник *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Любой общепринятый носитель, если только он совместим с действующим веществом, можно применять в терапевтических или фармацевтических композициях.

Композиция может содержать различные типы носителей в зависимости от того, вводят ли ее в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должна ли она быть стерильной, как в случае использования таких путей введения, как инъекция. Слитые белки, предлагаемые в настоящем изобретении (и дополнительное терапевтическое средство), можно вводить с помощью любого метода или любой комбинации методов, известных обычному специалисту в данной области (см., например, справочник Rem-

ington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Для введения полипептидных молекул, таких как слитые белки, предлагаемые в изобретении, наиболее часто применяют парентеральное введение, прежде всего, внутривенную инъекцию.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например, подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подбололочечной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно включать в препаративные формы в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Раствор может содержать предназначенные для получения препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, слитые белки могут находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением приемлемым наполнителем, например, стерильной не содержащей пирогенов водой. Стерильные инъекционные растворы приготавливают путем включения слитых белков, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка или сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества в сочетании с любым дополнительным требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед применением должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества соляного раствора или глюкозы. Композиции должны быть стабильной в условиях приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например, менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих веществ можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Фармацевтические композиции, содержащие слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают процессирование белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Слитые белки можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли.

Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотно-аддитивные соли, например, соли, образованные со свободными аминогруппами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, можно получать также из неорганических ос-

нований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

Способы и композиции для терапевтического применения

Любые слитые белки, представленные в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах.

Для применения в терапевтических способах слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав препаративных форм, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Одним из объектов изобретения являются слитые белки, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются слитые белки, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения для лечения заболевания. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются слитые белки, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является слитый белок, представленный в настоящем описании, предназначенный для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является слитый белок, предназначенный для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве слитый белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой аутоиммунное заболевание. Примерами аутоиммунных заболеваний являются диабет типа 1, псориаз, астма, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, системная красная волчанка (SLE) и рассеянный склероз. В одном из вариантов осуществления изобретения заболевание представляет собой отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат-против-хозяина". В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание выбирают из группы, включающей диабет типа 1, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE и рассеянный склероз. В более конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой диабет типа 1. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рассеянный склероз. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой астму, легочный фиброз или обструктивное заболевание легких. В следующих вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, прежде всего атеросклероз и острый коронарный синдром. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой аллергическое состояние, прежде всего аллергию на пищевые продукты. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, иммунодепрессант, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой аутоиммунное заболевание. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является применение слитого белка, предлагаемого в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства, которое предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой аутоиммунное заболевание. В одном из вариантов осуществления изобретения заболевание представляет собой отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат-против-хозяина". В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание выбирают из группы, включающей диабет типа 1, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE и рассеянный склероз. В более конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой диабет типа 1. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рассеянный склероз. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой астму, легочный фиброз или обструктивное заболевание легких. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой аллергическое состояние, прежде всего аллергию на пищевые продукты. В следующих вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, прежде всего атеросклероз и острый коронарный синдром. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ

дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, иммунодепрессант, если заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве слитый белок, предлагаемый в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит слитый белок, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой аутоиммунное заболевание. В одном из вариантов осуществления изобретения заболевание представляет собой отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат-против-хозяина". В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание выбирают из группы, включающей диабет типа 1, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE и рассеянный склероз. В более конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой диабет типа 1. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В другом конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рассеянный склероз. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой астму, легочный фиброз или обструктивное заболевание легких. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой аллергическое состояние, прежде всего аллергию на пищевые продукты. В следующих вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, прежде всего атеросклероз и острый коронарный синдром. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, иммунодепрессант, если заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения слитые белки, предлагаемые в изобретении, в эффективном количестве вводят в клетку. В других вариантах осуществления изобретения слитые белки, предлагаемые в изобретении, вводят в терапевтически эффективном количестве индивидууму для лечения заболевания.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза слитого белка, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, типа слитого белка, серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли слитый белок в профилактических или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтическим вмешательствам, истории болезни пациента и ответа на слитый белок и предписания лечащего врача. Практикующий специалист, ответственный за введение, в любом случае, должен определять концентрацию действующего(их) вещества(в) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для конкретного индивидуума. Различные схемы введения доз включают (но, не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Слитый белок можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания доза слитого белка, составляющая примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг), может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера, доза слитого белка может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но, не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг/веса тела или более, и находиться в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но, не ограничиваясь только ими) указанного диапазона, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз слито-

го белка). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз. Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

Слитые белки, предлагаемые в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния слитые белки, предлагаемые в изобретении, или их фармацевтические композиции, вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области, прежде всего в свете представленного подробного описания изобретения.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например, анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в формулу для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в диапазоне, включающем значение IC_{50} , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

Начальные дозы можно оценивать также, исходя из данных, полученных *in vivo*, например, на животных моделях, используя методики, хорошо известные в данной области. Обычный специалист в данной области легко может оптимизировать применение на людях на основе данных, полученных на животных.

Уровень доз и интервал можно регулировать индивидуально для получения уровней в плазме слитых белков, которые являются достаточными для поддержания терапевтического действия. Обычные дозы, предназначенные для введения пациенту путем инъекции, составляют от примерно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от примерно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для достижения терапевтически эффективных уровней в плазме можно вводить несколько доз каждый день. Уровни в плазме можно оценивать, например, с помощью ЖХВР.

В случаях местного применения или избирательного поглощения эффективная местная концентрация слитого белка может не соответствовать концентрации в плазме. Специалист в данной области может оптимизировать терапевтически эффективные местные дозы без проведения излишних экспериментов.

Применение в терапевтически эффективной дозе слитых белков, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность слитого белка можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. Анализы на клеточных культурах и опыты на животных можно применять для определения значений LD_{50} (доза, смертельная для 50% популяции) и ED_{50} (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде отношения LD_{50}/ED_{50} . Слитые белки, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно использовать для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED_{50} , обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в данном диапазоне в зависимости от различных факторов, например, от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др., в: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл. 1, 1975, с. 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Лечащему врачу пациентов, которым вводят слитые белки, предлагаемые в изобретении, должно быть очевидно, как и когда заканчивать, прерывать или регулировать введение из-за токсичности, дисфункции органов и т.п. И, наоборот, лечащему врачу должно быть очевидно, как регулировать лечение в сторону применения более высоких доз, если клинический ответ является неадекватным (предотвращая токсичность). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения должна варьироваться в зависимости от серьезности состояния, подлежащего лечению, пути введения и т.п. Серьезность состояния можно, например, оценивать среди прочего с помощью стандартных прогностических методов оценки. Кроме того, доза и предполагаемая частота введения дозы должна также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Другие средства и варианты лечения

Слитые белки, предлагаемые в изобретении, при лечении можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими средствами. Например, слитый белок, предлагаемый в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие "терапевтическое средство" включает любое средство, которое вводят для лечения симптома или заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое сред-

ство может представлять собой любые действующие вещества, которые можно применять при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного действия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммунодепрессант.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемого слитого белка, типа нарушения или лечения, и других указанных выше факторов. Слитые белки, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием путей введения, указанных в настоящем описании, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в отдельные композиции) и раздельное введение, в этом случае введение слитого белка, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта.

Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которая размещена на контейнере или прилагается к нему. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой слитый белок, предлагаемый в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит слитый белок, предлагаемый в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может включать также второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно осуществлять на практике различные другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше описания изобретения в целом.

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у: Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во NIH, публикация No 91-3242, 1991.

Секвенирование ДНК

Последовательности ДНК определяли с помощью секвенирования двух цепей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Geneart AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. В случаях, когда точная генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами (эндонуклеазами), клонировали в стандартных векторах для клонирования/секвенирования. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектропии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-

секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все конструкции создавали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических клетках. В SEQ ID NO: 39-47 представлены примеры лидерных пептидов и кодирующих их полинуклеотидных последовательностей.

Получение слияний $\beta\gamma$ -субъединица IL-2R-Fc и слияния α -субъединица IL-2R-Fc

Для изучения аффинности связывания рецептора IL-2 создавали "инструмент", который позволяет экспрессировать гетеродимерный рецептор IL-2. β -Субъединицу рецептора IL-2 сливали с молекулой Fc, которую создавали таким образом, чтобы она обладала способностью к гетеродимеризации (Fc("впадина")) (см. SEQ ID NO: 21 и 22 (человеческие), SEQ ID NO: 27 и 28 (мышинные) и SEQ ID NO: 33 и 34 (обезьян циномоглус)), используя технологию "knobs-into-holes" (Merchant и др., Nat Biotech. 16, 1998, сс. 677-68). Затем γ -субъединицу рецептора IL-2 сливали с вариантом Fc("выступ") (см. SEQ ID NO: 23 и 24 (человеческие), SEQ ID NO: 29 и 30 (мышинные) и SEQ ID NO: 35 и 36 (обезьян циномоглус)), гетеродимеризованным с Fc("впадина"). Затем указанный содержащий гетеродимерный Fc слитый белок применяли в качестве субстрата для анализа взаимодействия IL-2/IL-2-рецептор. α -Субъединицу IL-2R экспрессировали в виде мономерной цепи, несущей сайт расщепления AcTev и Avi His-метку (SEQ ID NO: 25 и 26 (человеческие), SEQ ID NO: 31 и 32 (мышинные) и SEQ ID NO: 37 и 38 (обезьян циномоглус)). Соответствующие субъединицы IL-2R кратковременно экспрессировали в клетках HEK EBNA 293 с сывороткой в случае конструкции $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R и без сыворотки в случае конструкции α -субъединицы. Конструкцию $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R очищали на белке А (фирма GE Healthcare) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 200). α -Субъединицу IL-2R очищали с использованием His-метки на колонке NiNTA (фирма Qiagen) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 75). Аминокислотные и соответствующие нуклеотидные последовательности различных конструкций рецепторов представлены в SEQ ID NO: 21-38.

Получение слитых белков

Последовательности ДНК создавали путем генного синтеза и/или классических методов молекулярной биологии и субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического сайта поли-А, каждый вектор нес последовательность OriP EBV. Слитые белки, которые применяли в описанных ниже примерах, получали путем контранфекции клеток линии HEK293-EBNA, находящихся на экспоненциальной фазе роста, экспрессионными векторами млекопитающих, используя опосредуемую фосфатом кальция трансфекцию. Альтернативно этому, HEK293-клетки, растущие в суспензии, трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами с использованием полиэтиленмина (ПЭИ). Альтернативно этому, для получения белков в бессывороточной среде применяли пулы стабильно трансфектированных СНО-клеток или клоны СНО-клеток. Затем слитые белки очищали из супернатанта. В целом, метод состоял в следующем: слитые белки очищали с использованием одной стадии аффинной хроматографии на белке А (HiTrap ProtA, фирма GE Healthcare), уравнивали с использованием 20мМ фосфата натрия, 20мМ цитрата натрия, pH 7,5. После внесения супернатанта колонку сначала промывали 20мМ фосфатом натрия, 20мМ цитратом натрия, pH 7,5, а затем промывали 13,3мМ фосфатом натрия, 20мМ цитратом натрия, 500мМ хлоридом натрия, pH 5,45. Слитый белок элюировали с помощью 20мМ цитрата натрия, 100мМ хлорида натрия, 100мМ глицина, pH 3 или 10мМ цитрата натрия, pH 3,0. Фракции нейтрализовали 0,5М Na_2HPO_4 , pH 8,0 (1:10), объединяли и очищали гель-фильтрацией (HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare или HiLoad 26/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в конечном буфере для продукта, имеющем следующий состав: 25мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0. Концентрацию белка в очищенных образцах белков определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Молекулярную массу определяли также на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу слитых белков анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5мМ 1,4-дителиотреитол) или без него и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым (SimpleBlue™ SafeStain, фирма Invitrogen). Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяли согласно инструкциям производителя (4-20% Трис-глициновые гели или 3-12% Бис-Трис). Альтернативно этому, чистоту и молекулярную массу молекул анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии восстановителя или без него, используя систему Caliper LabChip GXII (фирма Caliper Lifescience) согласно инструкциям производителя. Содержание агрегатов в образцах слитых белков анализировали с использованием колонки для аналитической гель-фильтрации с Супердекс 200 10/300GL (фирма GE Healthcare) в подвижном буфере, содержащем 2мМ MOPS, 150мМ NaCl, 0,02% NaN_3 , pH 7,3, при 25°C. Альтернативно этому, содержание агрегатов в образцах антител анализировали с использованием колонки для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh) в подвижном буфере, содержащем 25мМ K_2HPO_4 , 125мМ NaCl, 200мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN_3 , pH 6,7, при 25°C.

Результаты очистки и характеристики конструкций DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-IL-2 N88D, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ и DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ представлены на фиг. 1, 2, 3, 4 и 5

соответственно.

Аффинность к IL-2-рецепторам

Аффинность слитых белков определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на устройстве Biacore T200 (фирма GE Healthcare) для гетеродимера человеческого, мышиноного и обезьяньего (циномолгус) IL-2R $\beta\gamma$, используя рекомбинантный гетеродимер IL-2R $\beta\gamma$ в следующих условиях: лиганды: гетеродимер, содержащий человеческий, мышинный и обезьяний IL-2R, включающий β -субъединицу, содержащую "выступ", γ -субъединицу, содержащую "впадину", иммобилизованный на SA-чипе (с уровнями иммобилизации 194, 114 и 116 RU соответственно), аналит: DP47GS IgG-IL-2 (см. SEQ ID NO: 13, 15 и 19), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (см. SEQ ID NO: 17 и 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (см. SEQ ID NO: 15, 19 и 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 50) и DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 52), температура: 25°C; буфер: HBS-EP; концентрация аналита: от 100 до 1,2 нМ (разведение 1:3); скорость потока 30 мкл/мин; ассоциация: 120 с, диссоциация: 600 с для 2 наибольших концентраций и 120 с для более низких концентраций, регенерация: 60 при использовании 3М MgCl₂; аппроксимация: лэнгмюровская модель связывания: 1:1, RI≠0, Rmax = локальное. Аффинности определяли на основе кинетических констант скоростей k_{on} и k_{off} . Аффинность слитых белков определяли также для α -субъединицы человеческого, мышиноного и обезьяньего (циномолгус) IL-2R, используя рекомбинантную мономерную α -субъединицу IL-2R в следующих условиях: лиганды: α -субъединица человеческого, мышиноного и обезьяньего (циномолгус) IL-2R, иммобилизованная на CM5-чипе посредством аминного сочетания (уровни иммобилизации соответствовали 240, 245 и 220 RU соответственно), аналиты: DP47GS IgG-IL-2 (см. SEQ ID NO: 13, 15 и 19), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (см. SEQ ID NO: 17 и 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (см. SEQ ID NO: 15, 19 и 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 50) и DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (см. SEQ ID NO: 19 и 52), температура: 25°C; буфер: HBS-EP; концентрация аналита: от 300 до 0,41 нМ (разведение 1:3); скорость потока 30 мкл/мин; ассоциация: 120 с; диссоциация: 180 с; регенерация: 10мМ глицин, pH 1,5 в течение 60 с. Аффинности определяли путем анализа стационарного состояния.

Результаты оценки аффинности на основе кинетических характеристик для гетеродимера IL-2R $\beta\gamma$ и характеристик в стационарном состоянии для α -субъединицы IL-2R представлены в табл. 1.

Таблица 1. Связывание слитых белков с IL-2R $\beta\gamma$ и IL-2R α

K _D в нМ	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Cy IL-2R $\beta\gamma$	Mu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R α	Cy IL-2R α	Mu IL-2R α
DP47GS IgG-IL-2	0,15	0,60	0,85	51	81	112
DP47GS IgG-(IL-2) ₂	0,11	0,17	0,37	20	31	26
DP47GS IgG-IL-2 N88D	0,93	1,3	2,4	18	31	48
DP47GS IgG-(IL-2 N88D) ₂	0,24	0,57	2,1	22	30	25
DP47GS IgG-(IL-2 E95A) ₂	0,16	0,29	0,36	24	32	26

Слияния человеческий DP47GS IgG - IL-2 и их мутанты связываются не только с 3 различными цепями α , β и γ человеческого рецептора IL-2, но также и с соответствующими цепями рецептора обезьяны цинолмгус и мыши, хотя для последних двух видов в среднем обнаружена тенденция к несколько более низкой аффинности связывания. Аффинности указанных слияний цитокина с α -цепями человека и обезьяны цинолмгус были сопоставимы, а аффинность к мышинной α -цепи отличалась ~ в 2 раза от аффинности к человеческой α -цепи, выявленной для молекул, несущих только один цитокиновый компонент. Для молекул, несущих два цитокиновых компонента, указанное различие не имело места, по-видимому, вследствие авидности. Аффинности DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-IL-2 N88D к α -цепям теоретически должны быть одинаковыми, поскольку мутация N88D не должна влиять на поверхность раздела с α -цепью. N88 локализован на поверхности раздела с β -цепью рецептора IL-2 и его изменение в результате мутации на D приводило к снижению аффинности, что можно обнаружить при сравнении связывания DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-IL-2 N88D с IL-2R $\beta\gamma$ всех трех видов (0,15 нМ, 0,60 нМ и 0,85 нМ по сравнению с 0,93 нМ, 1,3 нМ и 2,4 нМ соответственно). В случае DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂, несущего два мутантных цитокина IL-2, указанное различие, по меньшей мере в отношении человеческого IL-2R $\beta\gamma$, являлось менее выраженным, наиболее вероятно вследствие авидности. DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ характеризовались очень сходными авидностями связывания с IL-2R $\beta\gamma$ всех трех видов. Хотя E95 также локализован на поверхности раздела с β -цепью рецептора IL-2, его изменение в результате мутации на А, по меньшей мере в том случае, когда два указанных мутанта слиты с IgG, не приводило к значимому снижению авидности.

Экспрессия IL-2-рецепторов на иммунных клетках

Высокоаффинный тримерный IL-2-рецептор состоит из α - (IL-2RA, CD25), β - (IL-2RB, CD122) и γ - (IL-2RG, CD132)-цепей и имеет величину K_D ~10пМ. CD25 индивидуально обладает лишь незначительной аффинностью (K_D ~10 нМ) в отношении IL-2. Димер IL-2RB/IL-2RG, который экспрессируется на некоторых типах клеток в отсутствие IL-2RA, также связывается с IL-2, но с промежуточной аффинно-

стью ($K_D \sim 1$ нМ). Передача сигналов через IL-2-рецептор опосредуется IL-2RB- и IL-2RG-цепями. По данным кристаллографического структурного анализа IL-2RA, по-видимому, не контактирует ни с IL-2RB, ни с IL-2RG. Высказана гипотеза о том, что основой согласованного действия в тримерном рецепторе является снижение энтропии, когда CD25 "захватывает" IL-2 на клеточной поверхности для презентации IL-2RB и IL-2RG, или, альтернативно этому, имеет место индуцируемое CD25 изменение конформации IL-2, что стабилизирует комплекс. В регуляторных FOXP3⁺-CD4⁺-Т-клетках имеет место значительный стехиометрический избыток IL-2RA по сравнению с β - и γ -цепями рецептора, что подтверждает гипотезу о том, что димеры или даже более крупные комплексы, включающие α -цепь, способствуют связыванию IL-2. Установлено также, что CD25 на одной клетке может презентовать IL-2 димерам IL-2RB/IL-2RG на другой клетке, при этом имеет место высокоаффинное межклеточное взаимодействие, подчеркивающее уникальную взаимосвязь между тремя цепями, из которых состоит высокоаффинный IL-2-рецептор.

Экспрессию CD25 (IL-2RA) и CD122 (IL-2RB) на субпопуляциях CD4⁺-Treg, субпопуляциях НК-клеток и на NKT-клетках, а также на субпопуляциях канонических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток определяли с помощью FACS (фиг. 6 и 7). Маркеры клеточной поверхности применяли для определения субпопуляций CD4⁺-Treg, NKT-клеток и НК-клеток (фиг. 6). Для оптимизации окрашивания с целью выявления CD25 и CD122 не осуществляли внутриклеточное окрашивание для выявления FoxP3. В целом, метод состоял в следующем: используя 150 мкл крови здорового донора, флуоресцентные антитела инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте (осуществляя встряхивание в начале и через 20 мин). Эритроциты лизировали в BD-буфере для лизиса (лизирующий раствор BD FACS, 349202) в течение 9 мин и оставшиеся клетки промывали (2 мл 3ФР + 0,1% БСА) и фиксировали (1% параформальдегида (ПФА)). Клетки анализировали с помощью клеточного анализатора LSRFortessa (фирма Becton Dickinson) и для анализа данных использовали программу FloJo (фирма TreeStar). Субпопуляции Treg идентифицировали с помощью антител, специфических в отношении TCR $\alpha\beta$ -ФИТЦ (IP26, фирма BioLegend), CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4, фирма BioLegend), CD127-PE/CY7 (ebioRDR5, фирма Ebioscience), CD45RA-Pacific Blue (HI100, фирма BioLegend), CD25-APC (2A3, M-A251, фирма BD Biosciences) и CD122-PE (TU27, фирма BioLegend). NK- и NKT-клетки окрашивали в отдельной пробирке с помощью антител, специфических в отношении TCR $\alpha\beta$ -ФИТЦ, CD4-Alexa Fluor 700, CD8-PE/CY7 (HTT8a, фирма BioLegend), CD56-Pacific Blue (HCD56, фирма BioLegend), CD25-APC и CD122-PE. После установки дискриминационного окна на лимфоциты на основе FSC/SSC и исключения дублетов наивные Treg идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁺CD45RA⁺, Treg памяти идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁺CD45RA⁻, а активированные Treg идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{high}CD45RA⁻. NK-клетки идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁻CD56⁺, а активированные NK-клетки идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁻CD56^{bright}. NKT-клетки идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD56⁺. Контроли изотипов (IC), конъюгированные с APC (аллофикоцианин) и PE (фикоэритрин), применяли для оценки фонового уровня флуоресценции для CD25 и CD122 соответственно.

Аналогично вышеуказанному, маркеры клеточной поверхности применяли для выявления наивных и канонических CD4⁺-Т-клеток памяти (фиг. 4А и 4Б), канонических CD8⁺-Т-клеток памяти и CD45RA⁺-CD8-Т-клеток (комбинация субпопуляций наивных клеток и TEMRA (TEMRA означает эффекторные клетки памяти, перенаправленные на экспрессию CD45RA) (фиг. 7В и 7Г). Окрашивание и анализ осуществляли согласно описанному выше методу. Используя ту же пробирку, которую применяли для характеристики CD4⁺-Treg, идентифицировали канонические наивные CD4⁺-Т-клетки как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{-/+}CD45RA⁺, и идентифицировали канонические CD4⁺-Т-клетки памяти как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{-/+}CD45RA⁻. CD8-Т-клетки определяли, используя TCR $\alpha\beta$ -ФИТЦ, CD8-Alexa Fluor 700 (HTT8a, фирма BioLegend), CD28-PE/CY7 (CD28.2, фирма BioLegend), CD45RA-Pacific Blue, CD25-APC и CD122-PE. CD8⁺-Т-клетки памяти идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD45RA⁻. Наивные CD8⁺-Т-клетки и клетки TEMRA идентифицировали как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD45RA⁺. CD28 не применяли для того, чтобы отличать наивные CD8⁺-Т-клетки от CD8⁺-TEMRA-Т-клеток, поскольку маркер CD28 не был включен в описанный ниже анализ pSTAT5a (см. фиг. 8).

В некоторых тестах (фиг. 15) определяли следующие дополнительные субпопуляции: центральные CD4⁺-Т-клетки памяти (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), центральные CD8⁺-Т-клетки памяти (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}) и CD8⁺-клетки TEMRA (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁺CD127⁺CD25^{-/+}).

