

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992776 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.12(22) Дата подачи заявки
2018.05.22(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА С ПРИВИТЫМ ЦИТОКИНОМ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЯХ

(31) 62/510,514

(32) 2017.05.24

(33) US

(86) PCT/IB2018/053622

(87) WO 2018/215935 2018.11.29

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Диаз-Де-Дурана Яйза, Дидonato
Майкл, Филиппи Кристоф, Меусен
Шелли, Спрэггон Глен (US)

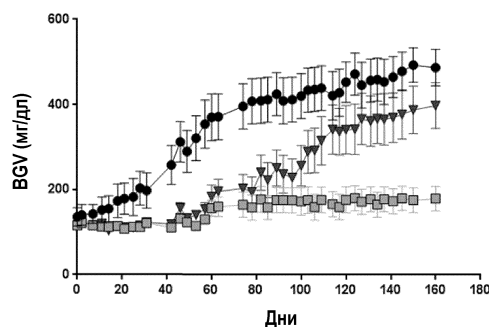
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые связываются с высокоаффинным рецептором интерлейкина и стимулируют внутриклеточную передачу сигнала посредством него. Белки на основе антитела с привитым цитокином находят применение в усилении противовоспалительных клеточных ответов и уменьшении противовоспалительных эффектов при лечении, уменьшении интенсивности проявления и предупреждении иммунных нарушений, таких как диабет 1 типа.

IgG.iL2D49A.H1 предупреждает развитие диабета 1 типа
у мышей NOD

Значения уровня глюкозы в крови в течение времени



● Среды-носитель (PBS) 1х/нед.
■ IgG.iL2D49A.H1 (0.3 нмоль) 1х/нед.
▼ Proleukin (0.3 нмоль) 3х/нед.

A1

201992776

201992776

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–560050EA/081

БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА С ПРИВИТЫМ ЦИТОКИНОМ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЯХ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/510514, поданной 24 мая 2017 года, содержание которой тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение относится к белкам на основе антитела с привитым цитокином, которые связываются с высокоаффинным рецептором интерлейкина–2 (IL2), и способам лечения аутоиммунных и иммунных нарушений.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[003] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 30 марта 2018 г., имеет название PAT056491–WO–PCT_SL.txt и размер 115 255 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[004] IL2 впервые клонировали в 1983 году (Taniguchi et al., Nature 1983, 302:305–310, Devos et al., Nucleic Acid Res. 1983, 11(13):4307–4323, Maeda et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1983, 115:1040–1047). Белок IL2 имеет длину 153 аминокислоты с сигнальным пептидом из аминокислот 1–20 и сворачивается в структуру из 4 антипараллельных амфипатических альфа–спиралей (Smith K. A., Science 1988, 240:1169–1176).

[005] IL2 опосредует свой биологический эффект в результате передачи сигнала посредством высокоаффинного или низкоаффинного рецептора (Kreig et al., PNAS 2010, 107(26):11906–11911). Высокоаффинный рецептор является тримерным, состоящим из IL2–R α (CD25), IL2–R β (CD122) и IL2–R γ (CD132). Низкоаффинный рецептор является димерным, состоящим только из цепей IL2–R β (CD122) и IL2–R γ (CD132). Низкоаффинный рецептор связывает IL2, но с аффинностью, в 10–100 раз меньшей, чем у тримерного высокоаффинного рецептора, что указывает на то, что IL2–R α (CD25) является важным для увеличения аффинности, однако не является компонентом, участвующим в передаче сигнала (Kreig et al., выше). Экспрессия рецепторов IL2 также отличается. Высокоаффинный рецептор IL2 экспрессируется на активированных T–клетках и CD4⁺/Foxp3⁺ регуляторных T–клетках (Treg). В отличие от этого, низкоаффинный рецептор IL2 встречается на CD8⁺ T–клетках памяти, обычных T–клетках (Tcon) и естественных клетках–киллерах (NK).

[006] Рекомбинантный IL2 (rhIL2) был изначально одобрен для клинического применения в 1992 году (Coventry et al., Cancer Mgt Res. 2012 4:215–221). Proleukin® (альдеслейкин) представляет собой модифицированный IL2, который является агликозилированным, не имеет N–концевого аланина и имеет серин, замещенный

цистеином, по положению аминокислоты 125 (C125S). Proleukin® изначально был показан в качестве средства терапии, применяемого при злокачественной меланоме и почечноклеточной карциноме, однако применялся при других типах рака, таких как колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого и мезотелиома (Coventry et al., выше). В исследовании, охватывающем 259 пациентов с почечноклеточной карциномой, проведенном с 1986 по 2006 гг., было обнаружено, что у 23 пациентов наблюдался полный ответ и у 30 наблюдался частичный ответ (Klapper et al., Cancer 2008 113(2):293–301). В целом это составляло суммарную частоту объективного ответа 20%, при этом полная регрессия опухоли наблюдалась у 7% пациентов с почечноклеточным раком (Klapper et al., выше).

[007] Тем не менее, лечение рака с помощью IL2 не обходилось без неблагоприятных эффектов. В исследовании с участием 259 пациентов отмечались капиллярная утечка/транссудация, расширение кровеносных сосудов и олигурия. Также имели место инфекции 3 степени и 4 степени, в обоих случаях вследствие использования катетеров, и общая инфекция, связанная с дисфункцией нейтрофилов (Klapper et al., выше). В литературе о Proleukin® отмечено, что Proleukin® был ассоциирован с обострением аутоиммунных заболеваний и иммунных нарушений, таких как болезнь Крона, склеродермия, тиреоидит, воспалительный артрит, сахарный диабет, окулобульбарная тяжелая миастения, серповидный IgA-гломерулонефрит, холецистит, церебральный васкулит, синдром Стивенса–Джонсона и буллезный пемфигоид.

[008] Обнаружение того, что Treg-клетки конститутивно экспрессировали высокоаффинный рецептор IL2 и в своем выживании и функционировании зависели от IL2, привело к работе, сфокусированной на IL2 как способе моделирования Treg-клеток (D'Cruz et al., Nat. Immuno. 2005, 6:1152–1159). Было показано, что низкие дозы IL2 являются безопасным и эффективным средством лечения пациентов с диабетом I типа (Hartemann et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1:295–305), вызванного вирусом гепатита C васкулита (Saadoun et al., N. Eng. J. Med. 2011, 365:2067–2077) и хронической болезнью "трансплантат против хозяина" (Koreth et al., N. Eng. J. Med. 2011 365:2055–2066). Однако IL2 имеет очень короткий период полужизни в организме, требуя многократного введения. Это иллюстрирует потребность в терапевтических средствах на основе IL2 с избирательностью в отношении стимуляции Treg через высокоаффинный рецептор с пониженной активностью в отношении низкоаффинного рецептора IL2 и улучшенной фармакокинетикой.

ОПИСАНИЕ

[009] В настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, имеющие молекулу IL2, привитую на последовательности CDR антитела, обладающие предпочтительными терапевтическими профилями по сравнению с молекулами, известными и применяемыми в клинической практике. В частности, предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином обеспечивают повышение или поддержание активности Treg без повышения активности CD8+ T-клеток,

T_{con} или NK–клеток. Кроме того, в предусмотренных композициях представлены улучшенные период полужизни, стабильность и возможность производства по сравнению с составами на основе рекомбинантного человеческого IL2, такими как Proleukin®. Предпочтительные свойства этих композиций приводят к предпочтительным терапевтическим композициям по сравнению с теми, которые ранее применялись в клинической практике или описаны в литературе. Например, в некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые предпочтительно связываются и стимулируют передачу сигналов посредством высокоаффинного рецептора IL2 относительно низкоаффинного рецептора IL2. В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые предпочтительно активируют Treg по сравнению с CD8⁺ T–клетками, T_{con} или NK–клетками.

[0010] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области, определяющие комплементарность (CDR), HCDR1, HCDR2, HCDR3; и

(b) переменную область легкой цепи (VL), содержащую LCDR1, LCDR2, LCDR3;

и

(c) молекулу интерлейкина 2 (IL2), привитую на CDR VH или VL.

[0011] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на CDR тяжелой цепи.

[0012] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 привита на область, выбранную из области 1, определяющей комплементарность (HCDR1), области 2, определяющей комплементарность (HCDR2), или области 3, определяющей комплементарность (HCDR3).

[0013] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на HCDR1.

[0014] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на CDR легкой цепи.

[0015] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 привита на область, выбранную из области 1, определяющей комплементарность (LCDR1), области 2, определяющей комплементарность (LCDR2), и области 3, определяющей комплементарность (LCDR3).

[0016] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, содержащую мутацию, которая обеспечивает снижение аффинности молекулы IL2 в отношении низкоаффинного рецептора IL2.

[0017] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию Treg–клеток в большей степени, чем нативный IL2 или Proleukin®.

[0018] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию CD8⁺ эффекторных Т-клеток в меньшей степени, чем нативный IL2 или Proleukin®.

[0019] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется более длительным периодом полужизни, чем нативный IL2 или Proleukin®.

[0020] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:4.

[0021] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:6.

[0022] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий тяжелую цепь антитела класса IgG.

[0023] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где тяжелая цепь антитела класса IgG выбрана из IgG1, IgG2 или IgG4.

[0024] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR антитела снижена благодаря привитой молекуле IL2.

[0025] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR антитела сохраняется в присутствии привитой молекулы IL2.

[0026] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR антитела отличается от специфичности связывания молекулы IL2.

[0027] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания вариабельного домена антитела направлена на антиген, отличный от человеческого.

[0028] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где антиген, отличный от человеческого, представляет собой вирус.

[0029] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где вирус представляет собой респираторно-синцитиальный вирус (RSV).

[0030] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где RSV выбран из RSV подгруппы А и RSV подгруппы В.