На фиг. 6 и 7 представлены данные о специфической для клеток экспрессии IL-2RA и IL-2RB для субпопуляций Т-клеток, НК-клеток и НК-Т-клеток в человеческой периферической крови (IL-2RG практически повсеместно экспрессируется на гематопозитических клетках, так как он взаимодействует с большим количеством цитокиновых рецепторов). Наиболее высокий уровень IL-2RA присутствовал на трех популяциях регуляторных CD4⁺-Т-клеток (Treg): наивные клетки (CD45RA⁺CD25⁺), клетки памяти (CD45RA⁺CD25⁺) и активированные клетки (CD45RA⁻CD25^{hi}) (фиг. 6А). В среднем канонические CD4⁺-

Т-клетки памяти экспрессировали примерно в 10-раз меньше CD25, чем Treg (фиг. 7А). Экспрессия CD25 на наивных CD4⁺-Т-клетках значительно варьировалась у разных доноров, но во всех случаях оказалась ниже, чем обнаруженная на CD4⁺-Т-клетках памяти (фиг. 7А). Экспрессия CD25 на NK, NKT и CD8-Т-клетках оказалась очень низкой и не поддавалась обнаружению за исключением CD56^{bright}-NK-клеток (фиг. 6В и 7В). CD56^{bright}-NK- и CD56⁺-NK-клетки экспрессировали наиболее высокий уровень IL-2RB (фиг. 6Г), примерно в 10 раз более высокий по сравнению с любыми другими субпопуляциями Т-клеток, включая NKT-клетки (фиг. 6Б, 6Г, 7Б, 7Г).

Индукция pSTAT5a в субпопуляциях клеток человеческой периферической крови

После индуцированной IL-2 олигомеризации тримерного IL-2R цитоплазматические протеинтирозинкиназы JAK1 и JAK3, которые ассоциированы с внутриклеточными доменами IL-2RB и IL-2RG соответственно, становились активированными. Эти киназы фосфорилируют определенные остатки тирозина в IL-2RB, которые действуют как сайты "причаливания" для STAT5a и STAT5b, которые в свою очередь фосфорилируются. Индуцированная IL-2 активация нескольких путей передачи сигналов, в конце концов, приводит к транскрипции генов-мишеней, которые участвуют в различных функциях, ассоциированных с IL-2/IL-2R-путем. Поскольку различные типы клеток экспрессируют различные уровни молекул IL-2RA и IL-2RB рецептора IL-2 (фиг. 6 и 7), то для понимания интегрированного сигнального ответа на IL-2, опосредуемого различными комбинациями рецепторов с высокой и промежуточной аффинностью, при создании изобретения измеряли уровни pSTAT5a в индивидуальных клетках с помощью полихроматической проточной цитометрии.

Воздействие различных доз DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-IL-2N88D и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на индукцию фосфорилирования STAT5a оценивали с использованием субпопуляций человеческих CD4⁺-Treg, наивных и канонических CD4⁺-Т-клеток памяти, канонических CD8⁺-Т-клеток памяти, CD45RA⁺ CD8-Т-клеток, NKT-клеток и NK-клеток (фиг. 8 и 14 и табл. 2 и 3). Все субпопуляции характеризовали в одной пробирке для каждой дозы. А целом, метод состоял в следующем: собирали образцы крови взрослых здоровых добровольцев в гепаринизированные пробирки. Добавляли в различных концентрациях слитые белки DP47GS IgG-IL-2 к 500 мкл крови и инкубировали при 37°C. Через 30 мин кровь лизировали и фиксировали, используя предварительно нагретый буфер для лизиса/фиксаци (фирма Becton Dickinson, № 558049), в течение 10 мин 37°C, промывали дважды 3ФР, содержащим 0,2% БСА, и затем повышали проницаемость клеток с помощью предварительно охлажденного до -20°C метанола (фирма Sigma, чистота, пригодная для применения для биотехнологии (Biotech grade), № 494437) в течение 20 мин на льду. Затем клетки интенсивно промывали четырьмя 3ФР, содержащим 0,2% БСА, после чего осуществляли FACS-окрашивание, используя панель флуоресцентных антител, позволяющих отличать друг от друга различные субпопуляции лимфоцитов и NK-клеток и статус pSTAT5a. Применяемые антитела представляли собой анти-CD4-Alexa Fluor 700 (клон RPA-T4), CD3-PerCP/Cy5.5 (UCHT1), CD45RA-PE/Cy7 (HI100), CD8-Brilliant Violet 605 (RPA-T8), CD56-Brilliant Violet 421 (HCD56), FOXP3-PE (259D) (все от фирмы BioLegend), CD25-APC (клоны M-A251 и 2A3) и pSTAT5a-Alexa Fluor 488 (pY694) (фирма Becton Dickinson). Образцы исследовали с помощью анализатора клеток LSRFortessa (фирма Becton Dickinson) и данные анализировали с помощью программы FloJo (фирма TreeStar). После установки дискриминационного окна на лимфоциты и исключения дублетов Treg определяли как CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ и подразделяли на CD45⁺FOXP3^{hi} (активированные Treg), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺FOXP3⁺ (Treg памяти) и CD3⁺CD4⁺CD45⁺FOXP3⁺ (наивные Treg). Канонические CD4⁺-Т-клетки идентифицировали как CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (наивные) и CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻ (клетки памяти). CD8-Т-клетки определяли как CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻ (клетки памяти) и CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺. NKT-клетки идентифицировали как CD3⁺CD56⁺ а NK-клетки определяли как CD3⁻CD56^{bright} (активированные NK-клетки) или CD3⁻CD56⁺ (NK-клетки). Внутриклеточные уровни pSTAT5a количественно оценивали во всех субпопуляциях клеток при всех дозах.

На фиг. 8 представлены ответы Т-клеток, NK-клеток и NK Т-клеток в человеческой периферической крови трех доноров в зависимости от дозы иммуноконъюгата DP47GS IgG-IL-2, каждые из которых тестировали в различные дни. Иерархия ответа на DP47GS IgG-IL-2 оказалась одинаковой в крови трех доноров и такой, же, которая была обнаружена при применении рекомбинантного человеческого IL-2 (Proleukin®) (данные не представлены). Во всех трех популяциях Treg, т.е. в активированных клетках (CD45RA⁻, CD25^{hi}), клетках памяти (CD45RA⁻, CD25⁺) и наивных клетках (CD45RA⁺, CD25⁺), уровни pSTAT5a возрастали при применении DP47GS IgG-IL-2 в концентрации 0,1 нг/мл, в то время как для других клеточных популяций требовалась концентрация DP47 IgG-IL-2, либо превышающая 1 нг/мл (CD56^{bright} NK и CD4⁺-Т-клеток памяти), либо составляющая 10-100 нг/мл (CD8⁺-Т-клетки памяти, CD56⁺-NK-клетки, наивные CD4⁺-Т-клетки, NKT-клетки и CD45RA⁺CD8-Т-клетки), для того, чтобы вызывать поддающиеся обнаружению повышения уровней pSTAT5a. На фиг. 11 представлены более подробно ответы популяций Treg в зависимости от дозы, которые демонстрируют их высокую чувствительность к DP47GS IgG-IL-2. Следует отметить, что высокий уровень экспрессии IL-2RB на NK-клетках в сочетании с умеренными уровнями экспрессии CD56 (фиг. 6Г) по сравнению с уровнем экспрессии IL-2RB на субпопуляциях Т-клеток является недостаточным для того, чтобы проявлять аналогичную Treg-клеткам чувствительность к IL-2. В целом, установлено, что субпопуляции активированных, клеток па-

манти и наивных Treg обладали самой высокой чувствительностью к DP47GS IgG-IL-2, при этом CD56^{bright} NK-клетки и канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти оказались в 20-50 раз менее чувствительными. Из других проанализированных в отношении увеличения уровня pSTAT5a субпопуляций клеток эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти, эффекторные наивные CD4⁺-Т-клетки, NKT-клетки, "покоящиеся" NK-клетки (позитивные, не дающее яркое окрашивание в отношении CD56) и наивные эффекторные CD8⁺-Т-клетки + CD45RA⁺-клетки памяти оказались относительно нечувствительными к иммуноконъюгату IgG-IL-2.

На фиг. 9 представлены ответы Т-клеток, NK-клеток и NK Т-клеток в человеческой периферической крови пяти доноров в зависимости от дозы иммуноконъюгата DP47GS IgG-(IL-2)₂, каждые из которых тестировали в различные дни. Аналогично тому, что было установлено для DP47GS IgG-IL-2 (фиг. 8), три субпопуляции Treg представляли собой клетки, наиболее чувствительные к индукции pSTAT5a под действием DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фиг. 9 и 11), и сходные иерархические ответы в зависимости от дозы обнаружены для других клеточных субпопуляций у всех пяти доноров.

Для более простого сравнения DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂ уровни pSTAT5a стандартизовали (фиг. 10). Для стандартизации величин MFI величины MFI для pSTAT5a нестимулированных клеток, специфические для каждой находящейся в дискриминационном окне субпопуляции, вычитали из величин MFI для всех стимулированных вариантов в указанной клеточной субпопуляции. Полученные величины делили на наиболее высокую величину MFI pSTAT5a, полученную для указанной субпопуляции в ответ на дозу. Определяли величины EC₅₀ на основе количества содержащего IL-2 слитого белка, требуемого для достижения величины MFI pSTAT5a, составляющей 50% от максимальной, обнаруженной для данной субпопуляции. Как продемонстрировано на фиг. 10, иммуноконъюгат DP47GS IgG-(IL-2)₂ вызывал более сильную индукцию pSTAT5a в клетках, конститутивно экспрессирующих CD25, возможно, в результате повышенной avidности иммуноконъюгата к высокоаффинному IL-2-рецептору. Установлено, что величина EC₅₀, характеризующая активацию pSTAT5a, в Treg оказалась в 5-9 раз ниже для DP47GS IgG-(IL-2)₂ по сравнению с DP47GS IgG-IL-2 при непосредственном сравнении. В табл. 2 обобщены репрезентативные величины EC₅₀ и кратность различий активации pSTAT5a при использовании DP47GS IgG-IL-2 по сравнению с DP47GS IgG-(IL-2)₂ в различных субпопуляциях клеток.

Таблица 2. Величины EC₅₀ и кратность различий в активации pSTAT5a при использовании DP47GS IgG-IL-2 в сравнении с DP47GS IgG-(IL-2)₂ в различных клеточных субпопуляциях

Т-клетка	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Кратность изменения
активированная Treg-клетка	0,10 нг/мл	0,020 нг/мл	5
Treg-клетка памяти	0,22 нг/мл	0,033 нг/мл	7
наивная Treg-клетка	0,20 нг/мл	0,023 нг/мл	9
CD56 ^{bright} NK	2,0 нг/мл	0,63 нг/мл	3
каноническая CD4-Т-клетка памяти	5 нг/мл	0,7 нг/мл	7
NK-клетки	35 нг/мл	10 нг/мл	4

Даже при очень незначительных концентрациях DP47GS IgG-(IL-2)₂ индуцировал более высокие уровни pSTAT5a по сравнению с DP47GS IgG-IL-2 (фиг. 11). В этом эксперименте кровь трех здоровых доноров тестировали индивидуально в один и тот же день в отношении ответов на титрование с использованием 2-кратных разведений DP47 IgG-IL-2 и DP47 IgG-(IL-2)₂, что приводило к получению ограничивающих концентраций IL-2. На графиках на фиг. 11 представлены средние значения ± СКО величин MFI pSTAT5a для трех доноров. Помимо трех изученных индивидуально субпопуляций Treg (фиг. 11Б-Г), применяли дискриминационный анализ для оценки pSTAT5a во всех CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺-Treg-клетках (фиг. 11А). Результаты четко продемонстрировали в 5-10 раз более высокую эффективность DP47GS IgG-(IL-2)₂ в отношении активации Treg-клеток, несмотря на повышение лишь в 2 раза количества IL-2 на молекулу IgG. Полихроматическую проточную цитометрию осуществляли согласно описанному выше методу (см. фиг. 8).

Канонические CD4⁺-Т-клетки памяти реагировали также на более низкие (в 7-раз) концентрации DP47GS IgG-(IL-2)₂ по сравнению с DP47GS IgG-IL-2. Хотя величины EC₅₀ оказались более низкими для CD56^{bright}-NK-клеток и CD56⁺-NK-клеток при сравнении DP47GS IgG-(IL-2)₂ с DP47 IgG-IL-2, имело место снижение лишь в 3- и 4 раза соответственно. Это, вероятно, связано с тем, что действие этих клеток в отношении опосредованной IL-2 передачи сигналов связано с имеющим промежуточную аффинность IL-2-рецептором. Этот дифференциальный сдвиг величин ED₅₀ для Treg-клеток относительно NK-клеток в несколько раз повышает предпочтение в отношении активации Treg-клеток.

На фиг. 12 представлен ответ Т-клеток, NK-клеток и NK-Т-клеток в человеческой периферической крови каждого из трех доноров в зависимости от дозы DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, каждые из которых тестировали в различные дни. Молекулу IL-2E95A создавали так, чтобы она должна была снижать активность связывания с IL-2Rβγ, однако было установлено, что она в действительности обладала свойствами связывания с рецептором IL-2Rβγ, сходными со свойствами IL-2 дикого типа. Иерархия ответа на

DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ оказалась одинаковой в крови трех доноров и такой, же, которая была обнаружена при применении содержащего IL-2 дикого типа иммуноконъюгата DP47GS IgG-(IL-2) в крови этих же доноров. Во всех трех популяциях Treg-клеток, т.е. активированных клеток (CD45RA⁺CD25^{hi}), клеток памяти (CD45RA⁺CD25⁺) и наивных клеток (CD45RA⁺CD25⁺), уровни pSTAT5a возрастали при применении DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ в концентрации 0,1 нг/мл, в то время как для других клеточных популяций требовалась концентрация DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, либо 1 нг/мл (CD56^{bright} NK и CD4⁺-Т-клеток памяти), либо составляющая 10-100 нг/мл (CD8⁺-Т-клетки памяти, CD56⁺-NK-клетки, наивные CD4⁺-Т-клетки, NKT-клетки и CD45RA⁺CD8⁺-Т-клетки), для того, чтобы вызывать поддающиеся обнаружению повышения уровней pSTAT5a. Важно отметить, что высокий уровень экспрессии IL-2RB на NK-клетках с промежуточными уровнями CD56 (фиг. 6Г) по сравнению с экспрессией IL-2RB на субпопуляции Т-клеток был недостаточным для обеспечения сходной с Treg чувствительности к IL-2. В целом было установлено, что субпопуляции активированных, клеток памяти и наивных Treg характеризовались наибольшей чувствительностью к DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, в то время как CD56^{bright}-NK-клетки и канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти были в 20-50 раз менее чувствительными. Среди других субпопуляций клеток, которые анализировали в отношении повышения pSTAT5a, эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти, наивные эффекторные CD4⁺-Т-клетки, NKT-клетки, "покоящиеся" NK-клетки (CD56-позитивные не ярко окрашенные) и наивные эффекторные CD8⁺-CD45RA⁺-Т-клетки оказались относительно нечувствительными к иммуноконъюгату IgG-(IL-2E95A)₂.

На фиг. 13 представлен ответ Т-клеток, NK-клеток и NK-Т-клеток в человеческой периферической крови каждого из пяти доноров в зависимости от дозы DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂, каждые из которых тестировали в различные дни. Молекулу IL-2N88D создавали для снижения аффинности связывания с IL2Rβγ и, в отличие от молекулы, имеющей точечную мутацию E95A, она обладала в 6,2 раза меньшей аффинностью связывания с IL2Rβγ по данным Biacore-анализа (табл. 1, K_D = 0,15 нМ по сравнению с 0,93 нМ). Как установлено при создании настоящего изобретения, для всех трех иммуноконъюгатов, три субпопуляции Treg представляли собой клетки, наиболее чувствительные к активации pSTAT5a с использованием DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, и сходные по иерархии зависимости ответа от дозы были обнаружены для других субпопуляций клеток всех пяти доноров. Важно отметить отсутствие чувствительности у эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти при стимуляции с помощью DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂; даже при дозах 1000 нг/мл конъюгат оказывал слабое стимулирующее воздействие на эту важную с точки зрения аутоиммунитета популяцию клеток.

Как продемонстрировано в данном примере, уникальная созданная точечная мутация IL-2, N88D, резко снижала стимулирующую активность требуемой популяции клеток, а именно, всех эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти, сохраняя при этом стимулирующие воздействия в отношении Treg-клеток, которые требуются для нового и улучшенного терапевтического средства.

Для сравнения содержащего IL-2 дикого типа DP47GS IgG-(IL-2)₂ с иммуноконъюгатами, содержащими IL-2 с точечными мутациями E95A и N88D, накладывали друг на друга графики величин pSTAT5a для каждого из протестированных типов клеток (фиг. 14). Установлено, что DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ обладал такой же активностью, что и его аналог дикого типа, DP47GS IgG-(IL-2)₂, в отношении стимуляции каждой из популяций человеческих клеток, это характеризовалось тем, что кривые зависимости ответа от дозы можно было совместить. В отличие от этого, молекулы с пониженной способностью к связыванию с IL2Rβγ, а именно, DP47GS IgG-IL-2N88D и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, оказывали слабое воздействие на эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти и только двухвалентный конъюгат DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ сохранял значимую стимулирующую активность в отношении различных популяций Treg-клеток.

На фиг. 15 представлены результаты анализа ответов в виде уровней pSTAT5a в образцах цельной крови, взятых у дополнительных десяти доноров крови. Для каждого донора проводили тестирование в различные дни путем сравнения воздействий DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, для чего осуществляли титрование в широком диапазоне (≥6 log). Как было продемонстрировано ранее для DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фиг. 9), Treg-клетки памяти и наивные Treg-клетки представляли собой клетки, наиболее чувствительные к индуцируемому DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ pSTAT5a (фиг. 15А, Б); при этом, хотя каждый слитый белок позволял стимулировать максимальные pSTAT5a-ответы, они различались концентрациями, необходимыми для достижения точки излома на кривой активации, а также максимальной дозой, необходимой для активации. CD56^{bright}-NK-клетки представляли собой субпопуляцию клеток, менее чувствительную к DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, по сравнению с Treg-клетками, чем к слитым белкам, содержащим IL-2 дикого типа (фиг. 15В); точка излома на кривой активации была выше и в этом случае никогда не достигался максимальный эффект, даже при использовании наибольшей протестированной дозы (5000 нг/мл). NK-клетки, в отличие от DP47GS IgG-(IL-2)₂, были нечувствительными к DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (фиг. 15Г). Как центральные CD4⁺-Т-клетки памяти (фиг. 15Д), так и эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти (фиг. 15Е), были относительно нечувствительными к DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, для них точка излома на кривой активации была в 1000 раз более высокой, чем для DP47GS IgG-(IL-2)₂, и индуцировались лишь частичные ответы при использовании наибольшей протес-

тированной дозы (5000 нг/мл). В то время как DP47GS IgG-(IL-2)₂ индуцировал активацию в различной степени, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не оказывал воздействия на следующие субпопуляции клеток: наивные CD4⁺-Т-клетки (фиг. 15Ж), CD8⁺-Т-клетки центральной памяти (фиг. 15З), эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти (фиг. 15И), наивные CD8⁺-Т-клетки (фиг. 15К), эффекторные CD45RA⁺CD8⁺-Т-клетки памяти (фиг. 15Л), NKT-клетки (фиг. 15М) и CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD56⁺-Т-клетки (фиг. 15Н).

В табл. 3 представлены величины EC₅₀, полученные на основе количества содержащих IL-2 слитых белков, необходимого для достижения 50% от максимального pSTAT5a-ответа, выявленного для рассматриваемой субпопуляции клеток. DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, подобно его содержащему IL-2 дикого типа аналогу DP47GS IgG-(IL-2)₂, вызывал наиболее сильную индукцию pSTAT5a в Treg, т.е. клетках, конститутивно экспрессирующих высокоаффинный рецептор CD25 (IL2Rα), по-видимому, вследствие его более высокой авидности к высокоаффинному рецептору IL-2. Зависимости ответа от дозы для DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ оказались конгруэнтными. Величина EC₅₀, характеризующая активацию pSTAT5a в Treg-клетках, была в 6-7 раз меньше при использовании DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ и DP47GS IgG-(IL-2)₂ по сравнению с одновалентным DP47GS IgG-IL-2. Аналогично этому, величина EC₅₀, характеризующая активацию Treg-клеток, была в 7-10 раз меньше при использовании одновалентного DP47GS IgG-IL-2 по сравнению с двухвалентным DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. И, наконец, величина EC₅₀, характеризующая активацию Treg-клеток, была в 36-61 раз меньше при использовании двухвалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ по сравнению с двухвалентным DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Наиболее важное с иммунологической точки зрения преимущество DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ при лечении аутоиммунных нарушений лучше всего проиллюстрировано в табл. 3, из которой видно очень большое различие в специфичности, которой обладал DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в отношении активации Treg-клеток по сравнению с активацией эффекторных CD4⁺-клеток (оно составляет от >320 раз до >500 раз). Для сравнения, различие в специфичности в отношении Treg-клеток по сравнению с эффекторными CD4⁺-Т-клетками памяти существенно меньше для DP47GS IgG-(IL-2)₂ (оно составляет от 13 до 14 раз) и DP47GS IgG-IL-2 (оно составляет от 10 до 16 раз).

Таблица 3. Величины EC₅₀ и кратность различий в специфичности в отношении активации pSTAT5a при использовании DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в различных субпопуляциях клеток

Субпопуляции человеческих клеток	IgG-IL-2 ED ₅₀ (пМ)	IgG-(IL-2) ₂ ED ₅₀ (пМ)	IgG-(IL-2N88D) ₂ ED ₅₀ (пМ)
Treg-клетки памяти	2,2	0,31	11,4
Наивные Treg	1,8	0,29	17,7
Эффекторные CD4 ⁺ -Т-клетки памяти	29	4	>5700
Кратность различия в специфичности:			
Treg-клетки памяти по сравнению с CD4 ⁺ -Teff-клетками памяти	10	13	>500
наивные Treg-клетки по сравнению с CD4 ⁺ -Teff-клетками памяти	16	14	>320

Различные воздействия содержащих IL-2 слитых белков на человеческие NK-клетки и CD8⁺-Т-клетки *in vitro*

Свежевыделенные человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) культивировали *in vitro* без какой-либо дополнительной стимуляции, отличной от IL-2, т.е. в условиях, которые, как известно, являются благоприятными для выживания и роста NK-клеток и CD8⁺-Т-клеток. Человеческие NK-клетки можно подразделять на клетки, которые экспрессируют в малых или не поддающихся обнаружению количествах CD56 (обозначены как CD56^{-dim}), и "активированную" субпопуляцию клеток, которые характеризуются высокими уровнями экспрессии CD56 (обозначены как CD56^{bright}); большинство NK-клеток в крови представляют собой CD56^{-dim}-клетки, меньшинство классифицируют как CD56^{bright}-клетки. Считается, что "активированные" NK-клетки, которые представляют собой CD56^{bright}, являются предшественниками NK-клеток, которые не экспрессируют CD56 (т.е. CD56^{-dim}).

После культивирования в течение шести дней *in vitro* в присутствии DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (каждый в концентрации 0, 5, 50 и 500 нг/мл) были обнаружены различия в росте и выживаемости между CD56^{-dim}-клетками, NK CD56^{bright}-Т-клетками и CD8⁺-Т-клетками. Значимые различия в количестве клеток были обнаружены при обработке указанными стимулами, при этом DP47GS IgG-(IL-2)₂ стимулировал наибольшее увеличение количества CD56^{bright}-Т-клеток (медиана составляла 101×10³ по сравнению с 38×10³, p<0,005) (фиг. 16А) и также CD8⁺-Т-клеток (медиана составляла 13,6×10³ клеток по сравнению с 2,5×10³ клеток, p<0,0001) (фиг. 16Б).

Воздействия содержащих IL-2 слитых белков на гуманизированных мышей Гуманизированных мышей создавали, используя облученных небольшой дозой излучения новорожденных NOD.Prkdc^{scid} IL2rg^{null} (NSG)-мышей в качестве хозяина с нарушенным иммунитетом, которым трансплантировали

стволовые CD34⁺-клетки печени человеческого эмбриона путем IP-инъекции. Образцы крови, взятые из организма каждой мыши в возрасте 8-10 недель, тестировали для подтверждения того, что произошло приживление человеческого трансплантата. В результате сравнения воздействий пролейкина и DP47GS IgG-(IL-2)₂ при создании изобретения было установлено, что основными клетками, на которые они воздействовали *in vivo*, являлись NK-клетки и Treg-клетки; после обработки DP47GS IgG-(IL-2)₂ имело место существенное увеличение как NK-клеток, так и Treg-клеток, при этом пропорциональный ответ NK-клеток был выше. Воздействия пролейкина были сходными, но воздействия на NK-клетки и Treg-клетки в пределах группы были менее совпадающими и степень увеличения была меньше, чем в случае обработки DP47GS IgG-(IL-2)₂. Содержащие IL-2 слитые белки оказывали различные воздействия *in vivo* в организме гуманизированных мышей. DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типа приводил к увеличению количества как Treg- (фиг. 17А), так и NK-клеток (фиг. 17Б), в то время как DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не оказывал воздействия на NK-клетки (фиг. 17Б), но увеличивал количество Treg-клеток в значительно большей степени (фиг. 17А), чем IgG-(IL-2)₂ дикого типа.

Следствием гуманизации NSG-мышей с точки зрения долгосрочной перспективы является их более короткое время выживания, обусловленное тем, что реакция "человеческий ксенотрансплантат против хозяина" приводит к потере веса и мультисистемной полиорганной недостаточности. Введение наполнителя дважды в неделю не оказывало воздействия и в этом случае медианная выживаемость составляла 36 дней после начала обработки (фиг. 18). Обработка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ приводила к медианной выживаемости, сходной с выживаемостью при обработке наполнителем, и составляла 37 дней. В отличие от этого, обработка DP47GS IgG-(IL-2)₂ дважды в неделю сокращала медианную выживаемость в этой группе до 21 дня (фиг. 18, $p < 0,0037$ по сравнению с DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂).

Когда реакция "трансплантат против хозяина" достигала заранее определенной степени серьезности, требующей прекращения прижизненного опыта для каждой мыши (потеря веса $\geq 15\%$), проводили оценку состава человеческих клеток в крови. В момент времени, когда наступал угрожающий жизни уровень реакции "трансплантат против хозяина", были обнаружены очень сильные различия между группами обработки в конечном составе Treg, NK-клеток и CD8⁺-Т-клеток в крови (фиг. 19). У мышей, обработанных наполнителем, количество человеческих Treg составляло менее 1% от общего количества человеческих CD45⁺-клеток, а количество NK- и CD8⁺-Т-клеток составляло ~ 3% от количества человеческих CD45⁺-клеток в крови. Обработка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ увеличивала количество NK- и CD8⁺-Т-клеток до 2% и 5% соответственно, в то время как количество Treg возрастало до 6%. В отличие от этого, обработка DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типа увеличивала пропорцию NK-клеток и CD8⁺-Т-клеток до 30% от общего количества человеческих CD45⁺-клеток и Treg до 3,5%, что, по-видимому, объясняет значимое снижение времени выживания в этой группе по сравнению с мышами, обработанными DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Индукция pSTAT5a в субпопуляциях клеток периферической крови обезьян циномолгус

Так же, как и в человеческой периферической крови, имеет место предпочтительная и характеризующаяся сходной зависимостью от дозы индукция pSTAT5a в субпопуляциях Treg в периферической крови обезьян циномолгус, стимулированной IL-2 (пролейкин) (данные не представлены). При непосредственном сравнении способности DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-IL-2 индуцировать pSTAT5a в трех субпопуляциях Treg требовалось в 2-8 раз более низкая концентрация DP47GS IgG-(IL-2)₂ для достижения уровня pSTAT5a, составляющего 50% от максимального, чем концентрация DP47GS IgG-IL-2. В табл. 4 обобщены величины EC₅₀, характеризующие активацию pSTAT5a с помощью DP47GS IgG-IL-2 в сравнении с DP47GS IgG-(IL-2)₂ в различных субпопуляциях Treg обезьян циномолгус, полученные результаты оказались в очень большой степени сходными с результатами, полученными при исследовании человеческой периферической крови (табл. 3).

Так же, как и в случае цельной крови человека, применяли маркеры клеточной поверхности и внутриклеточные маркеры для идентификации субпопуляций регуляторных Т-клеток и канонических Т-клеток в цельной крови здоровых обезьян циномолгус. Образцы крови собирали в один и тот же день у трех здоровых обезьян циномолгус в содержащие гепарин натрия пробирки и добавляли в различных концентрациях DP47GS IgG-IL-2 или DP47GS IgG-(IL-2)₂ к 500 мкл крови и инкубировали при 37°C. После выдерживания в течение 10 мин при 37°C образцы лизировали и фиксировали с помощью предварительно нагретого BD-буфера для лизиса/фиксации (фирма BD Biosciences). После промывки повышали проницаемость клеток с помощью 1 мл метанола в течение 30 мин на льду. Образцы промывали трижды и окрашивали, используя панель FOXP3-Alexa Fluor® 647 (клон: 259D, фирма BioLegend), CD4-V500 (клон: L200, фирма BD Biosciences), CD45RA-V450 (клон: 5H9, фирма BD Biosciences), CD25-PE (клон: 4E3, фирма eBioscience), pSTAT5a-Alexa Fluor® 488 (клон: 47, фирма BD Biosciences) и Ki-67-PerCP-Cy5.5 (клон: B56, фирма BD Biosciences), в течение 1 ч при 4°C. Все образцы исследовали с помощью анализатора клеток LSRFortessa (фирма Becton Dickinson) и данные анализировали с помощью программы FlowJo (FlowJo, LLC).

Таблица 4. Индукция pSTAT5a в субпопуляциях Treg в периферической крови обезьян циномоглус в ответ на обработку DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂

Т-клетка	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Кратность изменения
активированная Treg-клетка	0,07 нг/мл	0,02 нг/мл	4
Treg-клетка памяти	0,21 нг/мл	0,025 нг/мл	8
наивная Treg-клетка	0,040 нг/мл	0,02 нг/мл	2

В другом эксперименте аналогично анализам pSTAT5a, проведенным с использованием человеческой крови, осуществляли стимуляцию *in vitro* свежее гепаринизированной крови нормальных здоровых обезьян циномоглус с помощью наполнителя, а именно ЗФР, в качестве контроля, DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, и изучали воздействия на фосфорилирование STAT5a в субпопуляциях Treg и канонических эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти. Для стимуляции была выбрана доза 20 нг/мл на основе того, что максимальные ответы человеческих Treg имели место при ≤ 1 нг/мл, и того, что в этом диапазоне доз имели место близкие к максимальным ответы канонических эффекторных CD4⁺-Т-клеток (результаты представлены на фиг. 9).

Условия эксперимента были теми же, что и описанные выше. Образцы крови собирали в тот же самый день у трех здоровых обезьян циномоглус (доноры C1, C2, C3) в пробирки с гепарином натрия, добавляли по 20 нг/мл DP47GS IgG-(IL-2)₂ или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ к 500 мкл крови и инкубировали при 37°C в течение 20 мин перед осуществлением лизиса и проведением анализа.

Стратегия установки дискриминационных окон для разделения CD4⁺CD25⁺-Treg обезьян циномоглус на субпопуляции наивных (FOXP3^{hi}CD45RA⁺) клеток, клеток памяти (FOXP3^{hi}CD45RA⁺) и активированных (FOXP3^{hi}CD45RA⁺) клеток проиллюстрирована на фиг. 20A. Как и в случае человеческих клеток, три субпопуляции CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Treg каждого донора экспрессировали высокие уровни высокоаффинного рецептора IL-2 CD25 (фиг. 20B). После стимуляции *in vitro* с помощью как DP47GS IgG-(IL-2)₂, так и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, в концентрации 20 нг/мл в Treg всех трех доноров происходило значимое фосфорилирование STAT5a (фиг. 20B). Так же, как и человеческие клетки, активированные Treg-клетки и Treg-клетки памяти обезьян циномоглус обладали более высоким потенциалом в отношении индукции pSTAT5a по сравнению с наивными Treg-клетками.

Человеческие канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки, хотя они и не обладали такой же чувствительностью, что и Treg-клетки, могли стимулироваться IL-2, при использовании pSTAT5a в качестве биомаркера активации оценки показали, что для DP47GS IgG-(IL-2)₂ величина ED₉₀ составляла 20 нг/мл (фиг. 14). Канонические эффекторные CD4⁺-Т-клетки памяти обезьян циномоглус в крови также можно идентифицировать как CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁺-клетки, при этом большая часть клеток представляла собой CD25⁺-клетки, а меньшая субпопуляция представляла собой CD25⁺-клетки (фиг. 21A). Если рассматривать всю популяцию, то Teff-клетки памяти обезьян циномоглус всех трех доноров давали ответ на DP47GS IgG-(IL-2)₂ в концентрации 20 нг/мл, вызывая повышение pSTAT5a, в то время как обработка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в концентрации 20 нг/мл вызывала слабый ответ (супо 2) или не вызывала ответа (супо 1 и 3) в виде pSTAT5a (фиг. 21B). Когда Teff-клетки памяти дополнительно подразделяли на CD25⁺- и CD25⁺-субпопуляции, то было установлено, что ответ на DP47GS IgG-(IL-2)₂ в основном был обусловлен CD25⁺-субпопуляцией (фиг. 21Г), тогда как CD25⁺-субпопуляция давала слабый ответ (фиг. 21В). В отличие от этого, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не оказывал воздействия на CD25⁺-Teff-клетки памяти (фиг. 21В) и обладал на 70-80% меньшей стимулирующей активностью в отношении CD25⁺-субпопуляции (фиг. 21Г).

Были проведены дополнительные исследования на свежесобранной крови нормальных обезьян циномоглус, в которых непосредственно сравнивали взятые в различных концентрациях DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ для оценки их способности стимулировать в зависимости от дозы pSTAT5a в различных субпопуляциях Т-клеток, а именно, в активированных, наивных и Treg-клеток памяти и эффекторных CD4⁺-Т-клетках памяти. Как DP47GS IgG-(IL-2)₂, так и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, стимулировали Treg-клетки в зависимости от дозы, при этом двухвалентный содержащий IL-2 дикого типа слитый белок оказался ~ в 10 раз более эффективным, чем двухвалентный содержащий IL-2N88D слитый белок, для каждой из субпопуляций Treg (фиг. 22A-B). В отличие от этого, было выявлено очень сильное различие между двумя молекулами при оценке эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти в отношении индукции pSTAT5a (фиг. 22Г). DP47GS IgG-(IL-2)₂ характеризовался величиной EC₉₀ ~ 300 нг/мл, в то время как DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ фактически не оказывал воздействия при указанной высокой дозе. Величины EC₅₀, характеризующие стимуляцию pSTAT5a у обезьян циномоглус, представлены в табл. 5, в которой представлены также кратности относительных специфичностей в отношении стимуляции Treg-клеток по сравнению с эффекторными CD4⁺-Т-клетками памяти. Эти результаты, полученные для цельной крови обезьян циномоглус, очень сходны с результатами, полученными с использованием цельной крови человека (фиг. 14 и табл. 3), и свидетельствуют о том, что результаты исследований на обезья-

нах циномоглус могут иметь большую прогностическую ценность для клинических опытах на людях.

Таблица 5. Величины EC_{50} и кратность различий в специфичности в отношении активации pSTAT5a с помощью DP47GS IgG-(IL-2)₂ и DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в субпопуляциях Т-клеток обезьян циномоглус

Трег-клетки обезьян циномоглус	IgG-(IL-2) ₂ (нг/мл)	IgG-(IL-2 N88D) ₂ (нг/мл)
активированные Трег-клетки	0,1	0,7
Трег-клетки памяти	0,1	1,1
наивные Трег-клетки	0,06	0,8
эффеторные CD4 ⁺ -Т-клетки памяти	1,2	>1,000
Кратность различия в специфичности:		
активированные Tregs по сравнению с CD4 ⁺ -Teff-клетками памяти	12	>1,400
Трег-клетки памяти по сравнению с CD4 ⁺ -Teff-клетками памяти	12	>900
наивные Трег-клетки по сравнению с CD4 ⁺ -Teff-клетками памяти	20	>1,200

Оценка фармакокинетических свойств на мышах

Перед началом функциональных исследований на мышах проводили оценку фармакокинетических (ФК) свойств одновалентных и двухвалентных иммуноконъюгатов, содержащих IL-2 дикого типа и IL-2 с мутацией N88D, на NOD-, NOD.scid- и NOD.scid.II2 $\alpha^{-/-}$ -мышях (фиг. 23).

NOD- и NOD.scid-мышам (n=3) вводили путем внутривенной (i.v.) инъекции по 0,3 мг/кг веса тела/мышь DP47GS IgG-IL-2 или DP47GS IgG-(IL-2)₂ в 3ФР, содержащем 0,5% мышиной сыворотки и брали образцы крови в различные моменты времени в течение периода от 2 мин до 168 ч после инъекции (фиг. 23А). Человеческий IL-2 оценивали в мышиной сыворотке с использованием мышиного МАт к человеческому IL-2 (фирма BD Pharmingen, № 555051, клон 5344.111), которым сенсибилизировали 96-луночные планшеты для захвата IL-2. Затем проводили обнаружение человеческого IL-2 с использованием биотинилированного мышиного МАт к человеческому IL-2 (фирма BD Pharmingen, № 555040, клон B33-2). Связывание IL-2 визуализировали и количественно оценивали с использованием конъюгированного с европием стрептавидина. В течение первых 24 ч клиренс DP47GS IgG-(IL-2)₂ происходил намного быстрее, чем DP47GS IgG-IL-2, как в случае NOD-, так и в случае NOD.scid-мышей. Через 48 ч концентрации каждого аналита в сыворотке находились на сходном уровне, а через 72 ч все они были ниже предела обнаружения. Предел обнаружения IL-2 был равен 0,05 нг/мл и он обозначен на графике пунктирной линией. Неожиданно быстрый клиренс как одновалентных, так и двухвалентных иммуноконъюгатов IgG-IL-2 в организме мышей, не имеющих адаптивной иммунной системы, позволяет предположить, что у мышей существует негематопозитический компартмент для IL-2 или "слив" и он может управлять быстрым клиренсом in vivo содержащих IL-2 иммуноконъюгатов.

Для проверки этой гипотезы при создании изобретения были проведены ФК-исследования на NOD.scid-мышях, у которых отсутствовал также высокоаффинный рецептор IL-2, IL2R α (CD25), т.е. на NOD.scid.II2 $\alpha^{-/-}$ -мышях (фиг. 23Б). В организме NOD.scid.II2 $\alpha^{-/-}$ -мышей клиренс DP47GS IgG-(IL-2)₂, несмотря на введенную в три раза более высокую дозу (0,3 мг/кг), происходил в течение первых 24-48 ч более быстро, чем клиренс введенного в дозе 0,1 мг/кг DP47GS IgG-IL-2 и введенного в дозе 0,1 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Однако через 48 ч уровни каждого конъюгата в крови переходили в фазу медленной стационарной элиминации, при этом IL-2 находился в крови на легко обнаруживаемом уровне в течение периода времени вплоть до 6 дней. Важно отметить, что в организме указанных лишенных высокоаффинного рецептора IL-2 мышей начальная 24-часовая фаза распределения молекулы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ происходила немного более быстро, чем IgG-IL-2, однако после этого имела место фаза элиминации, сходная с фазой элиминации одновалентного иммуноконъюгата, которая в течение периода времени вплоть до 6 дней, т.е. до последнего момента времени, когда проводили их анализ. Указанные данные для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ особенно важны, поскольку результаты ФК-анализа для NOD.scid.II2 $\alpha^{-/-}$ -мышей, по-видимому, позволяют с хорошей точностью прогнозировать результаты ФК-анализа для приматов кроме человека. Повышение FOXP3 и CD25 в мышиных Трег после обработки IL-2 Для сравнения способностей различных молекулярных форматов и конфигураций человеческого IL-2 стимулировать FoxP3⁺-Трег-клетки in vivo мышам вводили путем подкожной инъекции наполнитель, пролейкин (рекомбинантный человеческий IL-2), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ и проводили оценку Трег с точки зрения изменений экспрессии CD25 на клеточной поверхности и внутриклеточного FOXP3 через заранее определенный в качестве оптимального промежуток времени, составлявший 24 ч (фиг. 24). Молодым здоровым мышам линии BALB/c (n=3/группу обработки, n=4/наполнитель в качестве контрольной группы) инъекцировали подкожно либо пролейкин (20000 или 100000 МЕ/мышь), DP47GS IgG-IL-2 (60, 300 или 1500 МЕ/мышь), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (60, 300 или

1500 МЕ/мышь) или DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300 или 1500 МЕ/мышь). Дозы вводили в наполнитель, который представлял собой 100 мкл стерильного ЗФР, pH 7,2, содержащего 0,5% стерилизованной фильтрацией мышинной сыворотки. Через 24 ч мышей умерщвляли и у них изымали селезенку. Получали суспензию единичных клеток селезенки в 1 мл среды L-15 и хранили на льду до дальнейшей обработки. Аликвоту (40 мкл) профильтрованной суспензии единичных клеток переносили в пробирки для осуществления FACS и промывали 2 мл FACS-буфера (600×g, 5 мин). Затем образцы инкубировали с конъюгированными с флуорохромом антителами к антигенам клеточной поверхности: CD4 (клон RM4-5, флуорохром A700), CD25 (eBio7D4, Af488), CD44 (IM7, e605), CD62L (MEL-14, PE), ICOS (C398.4A, PE/Cy7), CD103 (2E7, APC). Окрашивание осуществляли в течение 30 мин при 4°C в 100 мкл FACS-буфера (ЗФР, pH 7,2 + 0,2% БСА). После окрашивания клеточной поверхности образцы промывали 4 мл FACS-буфера (600×g, 5 мин) перед осуществлением внутриклеточного окрашивания (согласно протоколу внутриклеточного окрашивания фирмы eBioscience). В целом, метод состоял в следующем: образцы ресуспендировали в 200 мкл буфера для фиксации/повышения проницаемости (фирма eBioscience, № 00-5521) и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. В образцы добавляли 1 мл 1 × буфера для повышения проницаемости (фирма eBioscience, № 00-8333) перед добавлением 3 мл FACS-буфера и осуществлением промывки (600 × g, 5 мин). Внутриклеточные антигены Ki-67 (B56, PerCP Cy5.5) и FOXP3 (FJK-16S, e450) окрашивали в 100 мкл 1× буфера для повышения проницаемости в течение 1 ч при 4°C. Образцы промывали 4 мл FACS-буфера (600 × g, дважды по 5 мин) и данные получали с помощью анализатора BD Fortessa и анализировали помощью программы FlowJo (фирма Tree Star Inc.). Treg идентифицировали как CD4⁺, FOXP3⁺ в синглетах в лимфоцитарном окне; для всех образцов в этой популяции рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), обнаруженную для CD25 и FOXP3.

Как продемонстрировано на фиг. 24, три содержащих IL-2 иммуноконъюгата обладали одинаковой эффективностью в отношении стимуляции экспрессии CD25 (фиг. 24А) и FoxP3 (фиг. 24Б) в мышинных Treg и характеризовались согласующимися зависимостями ответа от дозы в диапазоне доз, охватывающем дозы 60, 300 и 1500 МЕ/мышь. В каждом случае доза 1500 МЕ каждого иммуноконъюгата (черные столбики) была значимо более эффективна, чем 100000 МЕ пролейкина (черные столбики). В большинстве случаев 300 МЕ иммуноконъюгатов (темно-серые столбики) были эквивалентны 100000 МЕ пролейкина, а 60 МЕ иммуноконъюгатов (светло-серые столбики) были эквивалентны 20000 МЕ пролейкина (светло-серые столбики). Для всех групп обработок данные представлены в виде среднего значения ± СКО. Оценка фармакокинетических свойств на обезьянах циномолгус Перед началом функциональных исследований на приматах кроме человека оценивали фармакокинетические (ФК) свойства содержащих IL-2 иммуноконъюгатов на биологически наивных здоровых взрослых обезьянах циномолгус (фиг. 25). Обезьянам (n=2/дозу) вводили внутривенно (i.v.) в виде кратковременной болюсной инъекции стерильный DP47GS IgG-IL-2 или DP47GS IgG-(IL-2)₂ в ЗФР, содержащем 0,5% сыворотки обезьян циномолгус и брали образцы крови в различные моменты времени в течение периода времени с 30 мин до 72 ч после инъекции. Человеческий IL-2 оценивали в образцах сыворотки обезьян циномолгус с использованием мышиного МАт к человеческому IL-2 (фирма BD Pharmingen, каталожный номер 555051, клон 5344.111) для сенсibilизации 96-луночных планшетов для захвата человеческого IL-2. Затем проводили обнаружение человеческого IL-2 с использованием биотинилированного мышиного МАт к человеческому IL-2 (фирма BD Pharmingen, каталожный номер 555040, клон B33-2). Связывание IL-2 визуализировали и количественно оценивали с использованием конъюгированного с европием стрептавидина. Предел обнаружения IL-2 с использованием сыворотки обезьян циномолгус был равен 0,05 нг/мл (обозначен на графиках пунктирной линией). В образцах сыворотки обезьян циномолгус, взятых перед обработкой, IL-2 не был обнаружен (следовательно, его уровень был < 0,05 нг/мл).

Обнаружение IL-2 в сыворотке обезьян циномолгус проводили в период с 30 мин до 48 ч после i.v.-инъекции для всех доз DP47GS IgG-IL-2 (фиг. 25А) и DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фиг. 25Б). Через 72 ч уровни IL-2 в сыворотке находились ниже предела обнаружения (0,05 нг/мл, пунктирная линия) для всех животных, обработанных 10 и 25 мкг/кг DP47GS IgG-IL-2 или DP47GS IgG-(IL-2)₂. После обработки DP47GS IgG-IL-2 в дозе 100 мкг/кг обнаруживаемый уровень IL-2 в сыворотке все еще присутствовал через 72 ч.

Индукция увеличения количества Treg-клеток у обезьян циномолгус У обезьян циномолгус, обработанных in vivo DP47GS IgG-IL-2, имело место увеличение в зависимости от дозы абсолютного количества Treg-клеток, а также его кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем через 7 дней после дозирования (фиг. 26А и 26Б соответственно). Во всех опытах использовали нормальных здоровых обезьян циномолгус возрастом от 3 до 6 лет обоего пола, при этом ни одно животное не использовали более одного раза. Под анестезией осуществляли SC инъекцию в боковую область спины DP47GS IgG-IL-2 (n=4-6) или наполнителя (n=3) в различных дозах. Индивидуальные дозы DP47GS IgG-IL-2 рассчитывали на основе веса тела и приготавливали для инъекции в наполнитель, который представлял собой стерильный ЗФР, pH 7,2, содержащий 0,5% стерильной нормальной сыворотки обезьян циномолгус. Образцы крови собирали в различные моменты времени и анализировали для определения гематологических изменений (общий анализ крови (СВС) и дифференцированный подсчет лейкоцитов) с помощью автоматического гематологического анализатора фирмы Advia, а также маркеров клеточной поверхности и внут-

риклоточных маркеров, подробно описанных выше (см. описание экспериментальных процедур для табл. 4). Данные об изменении регуляторных $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -Т-клеток в цельной крови в день 7 после обработки представлены на фиг. 26 в виде абсолютного количества клеток на mm^3 цельной крови (фиг. 26А) и кратности изменения количества Трег-клеток (фиг. 26Б); все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ СКО. При более высоких дозах DP47GS IgG-IL-2, составлявших 25 мкг/кг и 36 мкг/кг, было установлено, что количество Трег-клеток увеличивалось в среднем примерно в 3 раза (диапазон 111-255%, $n=6$) и в 4 раза (диапазон 110-470%, $n=6$) соответственно. При дальнейшем снижении вводимой SC дозы DP47GS IgG-IL-2 (12, 6 и 2 мкг/кг) продолжал вызывать соответствующим образом уменьшенные изменения количества Трег-клеток и кратности его изменения. Не вдаваясь в конкретную теорию, можно считать, что ~2-кратное увеличение количества Трег-клеток (находящееся в диапазоне 67-133%, $n=6$) при введении дозы 12 мкг/кг DP47GS IgG-IL2 может представлять собой требуемое увеличение количества Трег-клеток в случае некоторых аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Количество Трег-клеток у людей варьируется в широких пределах (20-90 Трег-клеток на mm^3 крови; от 4 до 10% $CD4^+$ -Т-клеток) и логично предположить, что увеличение количества Трег-клеток, индуцируемое IL-2 в организме индивидуума, должно приводить к общему повышению функциональной супрессии.

При оценке более низких доз DP47GS IgG-IL-2 (2-6 мкг/кг) образцы крови собирали более часто для идентификации оптимальных моментов времени для обнаружения изменений количества Трег-клеток после введения DP47GS IgG-IL-2 (фиг. 27). Хотя изменения количества Трег-клеток наблюдались в течение 7 дней, максимальная стимуляция имела место в день 4, т.е. раньше, чем это имело место при обработке более высокими дозами DP47GS IgG-IL-2 (день 7, фиг. 26).

Пролейкин и DP47GS IgG-IL-2 обладали сопоставимым действием *in vitro* при анализе цельной крови человека и обезьян циномоглус, когда непосредственно сравнивали количество единиц IL-2-активности, требуемое для стимуляции pSTAT5a в Трег-клетках и других чувствительных к IL-2 клетках (данные не представлены). Располагая данными о коротком времени полужизни пролейкина в организме человека, проводили исследование на обезьянах циномоглус с использованием одной дозы для оценки *in vivo* индукции и активации Трег-клеток. Пролейкин вызывал зависящее от дозы и времени изменение количества Трег-клеток, которое оценивали по кратности изменения абсолютных количеств, а также по активации pSTAT5a. В то время как увеличение количества Трег-клеток было номинальным (фиг. 28А: 10-40%), индуцируемое Proleukin® повышение pSTAT5a в Трег-клетках было значительным и зависящим от дозы через один день после обработки (фиг. 28Б), но имело небольшую продолжительность *in vivo* и уровень pSTAT5a возвращался к норме через 2-3 дня.

Сравнение способности DP47GS IgG-IL-2 и пролейкина индуцировать увеличение количества Трег-клеток *in vivo* у обезьян циномоглус представлено на фиг. 29. Нормальных здоровых обезьян циномоглус (по $n=5$ в группе) обрабатывали низкими дозами DP47GS IgG-IL-2 или высокими дозами пролейкина и анализировали изменения регуляторных Т-клеток в день 10. В дни 0 и 7 вводили SC DP47 IgG-IL-2 в дозе 16800 МЕ/кг (результаты для дозы 12 мкг/кг представлены на фиг. 26). На основе опубликованных данных исследований, в которых пролейкин вводили пациентам с диабетом типа 1 ($4,5 \times 10^6$ МЕ/индивидуума, 3 раза в неделю) и в которых было продемонстрировано, что он приводит к увеличению количества Трег-клеток, и данных, полученных при введении однократных доз, которые представлены на фиг. 28, пролейкин вводили SC 3 раза в неделю (М/В/В), осуществляя введение в общей сложности 5 доз по 200000 МЕ/кг каждая (доза для обезьян циномоглус, эквивалентная $4,5 \times 10^6$ МЕ/индивидуума). Результаты представлены на фиг. 29 в виде средних значений $\pm$ СКО для изменения общего количества Трег-клеток на mm^3 крови (фиг. 29А), кратности увеличения количества Трег-клеток (фиг. 29Б) и изменения соотношения между Трег-клетками и каноническими $CD4^+ FOXP3^+$ -клетками (фиг. 29В).

Хотя в течение 10-дневного периода было введено количество DP47GS IgG-IL-2, обладающее почти в 30 раз меньшей активностью, DP47GS IgG-IL-2 индуцировал большее увеличение количества Трег-клеток, чем пролейкин (фиг. 29А, $p=0,06$). Кратность увеличения количеств Трег-клеток по сравнению с исходным уровнем (фиг. 29Б) и увеличение количества Трег-клеток по сравнению с каноническими $CD4^+$ -Т-клетками (фиг. 29В) также были более значительными ($p=0,0011$ и $p=0,016$ соответственно) у обезьян, которым вводили DP47GS IgG-IL-2, по сравнению с обезьянами, которым вводили пролейкин. Для людей соотношение между регуляторными $CD4^+$ -Т-клетками (обычно их определяют как $FOXP3^+$ -клетки и с помощью комбинации маркеров клеточной поверхности) и не-регуляторными $CD4^+$ -Т-клетками (которые обозначают как канонические или эффекторные клетки) часто используют для определения функциональных уровней Трег-клеток в организме пациентов с течением времени.

Ответы *in vivo* субпопуляций клеток периферической крови обезьян циномоглус на обработку низкой дозой DP47GS IgG-IL-2

Клеточная специфичность *in vivo* IL-2 при обработке в низкой дозе представляет собой имеющий решающее значение параметр. При создании изобретения было установлено, что можно осуществлять высокочувствительный мониторинг клеточной активации *in vivo*, индуцируемый DP47GS IgG-IL-2 или пролейкином, путем измерения уровней pSTAT5a *ex vivo* в образцах крови, взятых в различные моменты

времени после введения доз обезьянам циномолгус или мышам. Ответы *in vivo* всех популяций клеток, мониторинг которых можно осуществлять *in vitro* (фиг. 8-10), можно анализировать также *ex vivo*.

Через 1 и 3 дня после введения *in vivo* одной дозы DP47GS IgG-IL-2 (12 мкг/кг) здоровым обезьянам циномолгус ($n=5$) собирали образцы цельной крови и анализировали в отношении фосфорилирования STAT5a как описано выше (см. описание экспериментальных процедур для табл. 4). У каждой обезьяны брали образец крови в день 0 перед обработкой и измеряли уровень фосфорилирования STAT5a, который использовали индивидуально для оценки кратности изменений после обработки. Кратность изменения pSTAT5a в Treg-клетках в дни 1 и 3 представлена на фиг. 30А, кратность изменения pSTAT5a в канонических эффекторных $CD4^+CD45RA^-$ -Т-клетках памяти представлена на фиг. 30Б, а кратность изменения pSTAT5a в канонических наивных эффекторных $CD4^+CD45RA^+$ -Т-клетках представлена на фиг. 30В. Результаты убедительно свидетельствуют о том, что в крови обезьян циномолгус, взятой через один и три дня после введения одной низкой дозы (12 мкг/кг) DP47GS IgG-IL-2, имело место предпочтительное повышение pSTAT5a в Treg-клетках по сравнению с Т-клетками памяти и наивными $CD4^+$ -Т-клетками (фиг. 30А-В). Очевидно, что однократная низкая доза DP47GS IgG-IL-2 была более эффективной, чем однократная высокая доза пролейкина (фиг. 28Б) в отношении вызывания продолжительного состояния активации *in vivo* Treg-клеток.

В первых исследованиях, в которых фосфорилирование STAT5a использовали в качестве биомаркера *in vivo* активации Treg-клеток, максимальный уровень pSTAT5a был выявлен только в день 1 при обработке одной дозой пролейкина (фиг. 28Б) и в дни 1 и 3 при обработке низкой дозой (12 мкг/кг) DP47GS IgG-IL-2 (фиг. 30А). Дополнительное титрование DP47GS IgG-IL-2 в сочетании с использованием образцов, взятых в дополнительные моменты времени, продемонстрировало, что pSTAT5a-сигналы *in vivo* могли поддерживаться в течение 4 дней, прежде чем они снижались опять до нормального уровня через 7 дней (фиг. 31А, 31Б). Величины MFI (средняя интенсивность флуоресценции) pSTAT5a-сигналов, измеренные как для дозы 2 мкг/кг (31А, $n=4$), так и для дозы 6 мкг/кг (31Б, $n=6$), свидетельствуют о том, что в этих случаях pSTAT5a-сигналы были меньше максимальных (см. фиг. 33Б). Даже указанные очень низкие дозы DP47GS IgG-IL-2 обеспечивали *in vivo* продолжительные сигналы от Treg-клеток, превосходящие сигналы, полученные после обработки пролейкином (фиг. 28Б). Эти результаты подкрепляют выдвинутую при создании изобретения гипотезу о том, что очень низкие уровни обладающего продолжительным временем жизни IL-2, т.е. DP47GS IgG-IL-2, но не пролейкина, могут стимулировать Treg-клетки в течение продолжительных периодов времени *in vivo*, тем самым позволяя уменьшать частоту обработок, необходимых для восстановления доминантной аутоотолерантности и улучшения исходов заболевания. Увеличение количества Treg-клеток в периферической крови после обработки низкой дозой IL-2 может отражать изменение в распределении клеток в организме, а не действительное увеличение количества клеток. Для того, чтобы установить, что увеличения Treg-клеток *in vivo* по меньшей мере частично обусловлено индукцией клеточного деления при обработке IL-2, проводили оценку внутриклеточного маркера пролиферации Ki-67. Ki-67 представляет собой белок, который можно обнаруживать в ядрах на фазах G_1 , S, G_2 и митоза, но который отсутствует в покоящихся клетках, находящихся на фазе G_0 клеточного цикла. Для обезьян циномолгус, обработанных 2 и 6 мкг/кг DP47GS IgG-IL-2, как описано выше (фиг. 31), осуществляли также мониторинг изменений *ex vivo* уровней внутриклеточного маркера Ki-67 как описано выше (см. описание экспериментальных процедур для табл. 4) для оценки степени пролиферации *in vivo*. Процент клеток, находящихся на фазах клеточного цикла (Ki-67⁺) в день 0 сравнивали с процентом Ki-67⁺-клеток в период с 1 по 11 день после обработки. Данные для Ki-67⁺-Treg-клеток представлены на фиг. 32А, для канонических эффекторных $CD4^+CD45RA^-$ -Т-клеток памяти представлены на фиг. 32Б, а для канонических наивных эффекторных $CD4^+CD45RA^+$ -Т-клеток представлены на фиг. 32В. Установлено, что в клетках крови обезьян циномолгус, собранных через 1-7 дней после введения одной низкой дозы DP47GS IgG-IL-2 (6 мкг/кг) имело место предпочтительное повышение уровня Ki-67 в Treg-клетках по сравнению с уровнями в канонических наивных эффекторных $CD4^+$ -Т-клетках (см. сравнение фиг. 32А с 32В). DP47GS IgG-IL-2 (6 мкг/кг) обладал способностью стимулировать пролиферацию канонических эффекторных $CD4^+$ -Т-клеток памяти (фиг. 32Б) в отличие от наивных эффекторных Т-клеток. При обработке минимальной дозой DP47GS IgG-IL-2 (2 мкг/кг) имела место минимальная активация клеточного цикла и пролиферация по сравнению с дозой 6 мкг/кг.

При анализах цельной крови человека и обезьян циномолгус было установлено, что активность *in vitro* двухвалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ в отношении Treg-клеток в целом была примерно в 6 раз более сильной, чем одновалентного DP47GS IgG-IL-2 (табл. 2 и 4). Поэтому первая доза для обезьян циномолгус была в 6 раз меньше наибольшей протестированной дозы DP47GS IgG-IL-2 (36 мкг/кг). DP47GS IgG-(IL-2)₂ после введения в дозе 6 мкг/кг ($n=4$) вызывал большие изменения Treg-клеток, присутствующих в кровотоке (фиг. 33А), которые сохранялись значительно дольше обычных 14 дней после обработки, значимые и продолжительные уровни pSTAT5a в Treg-клетках, которые возвращались к нормальным величинам через 1 неделю (фиг. 33Б), и почти 3-кратное увеличение количества Treg-клеток (фиг. 33В). Кратность изменений, индуцированных DP47GS IgG-IL-2 (см. фиг. 26, незакрашенные столбики) сравнивали с изменениями после обработки дозой 6 мкг/кг двухвалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ (затененный столбик) (фиг. 33Г). Аналогично тому, что было установлено при анализе цельной крови человека и обе-

зьян циномолгус, DP47GS IgG-(IL-2)₂ обладал повышенной эффективностью *in vivo*, превышающей (ожидаемое) 2-кратное увеличение, соответствующее количеству молекул IL-2 на молекулу IgG.

Обезьянам циномолгус вводили дополнительные дозы двухвалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ для оценки его воздействий *in vivo* при очень низких дозах (2 и 0,7 мкг/кг) (фиг. 34). В то время как доза 2 мкг/кг вызывала умеренные кратности изменений (в среднем 46%, диапазон от 20 до 70%, n=8), доза 0,7 мкг/кг оказывала слабое воздействие на количества Т-клеток (средняя величина увеличения 16%, n=3) (фиг. 34А). Обе низкие дозы стимулировали повышение pSTAT5a в Treg-клетках (фиг. 34Б, n=3 для каждой дозы), оказывая при этом слабое воздействие на pSTAT5a Teff-/Tmem-клеток (фиг. 34В, n=3 для каждой дозы).

Полные воздействия терапии с использованием одновалентного и двухвалентного содержащего IL-2 дикого типа слитого белка и его способность увеличивать количество Treg-клеток у обезьян циномолгус представлены на фиг. 35. Обе формы имеющего продолжительное время жизни IgG-IL-2 являются сильными индукторами Treg-клеток, что можно оценивать *in vivo*, используя pSTAT5a в качестве биомаркера активации, и, как представлено на рассматриваемом чертеже, приводят к кратному увеличению количества присутствующих в кровотоке Treg-клеток. DP47GS IgG-(IL-2)₂, обладающий повышенной эффективностью, обусловленной двойным количеством молекул IL-2 на С-конце IgG, обладал более сильной зависимостью от дозы по сравнению с DP47GS IgG-IL-2.

Деметилирование ДНК FOXP3 и CTLA-4 в субпопуляциях Т-клеток обезьян циномолгус

Функционально активные Treg-клетки обладают способностью продуцировать иммуносупрессорные цитокины CTLA-4, IL-10 и TGFβ и нуждаются в стабильной экспрессии фактора транскрипции FOXP3. Экспрессия FOXP3 в Treg-клетках человека и обезьян циномолгус зависит от деметилирования десяти CpG-сайтов метилирования ДНК в специфической для Treg деметилированной области (TSDR) в локусе FOXP3. Аналогично этому, экспрессия и производство CTLA-4 зависит от деметилирования семи CpG-сайтов метилирования ДНК в локусе CTLA-4 человека и обезьян циномолгус. Поэтому при создании изобретения проводили оценку статуса деметилирования как FOXP3, так и CTLA-4 в различных субпопуляциях CD4⁺-Т-клеток до и после обработки DP47GS IgG-IL-2 (n=4, 25 мкг/кг s.c.) и DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=4, 6 мкг/кг s.c.), которые вводили в тех дозах и в те моменты времени, которые, как было установлено ранее, значительно увеличивали количество Treg-клеток в крови. В опыте использовали только биологически наивных взрослых самцов обезьян циномолгус весом от 9,1 до 10,9 кг. Обработки проводили через 3 недели после первого исходного сбора образцов крови и сбора образцов крови через 4-5 дней после обработки. PBMC из 30 мл гепаринизированной крови разделяли с помощью FACSARIA™ (фирма Becton Dickinson) на соответствующие субпопуляции CD4⁺-клеток, включая Treg-клетки (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}), эффекторные Т-клетки памяти (CD4⁺CD45RA⁺), наивные эффекторные Т-клетки (CD4⁺CD45RA⁺) и CD4⁺CD25⁺CD127⁻-клетки.

Отсортированные субпопуляции клеток замораживали в виде аликвот по 100000 клеток и хранили в виде сухого дебриса при -80°C для того, чтобы проводить обработку одновременно для всех образцов. Осуществляли оттаивание клеточных дебрисов и экстракцию ДНК, и проводили одностадийную обработку бисульфитом с использованием набора Epitect Fast Lyse All (фирма Qiagen) согласно инструкциям производителя. Использовали по 5 нг (в 2 мкл) обработанной бисульфитом ДНК в 20 мкл смеси для первого раунда (цикла!!!) ПЦР для дуплекса, содержащей 10 мкл смеси из набора для мультиплексной ПЦР (фирма Qiagen), 6 мкл воды, 0,5 мкл прямого праймера для FOXP3 tgtaaacgacggccaggtTTTA-GAAGTTGTATGGGGGATGTT (SEQ ID NO: 54), 0,5 мкл обратного праймера для FOXP3 caggaacagctatgaccAAAATATCTACCCTCTTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 55), 0,5 мкл прямого праймера для CTLA-4 tgtaaacgacggccaggtGGGTTTGGTTATGAAGGAGTA TGA (SEQ ID NO: 56) и 0,5 мкл обратного праймера для CTLA-4 caggaacagctatgaccTTCACT TAATTTCCACTAAAAATACCC (SEQ ID NO: 57). Первый раунд циклической ПЦР проводили при 95°C в течение 15 мин, затем 20 циклов при 95°C в течение 30 с, при 60°C в течение 90 с и при 72°C в течение 60 с, затем в течение 10 мин при 72°C. ПЦР-продукт очищали с использованием гранул AMPure XP (фирма Becton Coulter) согласно инструкциям производителя и элюировали в 20 мкл воды. Осуществляли второй раунд ПЦР, в котором добавляли уникальную индексную последовательность к началу каждого образца, применяя 15 мкл смеси для ПЦР, содержащей 7,5 мкл смеси для мультиплексной ПЦР (фирма Qiagen), 6,5 мкл продукта, полученного в первом раунде ПЦР, и 1 мкл индексного праймера. Условия осуществления циклов второго раунда ПЦР были следующими: 95°C в течение 15 мин, затем 7 циклов при 95°C в течение 30 с, при 54°C в течение 90 с и при 72°C в течение 60 с, затем 5 мин при 72°C. ПЦР-продукты очищали с использованием гранул AMPure XP и элюировали в 15 мкл воды, и 4 мкл использовали для количественной оценки количества ПЦР-продукта с использованием устройства Shimadzu MultiNA. Объединяли одинаковые молярные концентрации каждого образца, создавая библиотеку для секвенирования, которую количественно оценивали с использованием набора для количественной оценки библиотек Кара Illumina. Библиотеку секвенировали с помощью набора Illumina MiSeq с использованием реагентов v3 и осуществляли прогоны для прочтения спаренных концевых фрагментов 2x300 пар оснований. Демультимплексирование осуществляли с помощью текстового драйвера bespoke python и применяли программу Cutadapt для удаления адапторов

для секвенирования. Прочтенные прямые и обратные последовательности сливали с использованием FLASH и выделяли последовательность каждого сайта метилирования.

Обработка обезьян циномоглус как DP47GS IgG-IL-2, так и DP47GS IgG-(IL-2)₂ индуцировала значительное увеличение количества Treg-клеток в крови всех обработанных животных аналогично тому, что было установлено ранее с использованием такого же протокола обработки (фиг. 33 и фиг. 35). Важно отметить, что быстрое и резкое увеличение Treg-клеток после обработки как DP47GS IgG-IL-2, так и DP47GS IgG-(IL-2)₂, не приводило к негативному воздействию или снижению статуса деметилирования FOXP3 (фиг. 36, верхняя панель) или CTLA-4 (фиг. 36, нижняя панель). Сходные результаты были получены для обеих молекул, данные для DP47GS IgG-(IL-2)₂ представлены на фиг. 36. Тот факт, что обработка не оказывала негативного воздействия и не снижала статуса деметилирования как FOXP3, так и CTLA-4, свидетельствует о том, что все Treg-клетки сохраняли свой естественный зрелый иммуносупрессорный фенотип, несмотря на значительное увеличение абсолютных количеств. Полученные на приматах кроме человека результаты оценки деметилирования FOXP3 и CTLA-4 в Treg-клетках позволяют предположить, что обработка человека низкими дозами имеющих продолжительное время жизни IgG-(IL-2)₂-подобными молекулами может увеличивать количества полностью функциональных зрелых Treg-клеток, что, в свою очередь, должно корректировать иммунорегуляторные дисбалансы при аутоиммунных заболеваниях человека, а также при других хронических иммуноопосредованных воспалительных заболеваниях.

Фармакокинетические характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в организме обезьян циномоглус

ФК-характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ оценивали на биологически наивных обезьянах циномоглус (фиг. 37). Обезьянам (n=2/дозу) вводили путем внутривенной (iv) и подкожной (sc) инъекции в дозе 30 или 100 мкг/кг стерильный DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в 3ФР, содержащем 0,5% сыворотки обезьян циномоглус, и брали образцы крови в различные моменты времени в период с 30 мин до 14 дней после инъекции. Оценку человеческого IL-2 в образцах плазмы обезьян циномоглус проводили согласно описанному выше методу. Предел обнаружения IL-2 в анализе с использованием плазмы обезьян циномоглус составлял 0,05 нг/мл. В образцах плазмы обезьян циномоглус, взятых до обработки, уровень IL-2 не поддавался обнаружению (т.е. был < 0,05 нг/мл).

В отличие от ФК слитых белков дикого типа (фиг. 25), когда их уровни в крови можно было обнаружить только через 48-72 ч, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ был обнаружен в плазме всех включенных в опыт обезьян циномоглус во все моменты времени вплоть до дня 14 при использовании iv- (фиг. 37А) и sc- (фиг. 37Б) путей введения. В течение первых двух-трех дней уровни в плазме были пропорциональны дозе и белки характеризовались более продолжительным временем полужизни по сравнению с содержащими IL-2 дикого типа слитыми молекулами.

Были проведены измерения уровней растворимого CD25 (sCD25, IL-2RA) в плазме (фиг. 37В), рассматриваемого в качестве биомаркера экспозиции IL-2 *in vivo*. В качестве реагентов применяли моноклональные антитела к человеческому sCD25, которые, как известно, вступают в перекрестную реакцию с sCD25 обезьян циномоглус, в сэндвич-иммуноанализе с применением захватывающего (MAB623, фирма R&D Systems) и биотинилированного идентифицирующего (BAF223, фирма R&D Systems) антител, используя конъюгированный с Eu⁺⁺ стрептавидин для обнаружения связанного sCD25. Повышение уровней sCD25 после введения DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ зависело от дозы и имело место в период с 1 по 7 день, после чего они возвращались к нормальным уровням в день 8.

Индукция Treg-клеток у обезьян циномоглус с помощью DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

В описанных ранее опытах на обезьянах циномоглус, которых обрабатывали *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 и DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типа, было обнаружено зависящее от дозы увеличение в 2-4 раза абсолютного количества Treg-клеток (фиг. 26 и 33 соответственно), что отражало их активности *in vitro*, выявленные в анализах цельной крови человека, а именно, 6-9-кратные различия *in vitro* (табл. 2 и 3). С учетом потери их эффективности *in vitro* в человеческой цельной крови (табл. 3), в качестве доз DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ *in vivo* были выбраны 30 и 100 мкг/кг. Так же, как и в предыдущих опытах, инъекцию DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ осуществляли iv- или sc-путем, рассчитывая индивидуальные дозы с учетом веса тела, и белок приготавливали для инъекции в наполнителе, представляющем собой стерильный 3ФР, pH 7,2, содержащий 0,5% стерильной нормальной сыворотки обезьян циномоглус (n=2 на дозу и путь инъекции). Образцы крови брали до обработки (в дни -4 и -5), сразу после обработки (день 0) и в различные моменты времени после обработки (дни 1-14) и анализировали в отношении гематологических изменений (общий анализ крови (СБС) и дифференцированный подсчет лейкоцитов), а также маркеров клеточной поверхности и внутриклеточных маркеров, описанных выше.

Увеличения общего количества CD4⁺ Treg-клеток, CD4⁺-Treg-клеток памяти, наивных CD4⁺-Treg-клеток и CD8⁺FOXP3⁺-Treg-клеток представлены в виде зависящих от дозы ответов либо в виде абсолютного количества клеток/мл крови (фиг. 38А и 38Б), либо в виде % от общего количества CD4⁺- или CD8⁺-Т-клеток (фиг. 38В и 38Г).

Общее количество CD4⁺-Treg-клеток увеличивалось после введения 100 мкг/кг с 90000/мл до 810000/мл (в 9 раз) и с 4,2% до 26% от общего количества CD4⁺-Т-клеток (в 6,2 раза) и все еще оставалось на повышенном уровне в день 14. После введения 30 мкг/кг общее количество CD4⁺-Treg-клеток

увеличивалось с 62000/мл до 447000/мл (в 7,2 раза) и с 4,5% до 16,7% от общего количества CD4⁺-клеток (в 3,7 раза).

Количество Трег-клеток памяти возрастало при введении 100 мкг/кг с 42000/мл до 536000/мл (в 12,8 раз) и с 2% до 17,4% от общего количества CD4⁺-Т-клеток (в 8,7 раз). При введении 30 мкг/кг количество Трег-клеток памяти увеличивалось с 51000/мл до 280000/мл (в 5,5 раз) и с 2,3% до 10,5% от общего количества CD4⁺-Т-клеток (в 4,6 раза).

Количество наивных Трег-клеток возрастало при введении 100 мкг/кг с 35000/мл до 272000/мл (в 7,8 раза) и с 2% до 8,6% от общего количества CD4⁺-Т-клеток (в 4,3 раза). При введении 30 мкг/кг количество наивных Трег-клеток увеличивалось с 46000/мл до 166000/мл (в 3,6 раза) и с 2,2% до 6,2% от общего количества CD4⁺-Т-клеток (в 2,8 раз).

После введения 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, количество CD8⁺FOXP3⁺-Трег-клеток увеличивалось от уровня, соответствующего редкому типу клеток, 16000/мл до 183000/мл (в 11,4 раза) и от 0,7% до 7,8% от общего количества CD8⁺-Т-клеток (в 11,1 раза). При введении дозы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, составляющей 30 мкг/кг, общее количество CD8⁺-Трег-клеток увеличивалось с 17000/мл до 101000/мл (в 5,9 раза) и с 0,5% до 4,3% от общего количества CD8⁺-Т-клеток (в 8,6 раза). Не было выявлено связанных с обработкой увеличений количества CD4⁺-Тeff-клеток памяти после введения 100 мкг/кг или 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (фиг. 39А); в действительности проценты снижались в день 4, по-видимому, вследствие большого увеличения количества CD4⁺-Трег-клеток в этот момент времени. Количество CD4⁺CD25^{hi}-Тeff-клеток памяти оставалось без изменения после введения 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, но было повышенным в 1,6 раза в день 4, после чего возвращалось к исходному уровню в дни 7-10 (фиг. 39Б).

Индукция pSTAT5a, CD25 и Ki-67 у обезьян циномоглус с использованием DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

Как указано выше, клеточная специфичность *in vivo* обработки с использованием IL-2 представляет собой имеющий решающее значение параметр, и при создании изобретения было продемонстрировано, что можно осуществлять мониторинг активации субпопуляции клеток *in vivo* путем измерения *ex vivo* pSTAT5a, уровней CD25 на клеточной поверхности и внутриклеточного Ki-67 в образцах крови, взятых в различные моменты времени после введения дозы.

Результаты, представленные на фиг. 40А и 40Б, демонстрируют, что после обработки с помощью DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ имели место предпочтительная индукция pSTAT5a и пролонгированные ответы в виде сигналов pSTAT5a в CD4⁺- и CD8⁺-Трег-клетках; максимальные ответы поддерживались в течение периода времени со дня 1 по день 4 как при введении дозы 100 мкг/кг, так и дозы 30 мкг/кг, и возвращались к исходному уровню через 7 дней. Ответы CD4⁺CD25^{hi}-Тeff-клеток памяти составляли ~ половину от максимальных уровней ответов в день 1 и возвращались к нормальному уровню в день 4. Для всех других протестированных типов клеток после обработки была выявлена слабая индукция pSTAT5a или она вообще не имела место.

Увеличение уровней CD25 на клеточной поверхности является следствием активации IL-2 и представляет собой чувствительный биомаркер активации *in vivo*. Вскоре после обработки DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, как в дозе 100 мкг/кг, так и в дозе 30 мкг/кг, уровень CD25 предпочтительно возрастал в CD4⁺клетках памяти и наивных Трег-клетках, а также в CD8⁺FOXP3⁺-Трег-клетках (фиг. 41 А, 41Б). CD25-ответы CD4⁺клеток памяти и наивных Трег-клеток достигали пика в день 4 и возвращались к исходному уровню через 7 дней, в то время как повышенные уровни CD25 в CD8⁺FOXP3⁺-Трег-клетках сохранялись в течение 10-14 дней.

В опытах с использованием содержащих IL-2 дикого типа слитых белков при создании изобретения было продемонстрировано, что Ki-67 представляет собой чувствительный внутриклеточный маркер для клеток, у которых началась пролиферация *in vivo*, и он оказался чувствительным биомаркером индуцируемой IL-2 активации у обезьян циномоглус. При анализе ответов на 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ было установлено, что 80-90% CD4⁺- и CD8⁺-Трег-клеток становились Ki-67-позитивными (Ki-67⁺) (фиг. 42А), в то время как после обработки дозой 30 мкг/кг Ki-67-позитивными становились 60-90% клеток (фиг. 42Б). Было установлено, что другие протестированные субпопуляции клеток были менее чувствительными по сравнению с Трег-клетками.

Для предварительного изучения *in vivo* воздействий новых сконструированных молекул IL-2 на увеличение количества Трег-клеток все дозы для обезьян циномоглус выражали в пмоль/кг, что позволяло осуществлять непосредственные сравнения независимо от молекулярной массы; зависимости ответов от дозы сравнивали по типу "голова-к голове" для максимальных увеличений количества CD4⁺-Трег-клеток в виде % от общего количества CD4⁺-Т-клеток (фиг. 43). Несмотря на потерю эффективности *in vitro* по сравнению со слитыми белками дикого типа, неожиданно было установлено, что DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ индуцировал большое увеличение количества Трег-клеток у обезьян циномоглус, по-видимому, вследствие увеличения его системной экспозиции как после *iv*-, так и после *sc*-введения.

Эозинофилия, возникающая вследствие введения IL-2 *in vivo*

Proleukin® у людей стимулирует эозинофилию при ежедневном применении в дозах от 1×10⁶ до

$4,5 \times 10^6$ МЕ/индивидуума. У обезьян циномогус обнаружено сходное увеличение количества эозинофилов у 100% животных после повторной обработки высокой дозой пролейкина или однократными дозами DP47GS IgG-IL-2, составлявшими 226 пмолей/кг (фиг. 44). На фиг. 44 представлены результаты для каждого тестируемого животного (исходные уровни для колоний были получены для животных перед тестированием: (n=44 и n=30) и для различных групп обработки (n=5-6) вне зависимости от того было ли количество эозинофилов нормальным или повышенным. Резким контрастом с воздействиями пролейкина и DP47GS IgG-IL-2 было фактическое отсутствие воздействия на эозинофилы DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ in vivo при его применении в дозах 170 и 570 пмолей/кг (30 и 100 мкг/кг соответственно). Указанное отсутствие индукции системной эозинофилии при обработке DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ является очень важным, принимая во внимание степень экспансии Treg, индуцированной указанными различными обработками (сравнение представлено на фиг. 43).

Обработка in vivo с использованием DP47GS IgG-IL-2 подавляет иммунные ответы у мышей

В предварительных исследованиях было установлено, что DP47GS IgG-IL-2 в дозе 4000 МЕ активировал мышинные регуляторные FOXP3⁺-Т-клетки in vivo; далее эту дозу применяли для оценки его способности подавлять классические зависящие от Т-клеток иммунные ответы у мышей, т.е. реакцию гиперчувствительности замедленного типа (фиг. 45) и IgG-ответ на KLH (фиг. 46).

NOD-мышей и C57BL/6-мышей (n=7) иммунизировали путем IV-инъекции бараньими эритроцитами (srbc) и осуществляли контрольное заражение через 3 дня, используя болюсную инъекцию srbc, в одну заднюю лапу для индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (DTH). Через один день после контрольного заражения мышей умерщвляли обработкой CO₂, отрезали лапы и взвешивали. Величина DTH-ответа представлена в виде изменения веса лап по сравнению с неиммунизированными мышами (А веса лап). DP47GS IgG-IL-2 вводили SC в дозе 4000 МЕ на мышью за 3 дня до иммунизации и в день иммунизации srbc и наполнителем, который представляли собой стерильный 3ФР, pH 7,2. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Манна-Уитни с использованием программы GraphPad Prism.

Обработка DP47GS IgG-IL-2 за 3 дня до и в день иммунизации бараньими эритроцитами подавляла дальнейшую реакцию гиперчувствительности замедленного типа на контрольное заражение бараньими эритроцитами на 51% у NOD-мышей (фиг. 45А; $p=0,0023$) и на 38% у C57BL/6-мышей (фиг. 45Б; $p=0,002$). Применяемый в качестве положительного контроля иммунодепрессант мышинный CTLA-4-Ig ингибировал DTH-реакцию в такой же степени, что и DP47GS IgG-IL-2.

DP47GS IgG-IL-2 также обладал способностью подавлять KLH-специфические IgG-ответы у мышей линий C57BL/6 (ингибирование на 78%, $p=0,0007$, фиг. 46А) и NOD (ингибирование на 67%, $p=0,004$, фиг. 46Б). В этом эксперименте здоровых молодых мышей C57BL/6 (n=7-10) и NOD (n=13-14) иммунизировали путем IP-инъекции с помощью 100 мкг человеческой вакцины, содержащей чистый KLH без адьюванта, согласно рекомендациям производителя (фирма Stellar). Обработка DP47GS IgG-IL-2 включала 1 (NOD) или 2 (C57BL/6) еженедельные SC-обработки 4000 МЕ на мышью в день иммунизации. Через 7 дней (NOD) и 21 день (C57BL/6) после иммунизации получали образцы крови и определяли уровни в сыворотке KLH-специфических IgG-ответов с помощью ELISA.

Способность DP47GS IgG-IL-2 подавлять иммунные ответы in vivo подтверждает гипотезу о том, что активация регуляторных Т-клеток, индуцируемая низкой дозой IL-2, приводит к образованию функциональных регуляторных Т-клеток, что опосредует снижение иммунного ответа.

Хотя представленное выше изобретение описано достаточно подробно с целью иллюстрации и примера для более ясного и лучшего понимания, описание и примеры не следует рассматривать в качестве ограничивающих объем изобретения. Описание всех патентов и научной литературы, процитированных в настоящем описании, специально полностью включено в него в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок для избирательной активации регуляторных Т-клеток, содержащий (I) молекулу иммуноглобулина и (II) две мутантные молекулы интерлейкина-2 (IL-2), который включают аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа, где указанные мутантные молекулы интерлейкина-2 содержат последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64.

2. Слитый белок по п.1, в котором указанная молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу иммуноглобулина IgG-класса, предпочтительно молекулу иммуноглобулина IgG₁-подкласса.

3. Слитый белок по п.1 или 2, в котором указанная молекула иммуноглобулина представляет собой человеческую молекулу иммуноглобулина.

4. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина не обладает способностью специфически связываться с антигеном.

5. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, основой которой является по-

следовательность человеческой зародышевой линии Vh3-23.

6. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9.

7. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, основой которой является последовательность человеческой зародышевой линии Vk3-20.

8. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11.

9. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит модификацию, которая снижает аффинность связывания молекулы иммуноглобулина с Fc-рецептором по сравнению с соответствующей молекулой иммуноглобулина без указанной модификации.

10. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотную замену в положении 329 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина.

11. Слитый белок по п.10, в котором указанная аминокислотная замена представляет собой P329G.

12. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) тяжелых цепей иммуноглобулина.

13. Слитый белок по п.12, в котором указанные аминокислотные замены представляют собой L234A и L235A (LALA).

14. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором указанная молекула иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) в тяжелых цепях иммуноглобулина.

15. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором каждая из указанных мутантных молекул IL-2 слита на своей N-концевой аминокислоте с C-концевой аминокислотой одной из иммуноглобулиновых тяжелых цепей указанной молекулы иммуноглобулина, необязательно через пептидный линкер.

16. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, в котором каждая из указанных мутантных молекул IL-2 слита с указанной молекулой иммуноглобулина через пептидный линкер.

17. Слитый белок по п.16, в котором указанный пептидный линкер содержит по меньшей мере 10, в частности по меньшей мере 15 аминокислот.

18. Слитый белок по п.16 или 17, в котором указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

19. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов, где слитый белок содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 50.

20. Слитый белок по одному из предыдущих пунктов для лечения аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, где указанный слитый белок избирательно активирует регуляторные Т-клетки.

21. Слитый белок по одному из пп.1-20, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства для лечения аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний.

22. Слитый белок по одному из пп.1-20, предназначенный для применения для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат против хозяина".

23. Слитый белок по п.22, где указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей диабет типа 1, системную красную волчанку, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и рассеянный склероз.

24. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по одному из предыдущих пунктов.

25. Вектор, предназначенный для экспрессии слитого белка по любому из пп.1-19 и содержащий полинуклеотид по п.24.

26. Клетка-хозяин для получения слитого белка по любому из пп.1-19, содержащая полинуклеотид по п.24 или вектор по п.25.

27. Способ получения слитого белка по любому из пп.1-19, содержащего молекулу иммуноглобулина и две мутантные молекулы IL-2, содержащие аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантной молекулы IL-2 к обладающему промежуточной аффинностью рецептору IL-2 по сравнению с молекулой IL-2 дикого типа, включающий стадии, на которых (I) культивируют клетку-хозяина по п.26 в условиях, пригодных для экспрессии слитого белка, и (II) выделяют слитый белок.

28. Фармацевтическая композиция для лечения аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, содержащая слитый белок по одному из пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, предназначенная для применения в качестве лекарст-

венного средства для лечения аутоиммунных заболеваний и иммуноопосредованных воспалительных заболеваний.

30. Фармацевтическая композиция по п.28, предназначенная для применения для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат против хозяина".

31. Фармацевтическая композиция по п.30, где указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей диабет типа 1, системную красную волчанку, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и рассеянный склероз.

32. Применение слитого белка по одному из пп.1-19 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума который нуждается в этом, где указанное заболевание представляет собой отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат против хозяина".

33. Применение по п.32, в котором указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей диабет типа 1, системную красную волчанку, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и рассеянный склероз.

34. Применение по пп.32 или 33, в котором указанный индивидуум представляет собой млекопитающее, в частности человека.

35. Способ лечения заболевания у индивидуума, выбранного из аутоиммунного заболевания, отторжения трансплантата или реакции "трансплантат против хозяина", включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, которая содержит слитый белок по одному из пп.1-19 в фармацевтически приемлемой форме.

36. Способ по п.35, в котором указанное аутоиммунное заболевание выбирают из группы, включающей диабет типа 1, системную красную волчанку, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и рассеянный склероз.

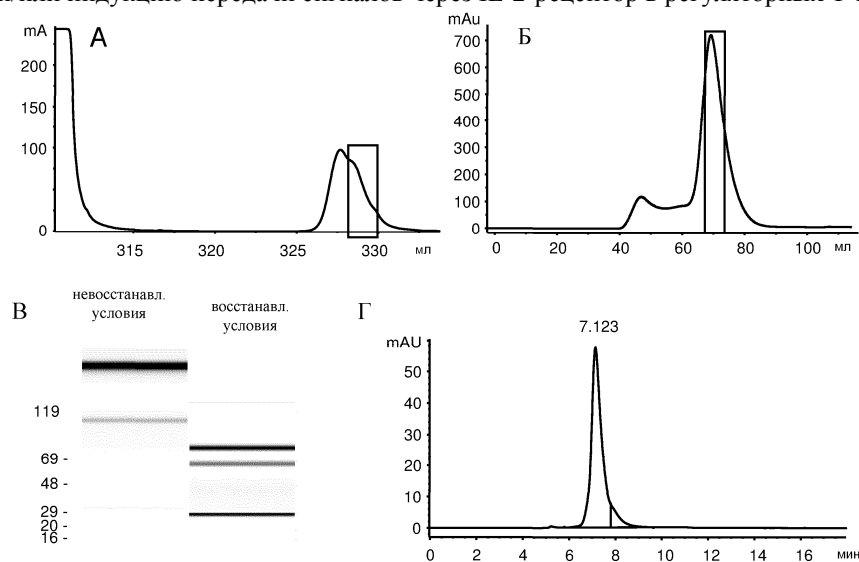
37. Способ по пп.35 или 36, в котором указанный индивидуум представляет собой млекопитающее, в частности человека.

38. Слитый белок по одному из пп.1-19, предназначенный для применения для избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*.

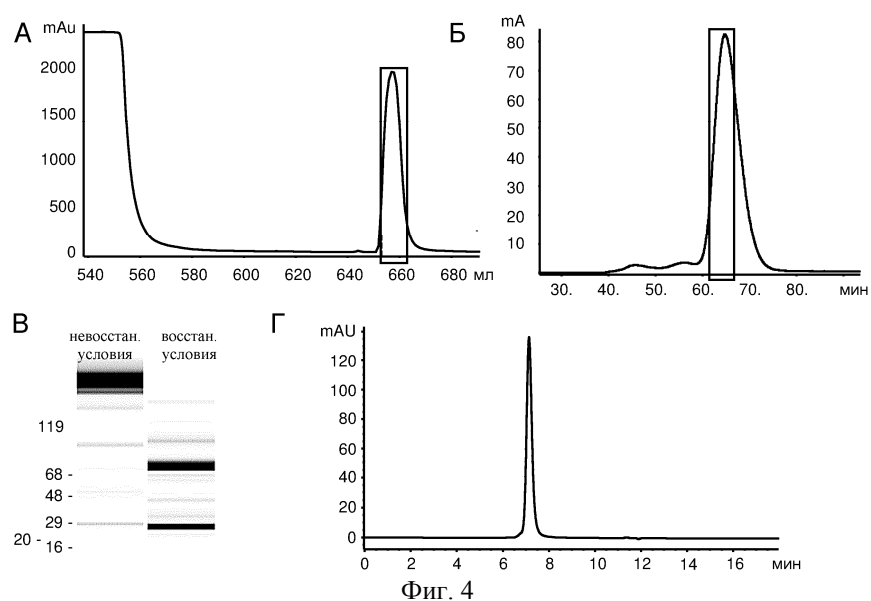
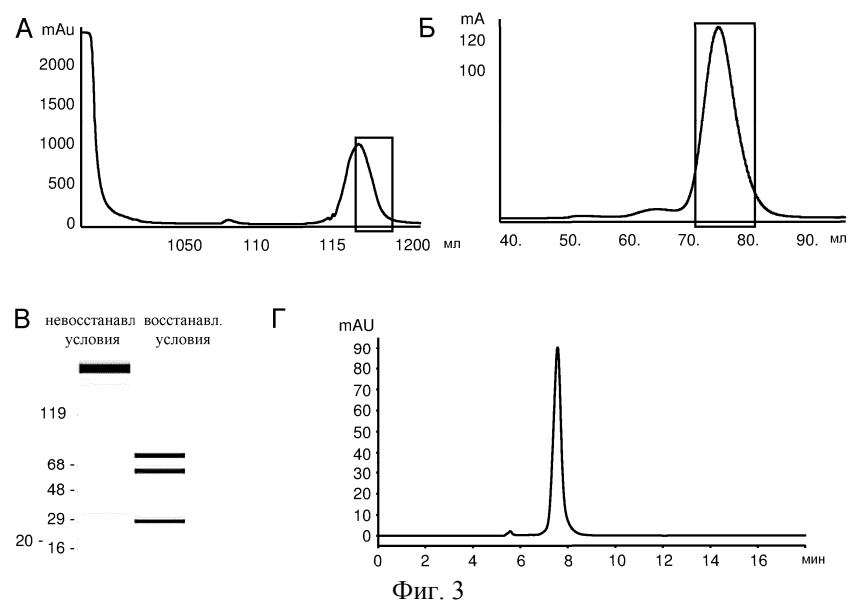
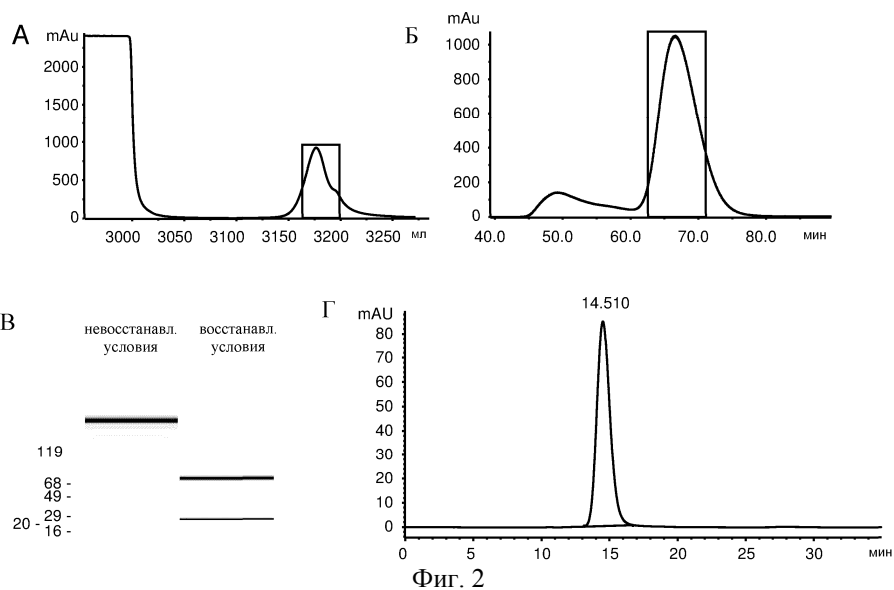
39. Слитый белок по п.38, в котором указанная активация включает индукцию пролиферации регуляторных Т-клеток и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор в регуляторных Т-клетках.

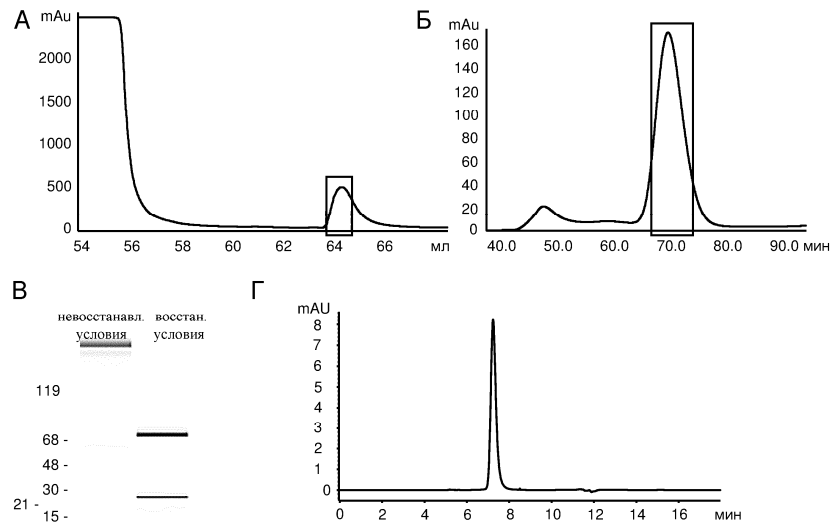
40. Способ избирательной активации регуляторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo*, включающий контактирование указанных регуляторных Т-клеток со слитым белком по одному из пп.1-19.

41. Способ по п.40, в котором указанная активация включает индукцию пролиферации регуляторных Т-клеток и/или индукцию передачи сигналов через IL-2-рецептор в регуляторных Т-клетках.

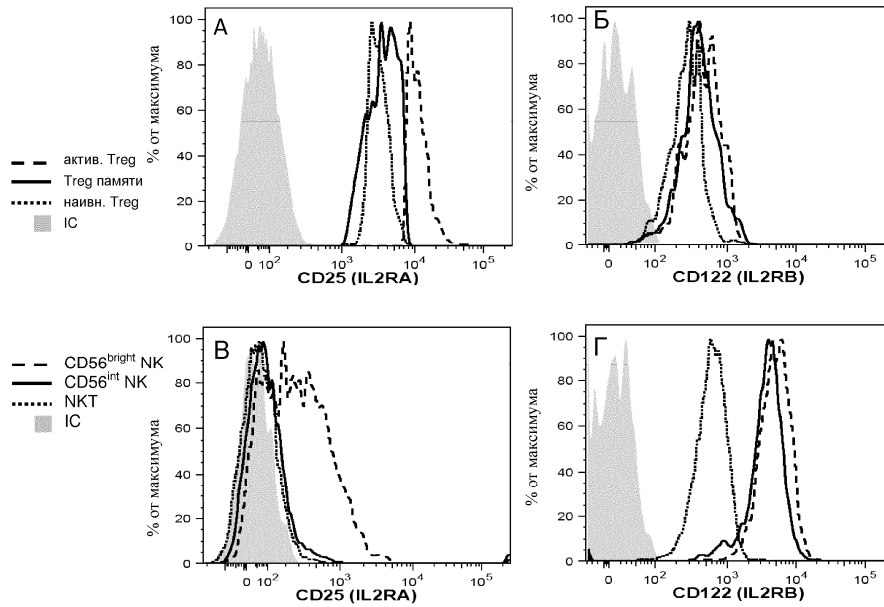


Фиг. 1

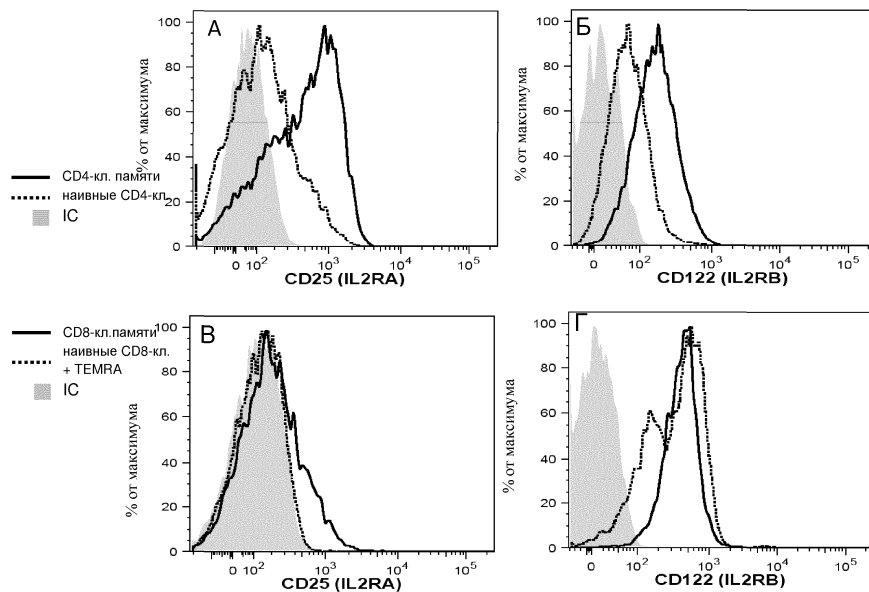




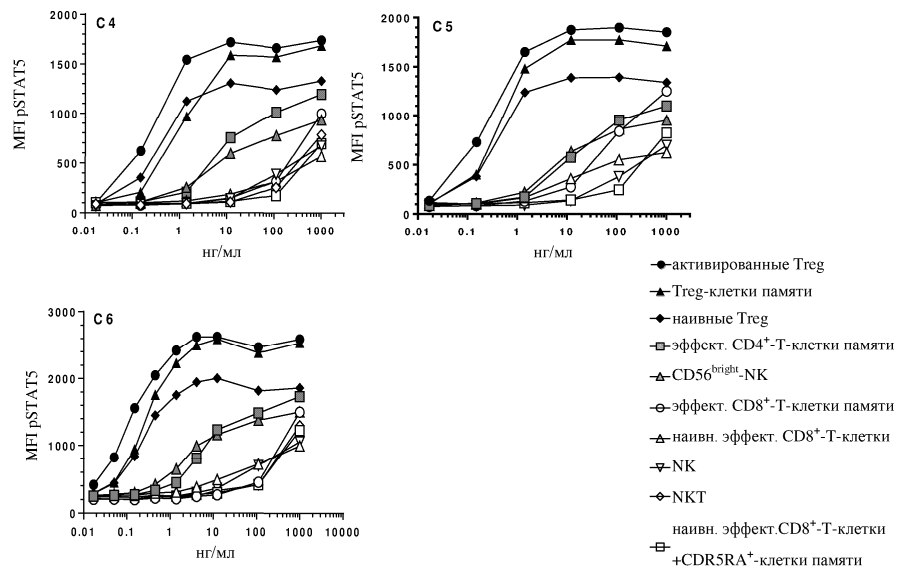
Фиг. 5



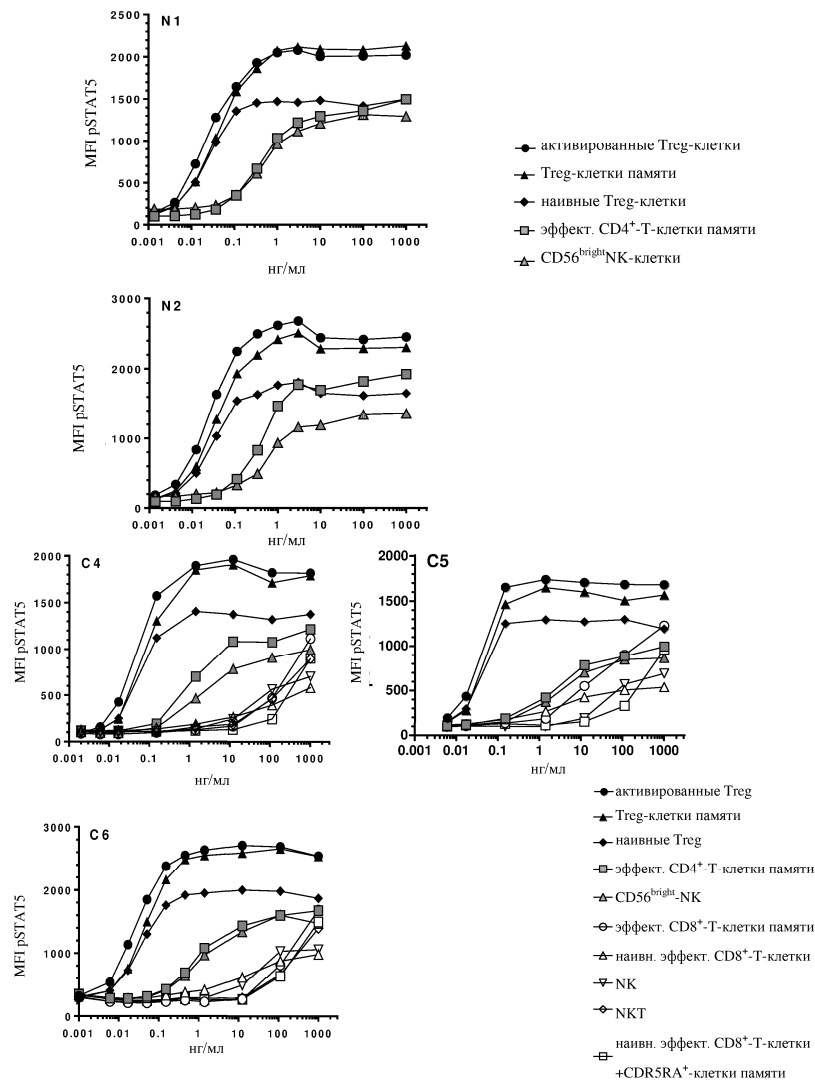
Фиг. 6



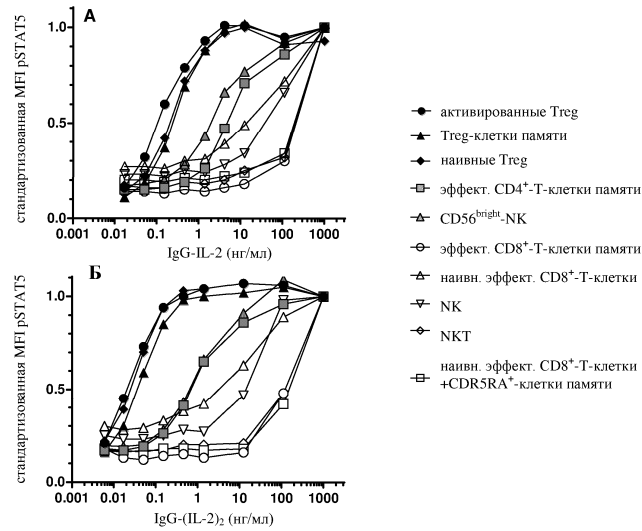
Фиг. 7



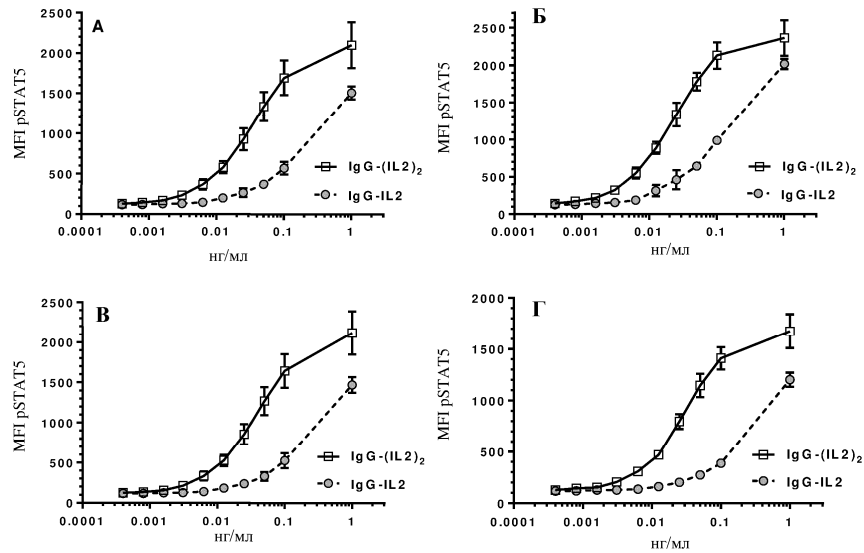
Фиг. 8



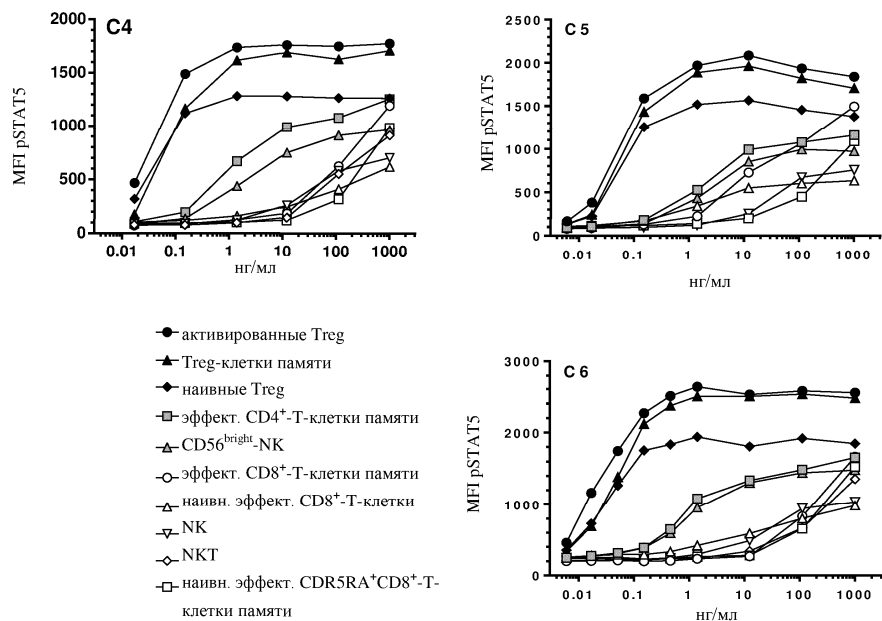
Фиг. 9



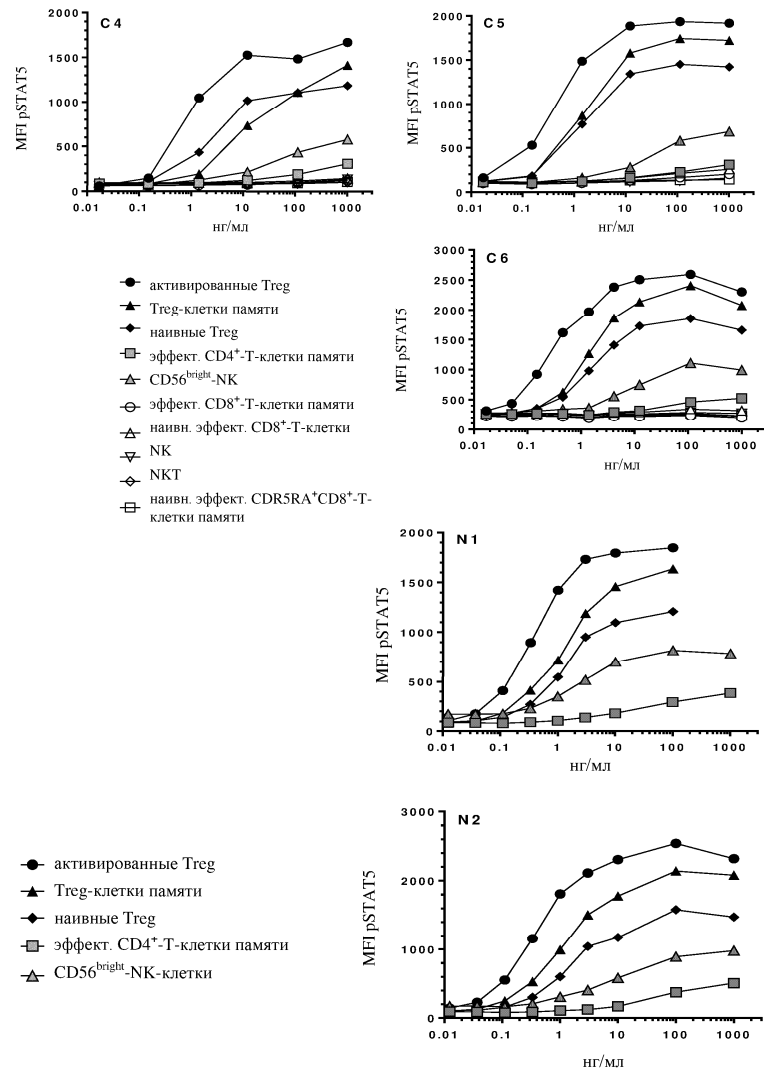
Фиг. 10



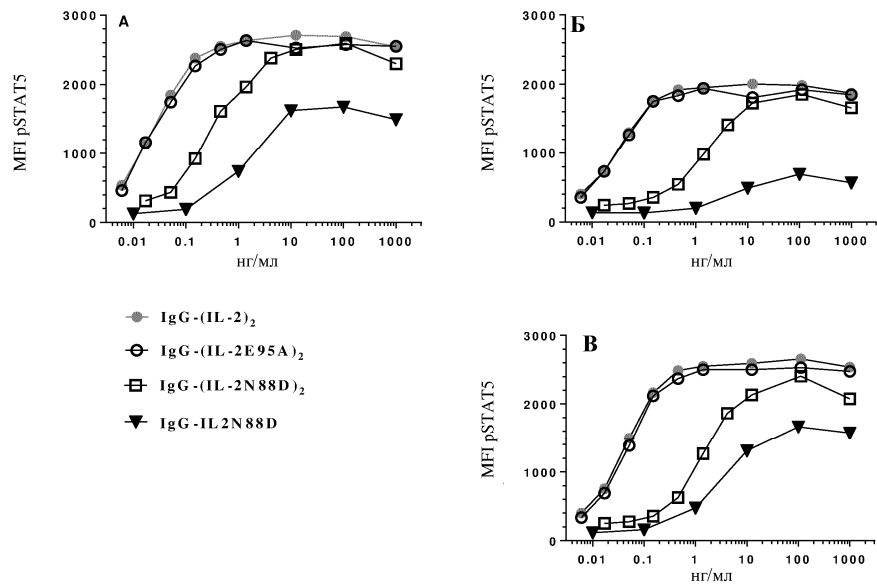
Фиг. 11

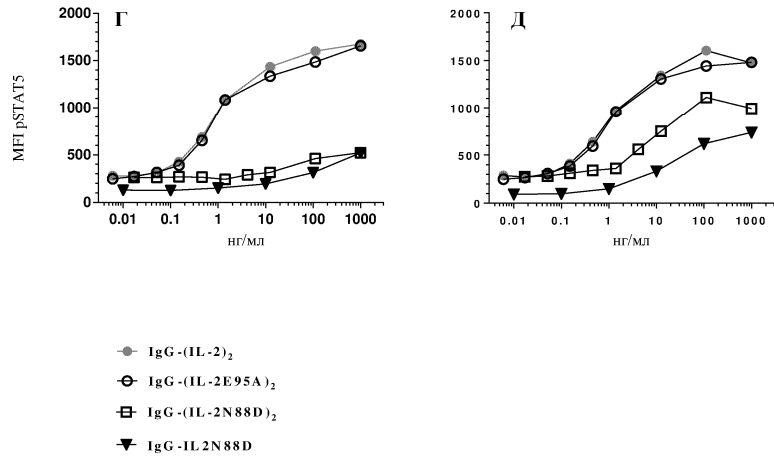


Фиг. 12

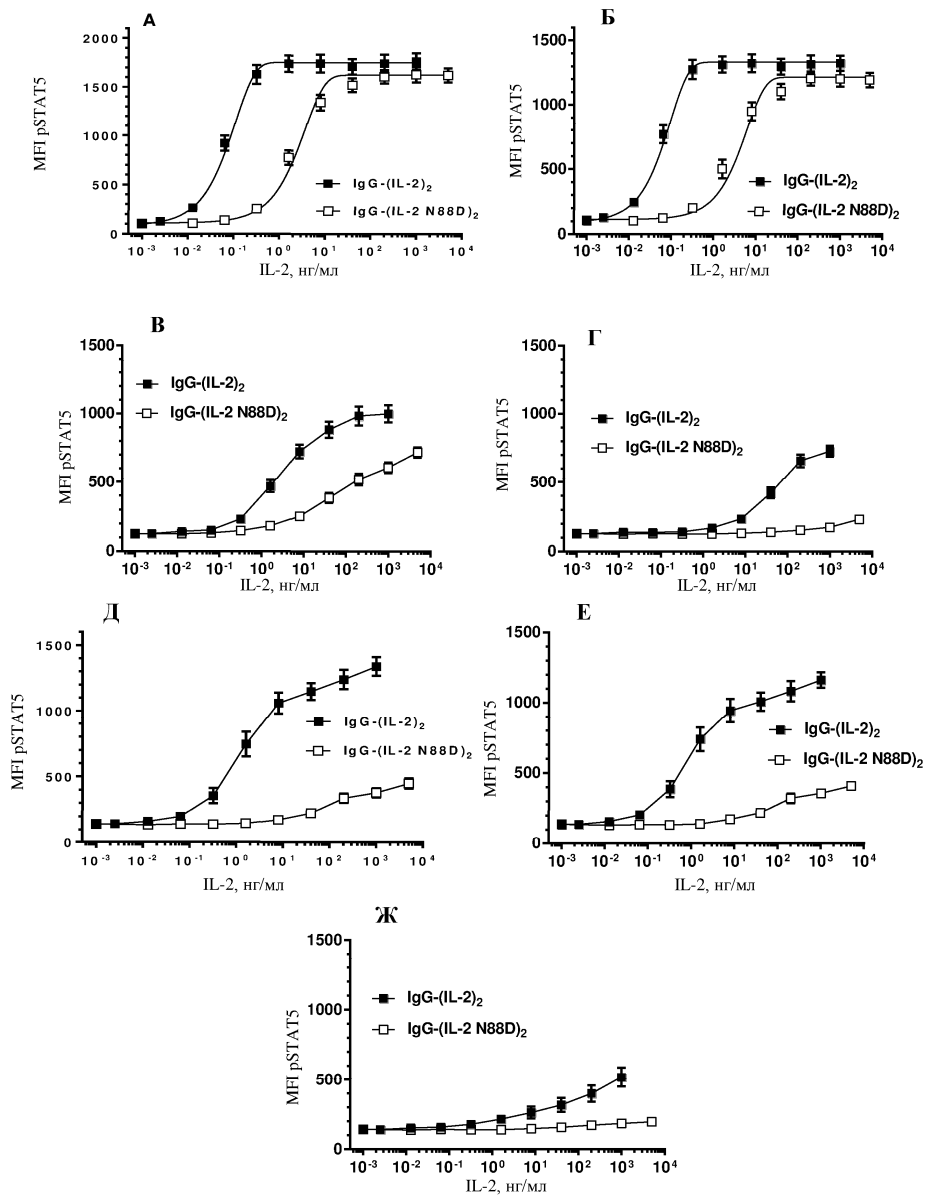


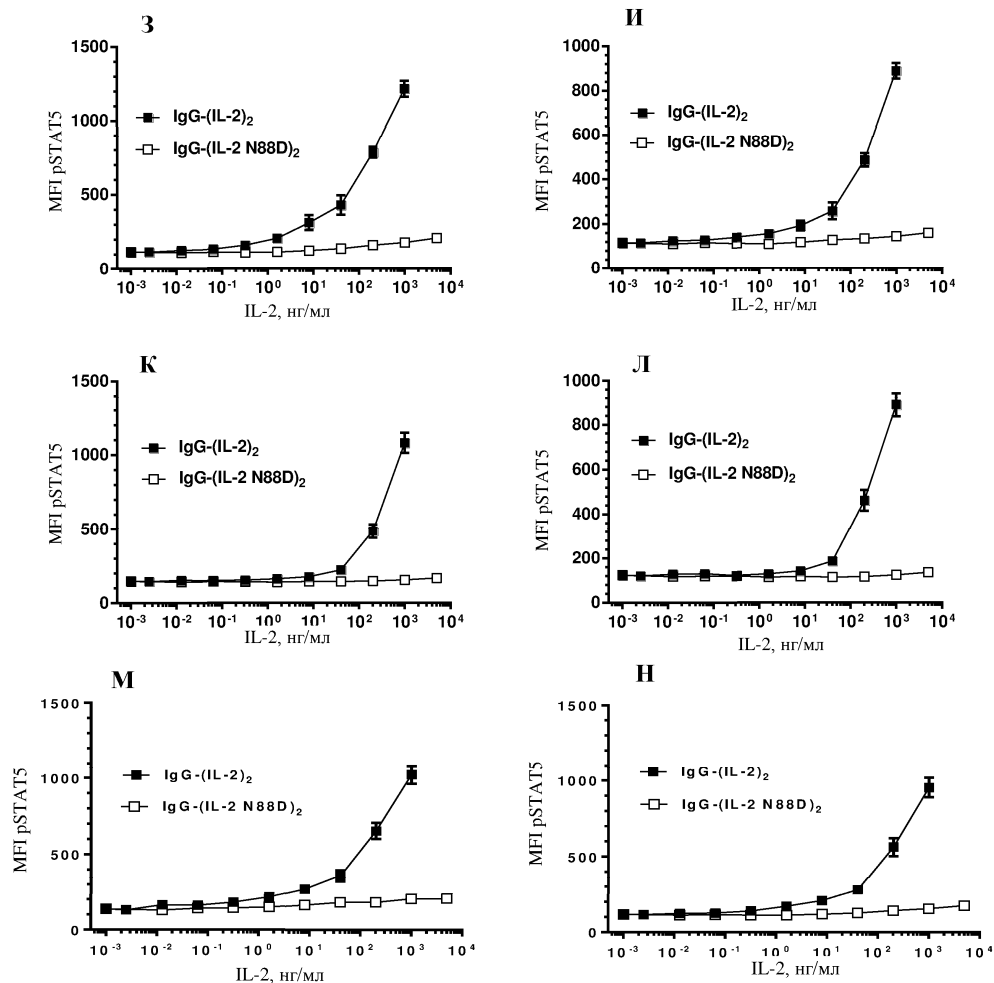
Фиг. 13



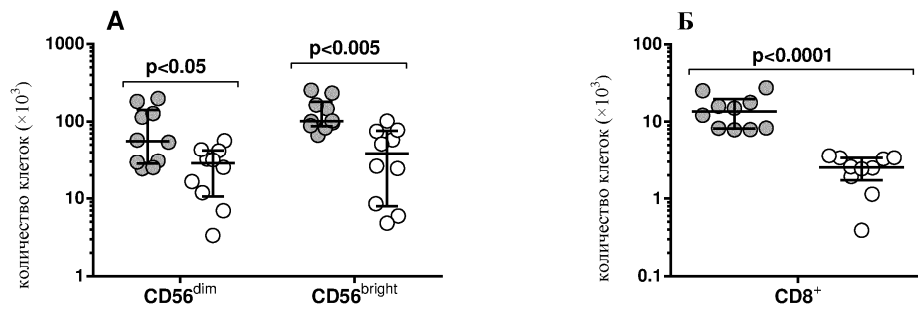


Фиг. 14

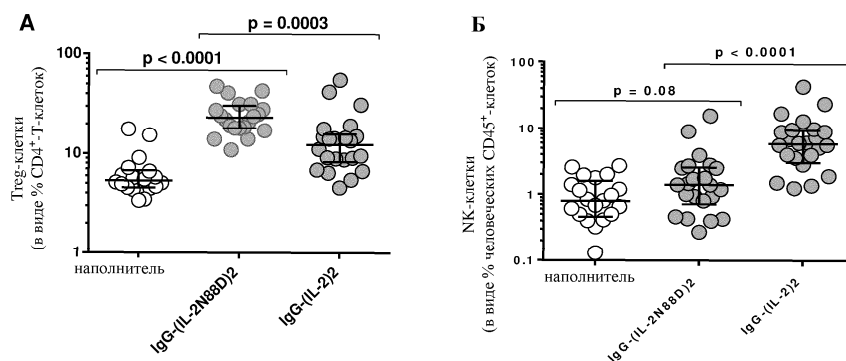




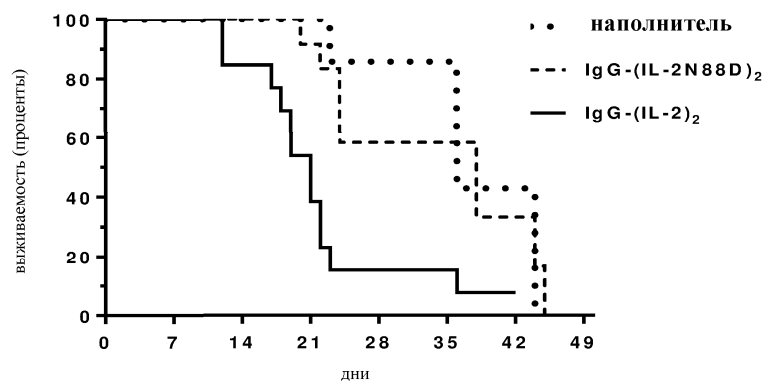
Фиг. 15



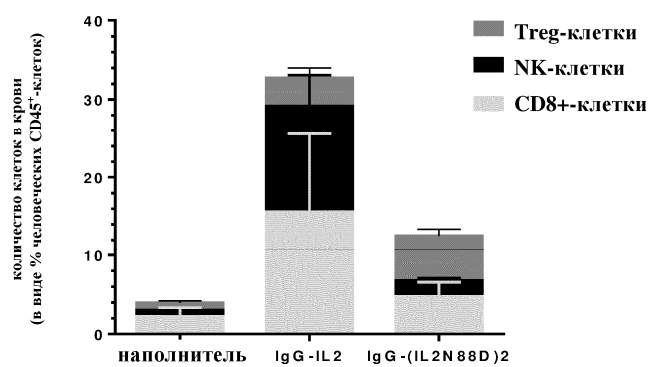
Фиг. 16



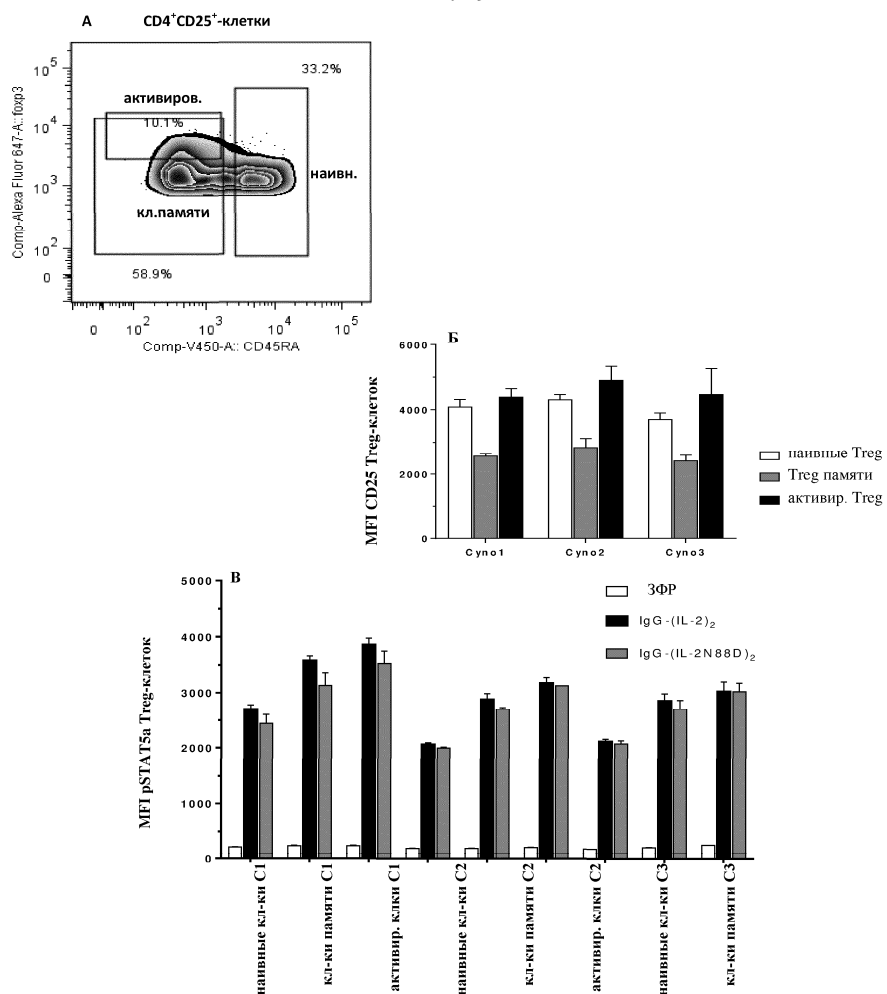
Фиг. 17



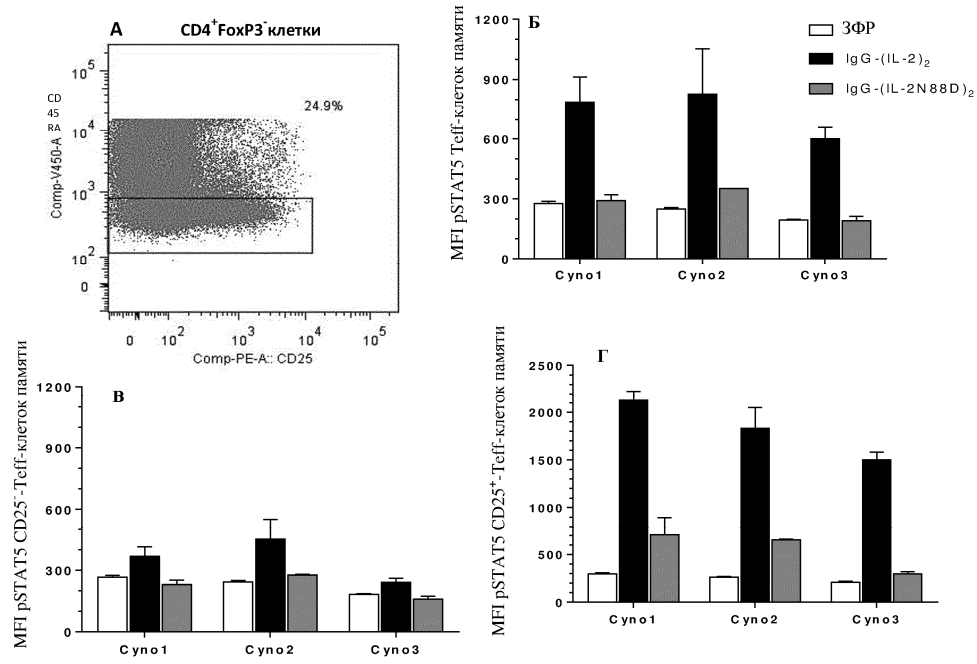
Фиг. 18



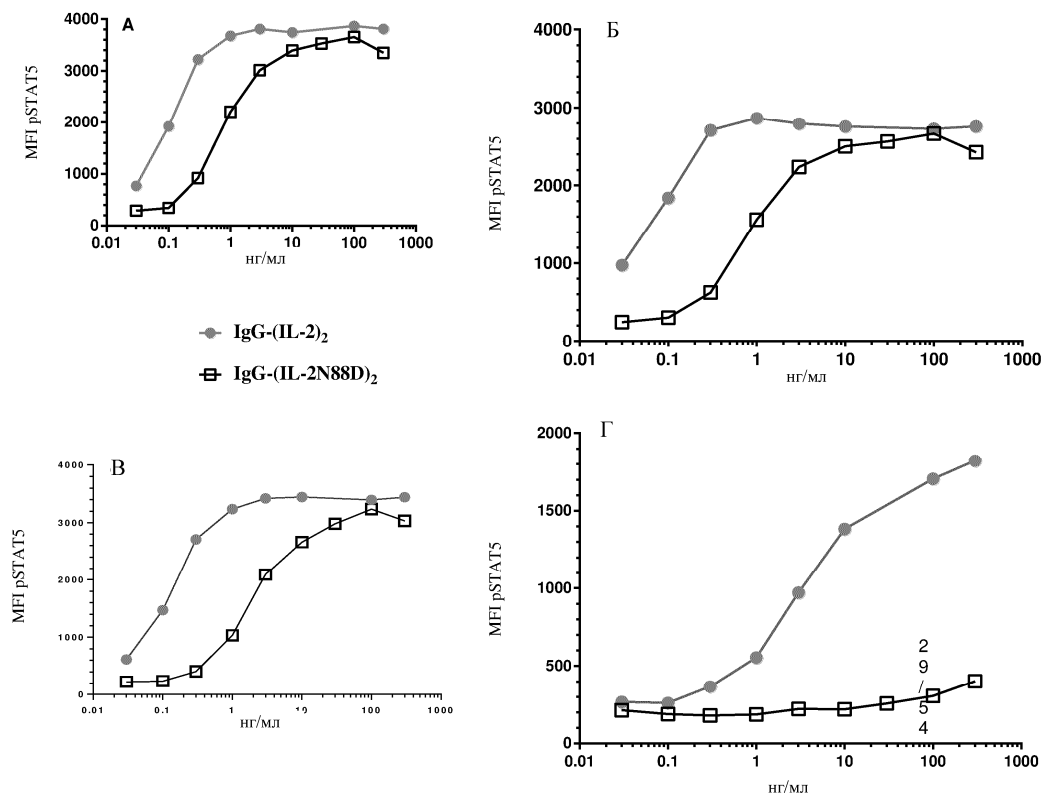
Фиг. 19



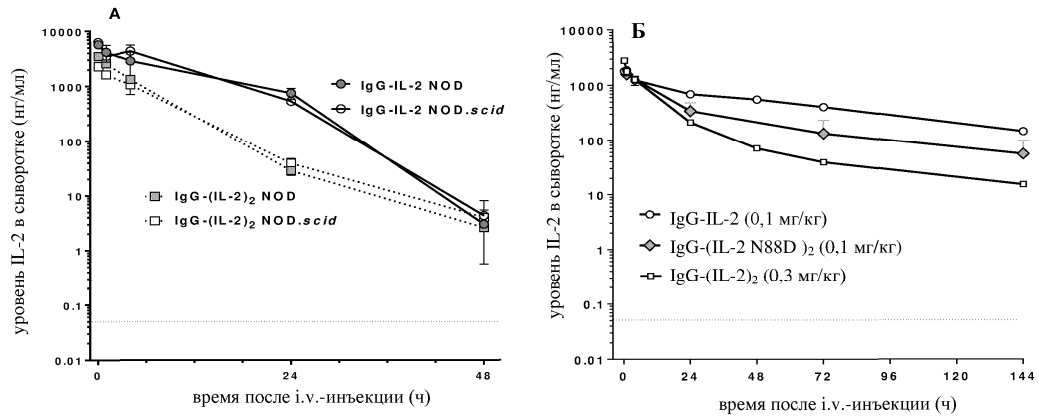
Фиг. 20



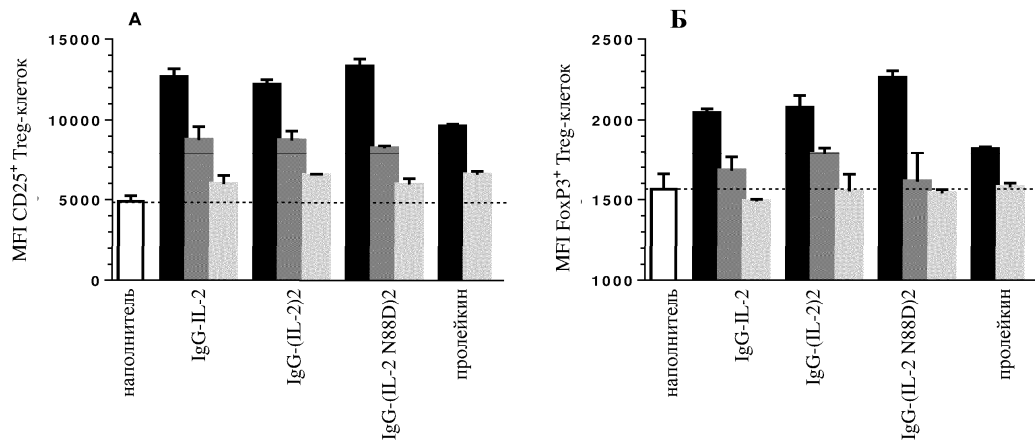
Фиг. 21



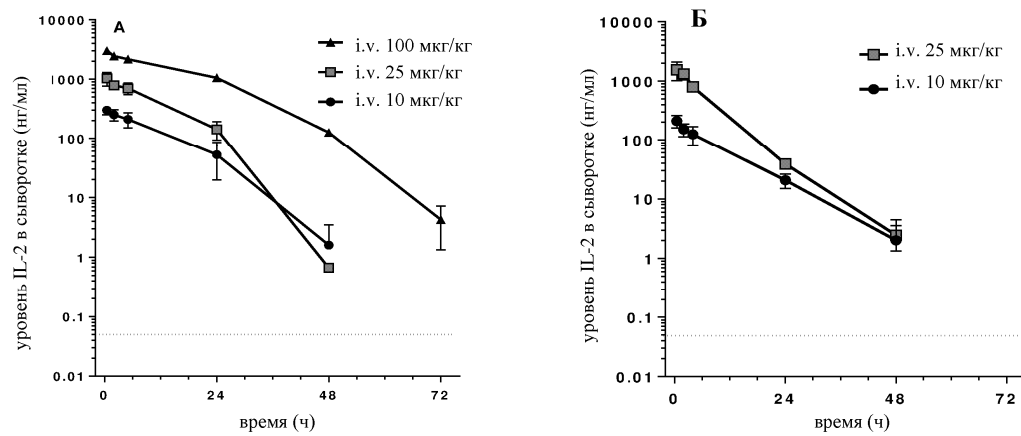
Фиг. 22



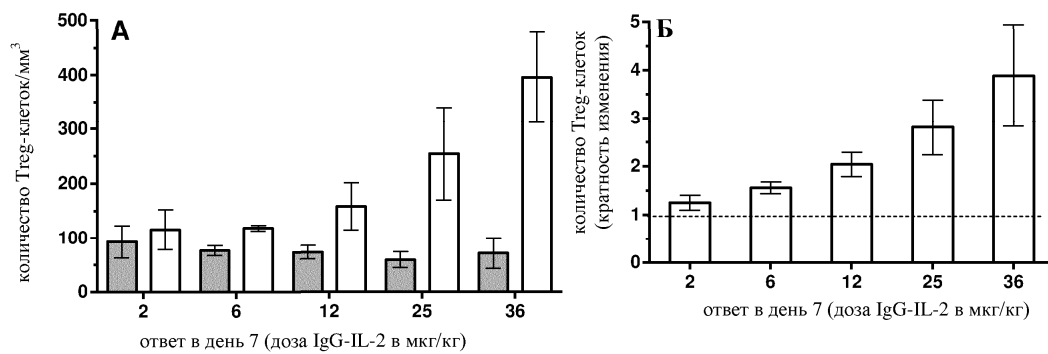
Фиг. 23



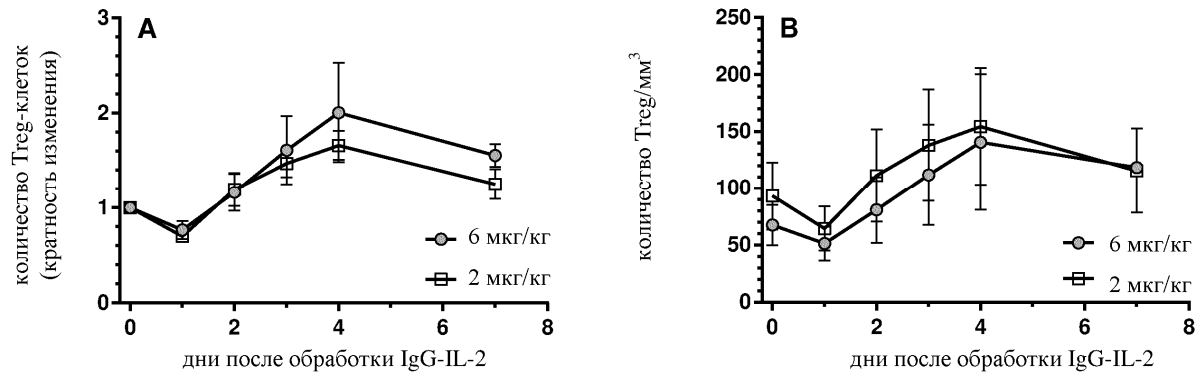
Фиг. 24



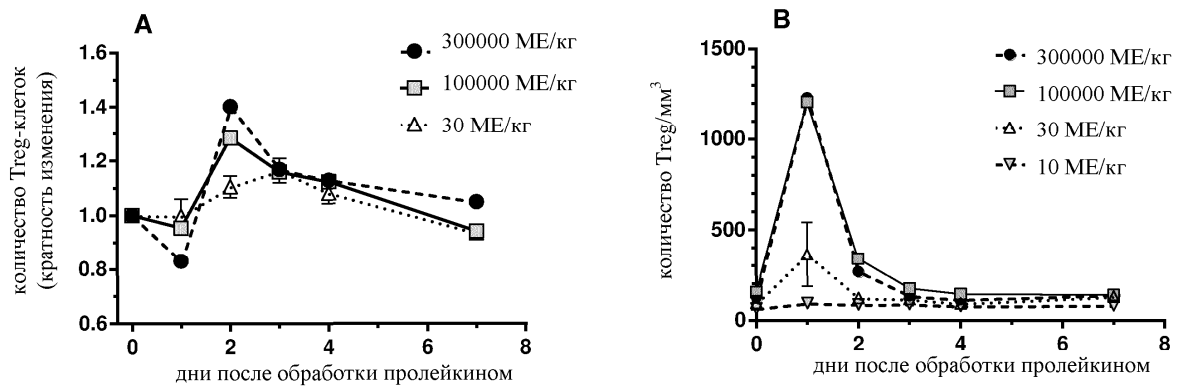
Фиг. 25



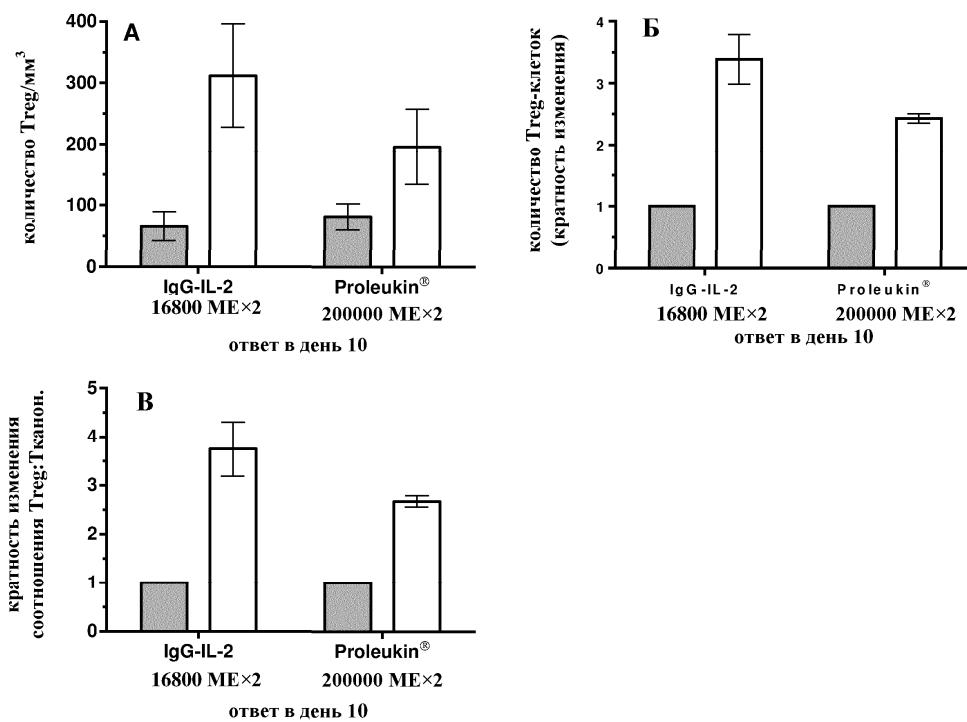
Фиг. 26



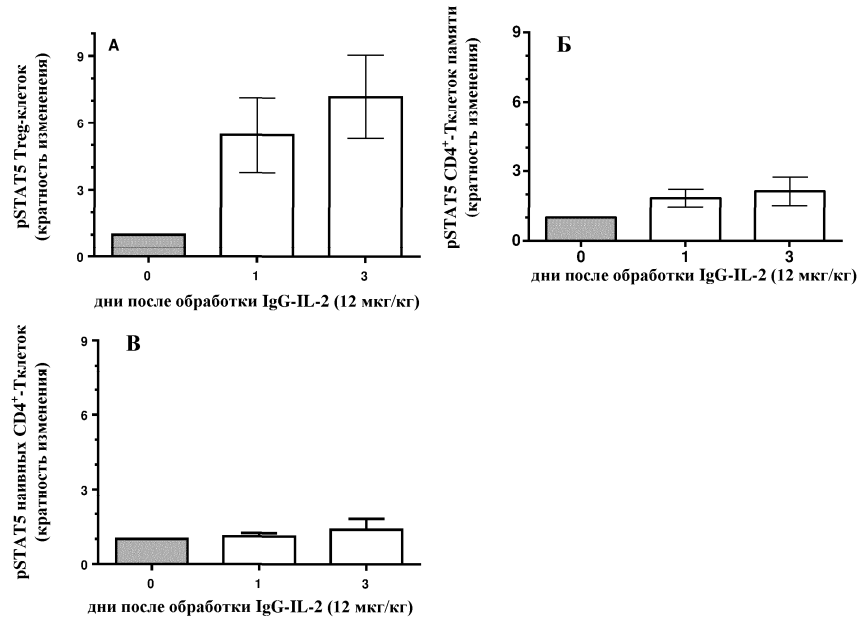
Фиг. 27



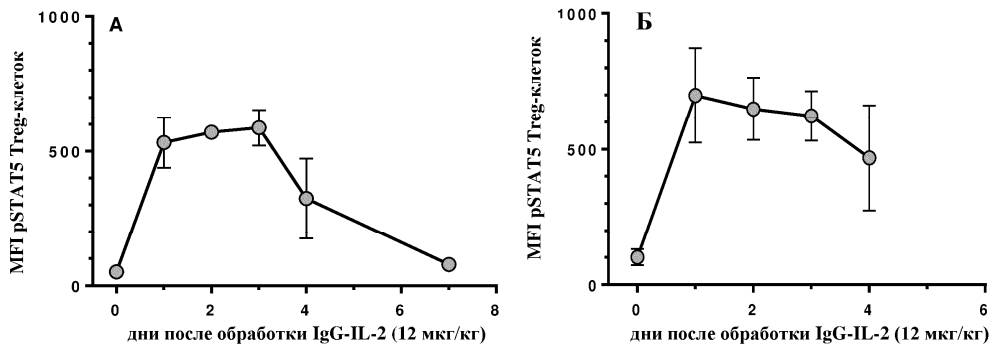
Фиг. 28



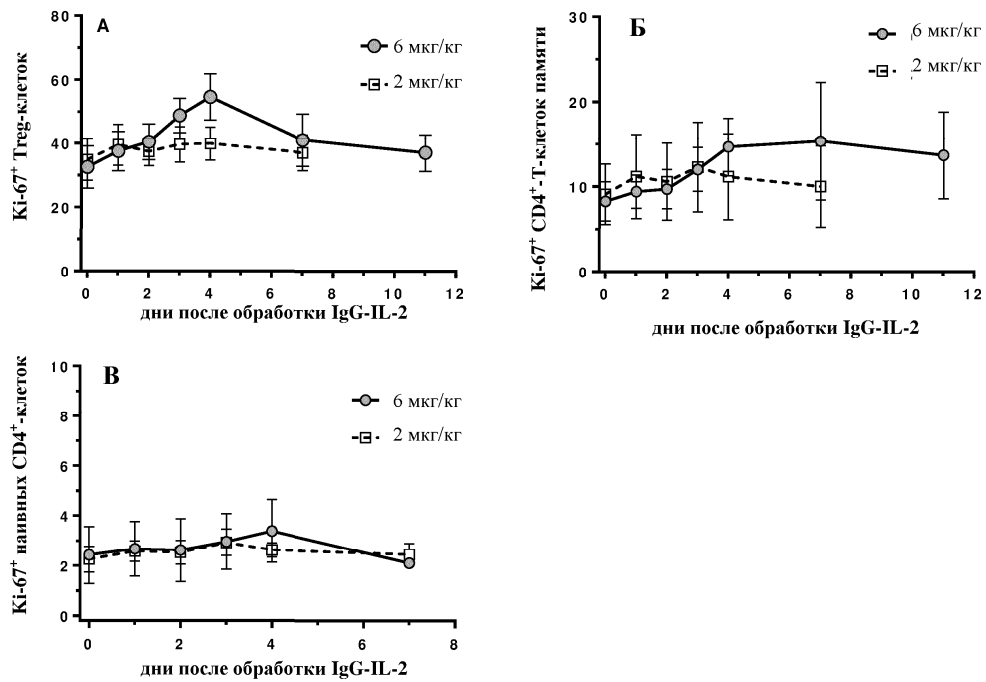
Фиг. 29



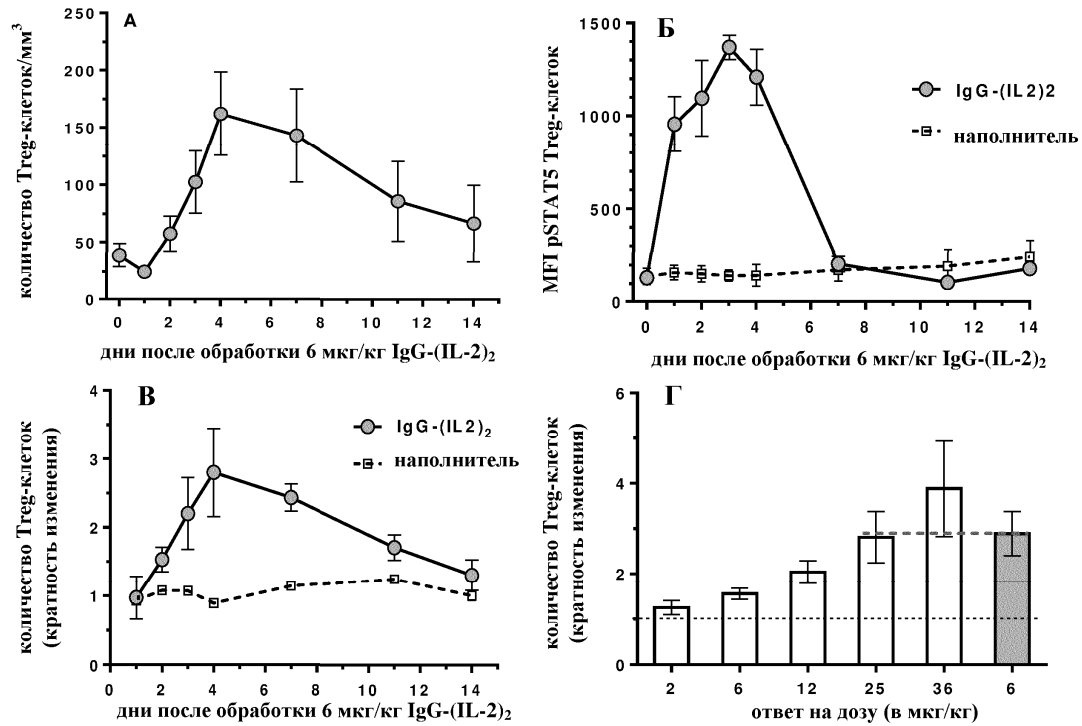
Фиг. 30



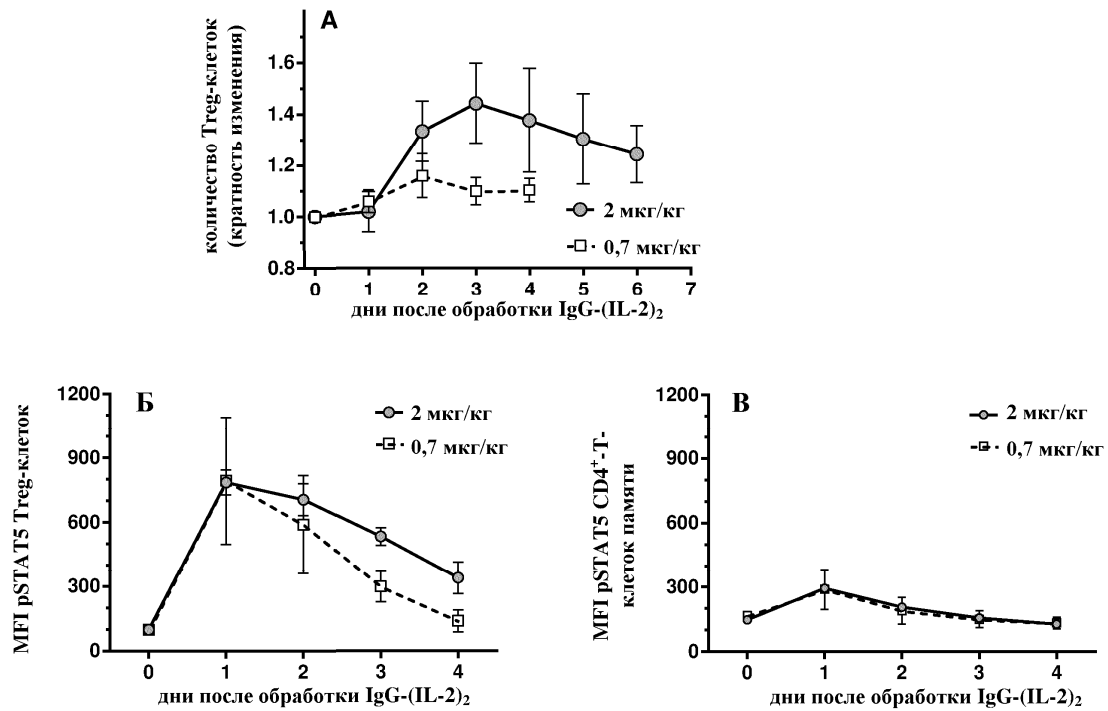
Фиг. 31



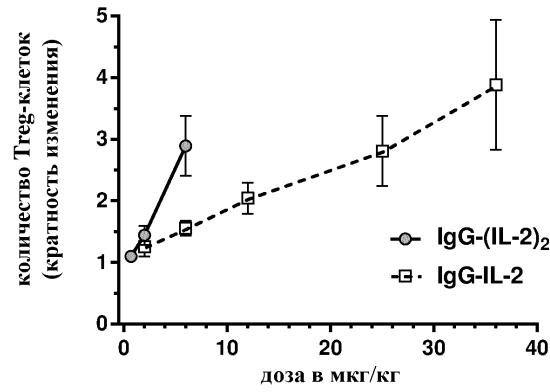
Фиг. 32



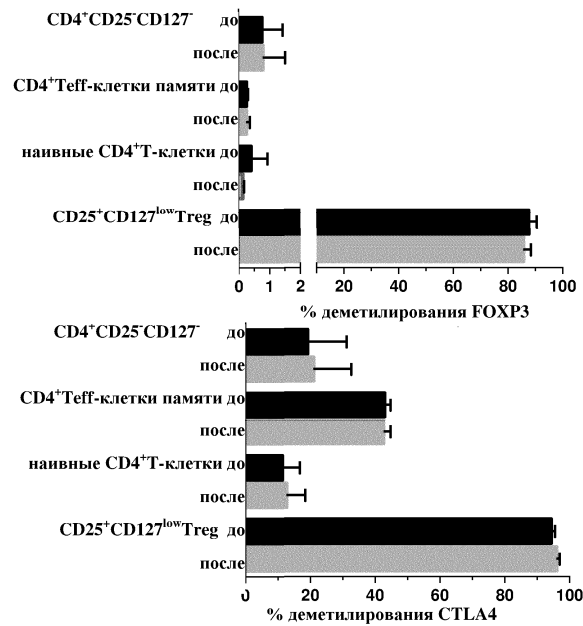
Фиг. 33



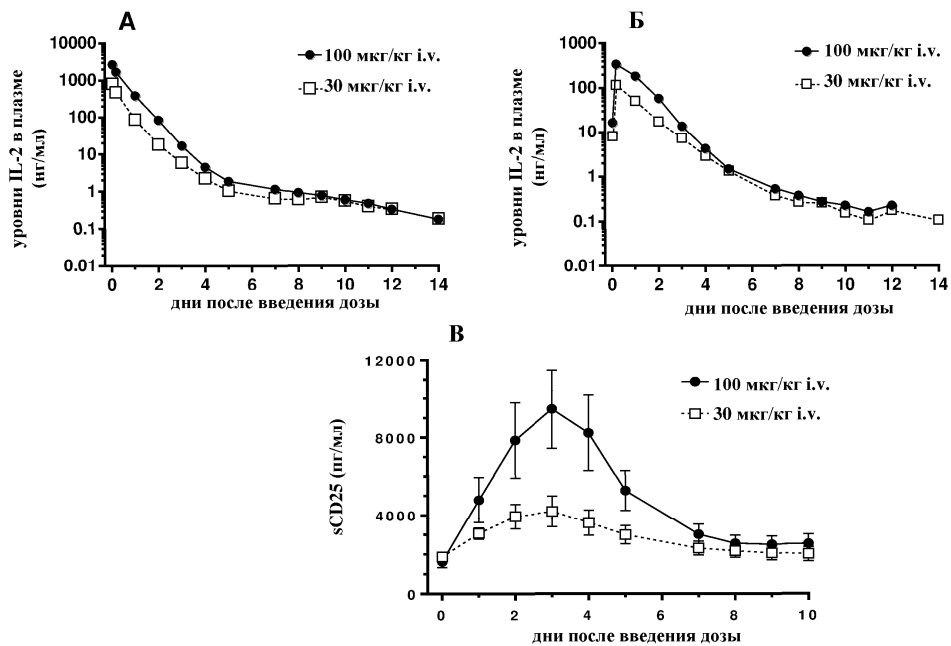
Фиг. 34



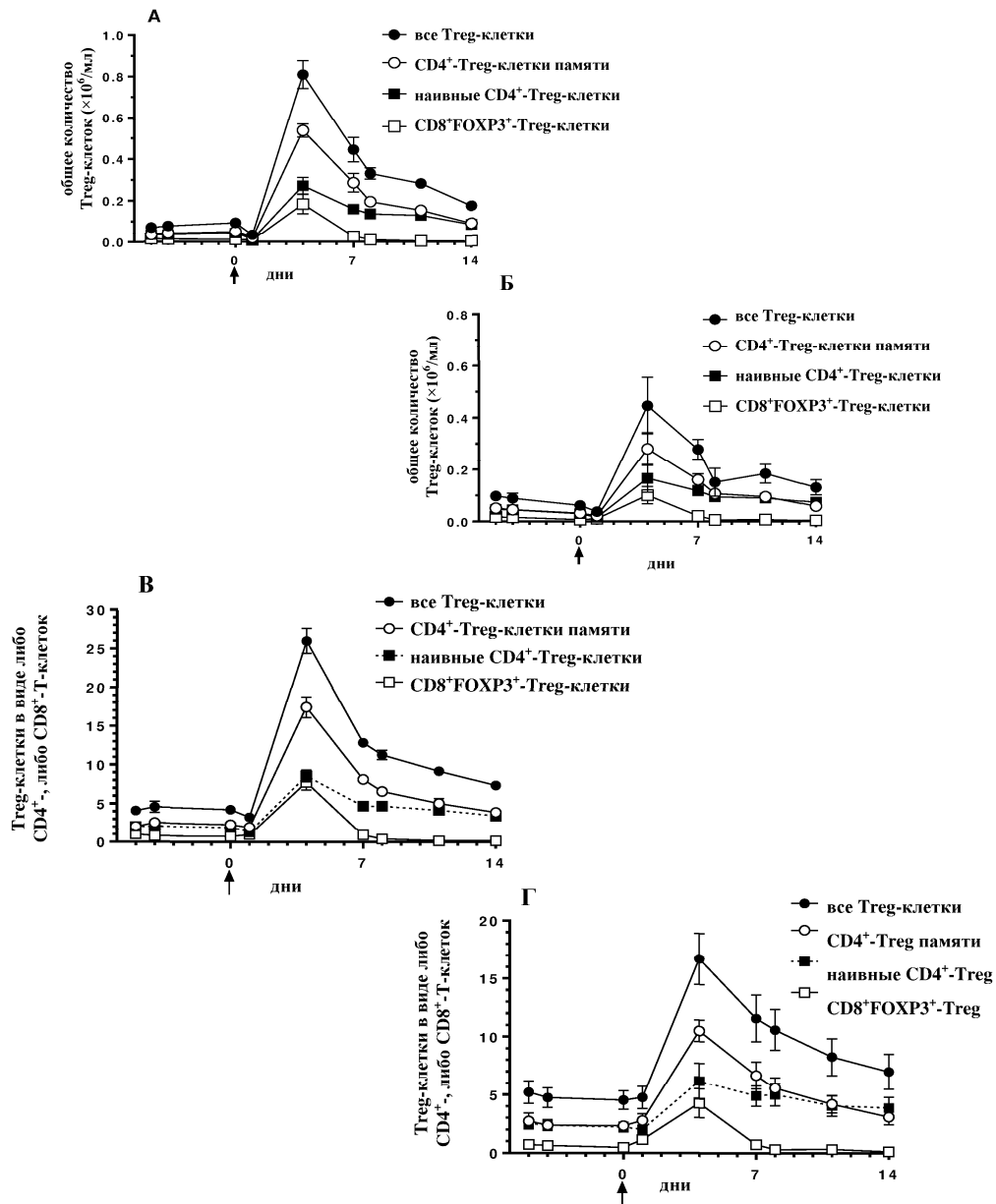
Фиг. 35



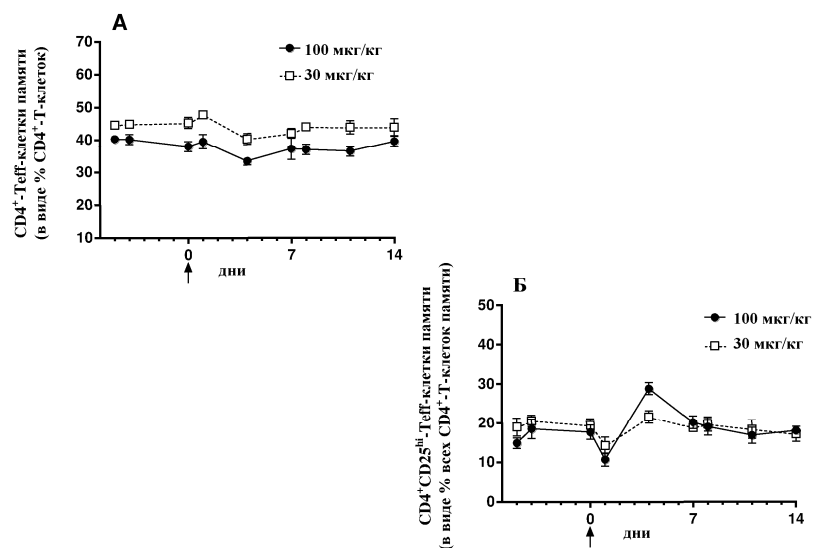
Фиг. 36



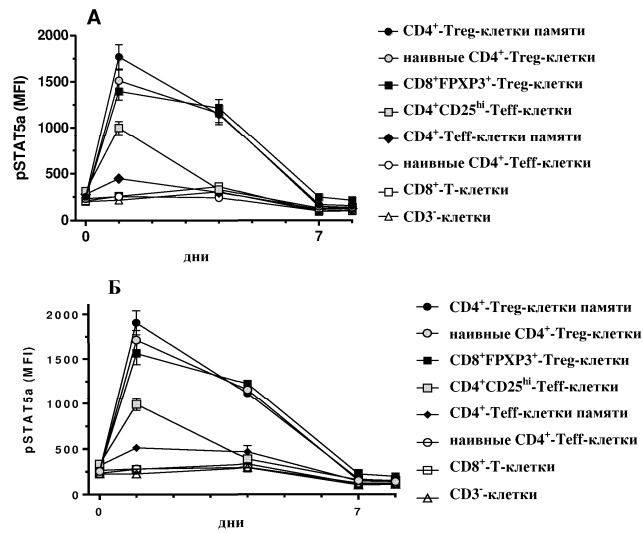
Фиг. 37



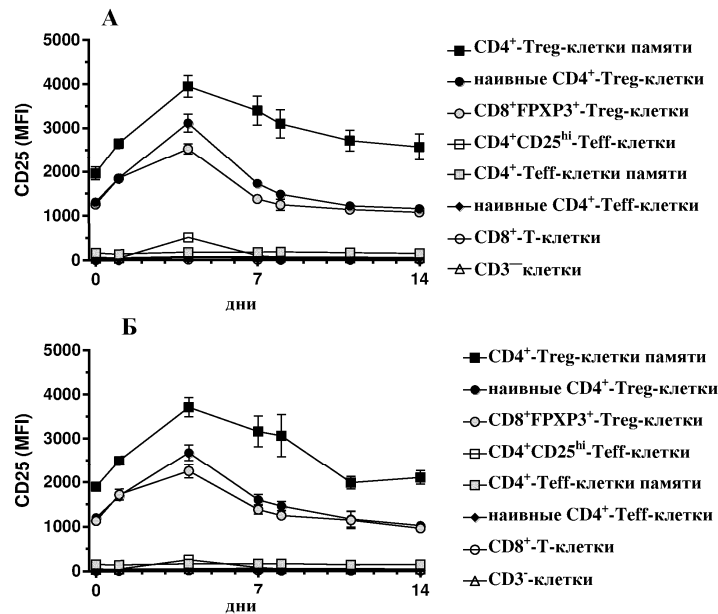
Фиг. 38



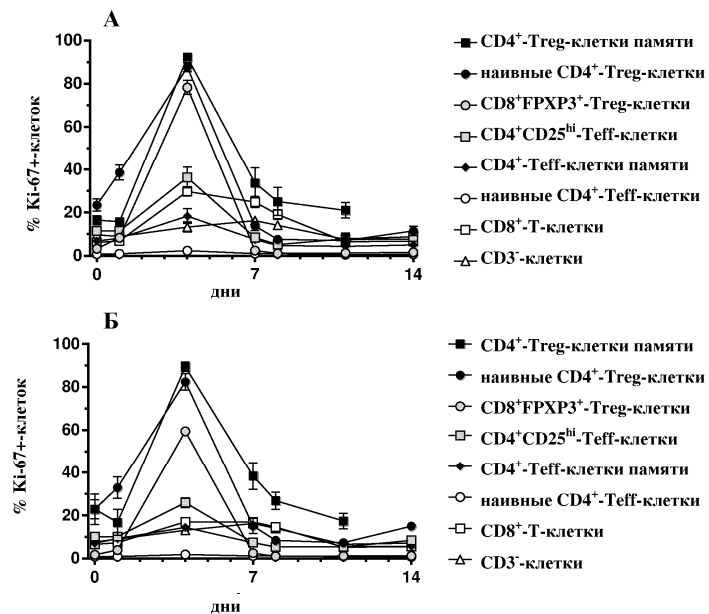
Фиг. 39



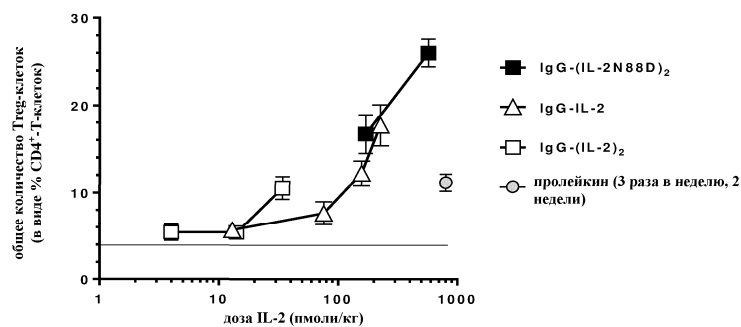
Фиг. 40



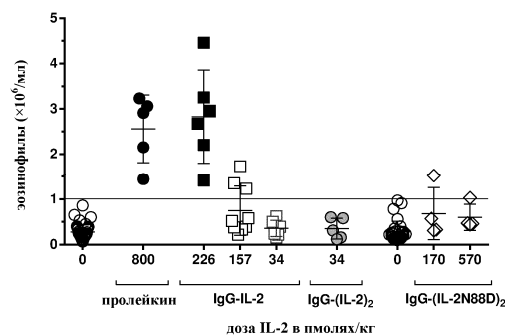
Фиг. 41



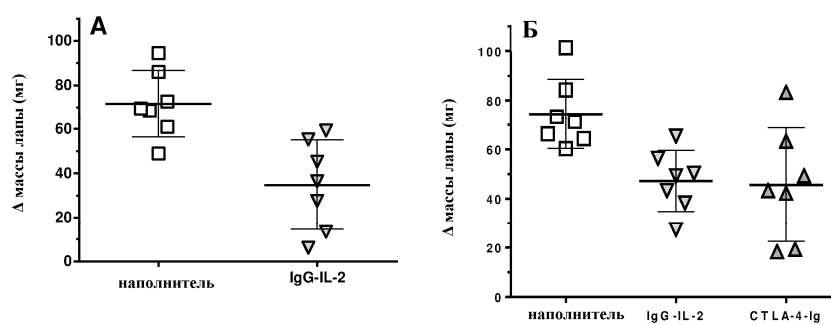
Фиг. 42



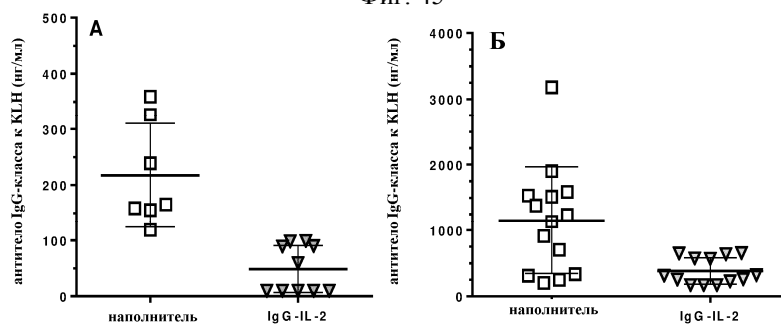
Фиг. 43



Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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