[0031] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где часть белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющая собой остов антитела, является гуманизированной или человеческой.

[0032] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 17, (b) а HCDR2 под SEQ ID NO:18, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:30, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:31 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:32;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:43, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:44, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:45; и вариабельную

область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:56, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:57 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:58;

(iii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:69, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:70, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:71; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:82, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:83 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:84; или

(iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:95, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:96, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:97; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:108, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:109 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:110.

[0033] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:20, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 33;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 46, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 59;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:72, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO:85; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:98, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO:111.

[0034] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где антитело содержит модифицированную Fc-область, соответствующую сниженной эффекторной функции.

[0035] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где модифицированная Fc-область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A.

[0036] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где модифицированная Fc-область содержит комбинацию мутаций, выбранных из одной или нескольких из D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A и P329G/L234A/L235A.

[0037] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO: 17, HCDR2 под SEQ ID NO:18, HCDR3 под SEQ ID NO:19, LCDR1 под SEQ ID NO:30, LCDR2 под SEQ ID NO:31, LCDR3 под SEQ ID NO:32, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется большей активацией Treg-клеток по сравнению с Proleukin®.

[0038] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO:43, HCDR2 под SEQ ID NO:44, HCDR3 под SEQ ID NO:45, LCDR1 под SEQ ID NO:56, LCDR2 под SEQ ID NO:57, LCDR3 под SEQ ID NO:58, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется большей активацией Treg-клеток по сравнению с Proleukin®.

[0039] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO:69, HCDR2 под SEQ ID NO:70, HCDR3 под SEQ ID NO:71, LCDR1 под SEQ ID NO:82, LCDR2 под SEQ ID NO:83, LCDR3 под SEQ ID NO:84, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется большей активацией Treg-клеток по сравнению с Proleukin®.

[0040] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO:95, HCDR2 под SEQ ID NO:96, HCDR3 под SEQ ID NO:97, LCDR1 под SEQ ID NO:108, LCDR2 под SEQ ID NO:109, LCDR3 под SEQ ID NO:110, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется большей активацией Treg-клеток по сравнению с Proleukin®.

[0041] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

- (i) тяжелую цепь под SEQ ID NO:23 и легкую цепь под SEQ ID NO:36;
- (ii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:49 и легкую цепь под SEQ ID NO:62;
- (iii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:75 и легкую цепь под SEQ ID NO:88; или
- (iv) тяжелую цепь под SEQ ID NO:101 и легкую цепь под SEQ ID NO:114.

[0042] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены рекомбинантные клетки-хозяева, подходящие для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащие нуклеиновые кислоты, раскрытые в данном документе, кодирующие полипептиды тяжелой и легкой цепей белка и необязательно сигнал секреции.

[0043] Рекомбинантная клетка-хозяин, которая относится к линии клеток млекопитающих.

[0044] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

[0045] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы лечения иммунного нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белков на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе.

[0046] Способ, где указанное иммунное нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (cGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома.

[0047] Способ, где белок на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

[0048] Способ, где терапевтическое средство представляет собой другой белок на основе антитела с привитым цитокином.

[0049] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы обеспечения размножения Treg-клеток в организме пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту белка на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтической композиции.

[0050] Способ, где Treg-клетки размножаются, а CD8 эффекторные T-клетки не размножаются.

[0051] Способ, где Treg-клетки размножаются, а NK-клетки не размножаются.

[0052] Способ, где белок на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

[0053] Способ, где терапевтическое средство представляет собой другой белок на основе антитела с привитым цитокином.

[0054] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином для применения в качестве терапевтического средства.

[0055] Применение, где белок на основе антитела с привитым цитокином содержит: (i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 17, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:18, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:19, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:30, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:31 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:32; и (ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:43, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:44, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:45; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:56, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:57 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:58, в лечении иммунных нарушений.

[0056] Применение, где иммунное нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (cGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома.

[0057] Применение, где белок на основе антитела с привитым цитокином вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

[0058] Варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение белка на основе антитела с привитым цитокином, раскрытого в данном документе, для изготовления лекарственного препарата для лечения иммунного

нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

[0059] Применение, где иммунное нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (сGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома.

[0060] В определенных вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит Fc-область антитела класса IgG. В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулин выбран из Fc-области подкласса IgG1, IgG2 или IgG4. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула необязательно содержит по меньшей мере одну модификацию, которая обеспечивает модулирование (т. е. увеличение или уменьшение) связывания антитела или фрагмента антитела с Fc-рецептором. Тяжелая цепь иммуноглобулина может необязательно содержать модификацию, придающую модифицированную эффекторную функцию. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина может содержать мутацию, придающую сниженную эффекторную функцию, выбранную из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[0061] Белок на основе антитела с привитым цитокином также содержит вариации в части молекулы, представляющей собой IL2. Вариации могут представлять собой единичные изменения аминокислот, единичные делеции аминокислот, множественные изменения аминокислот и множественные делеции аминокислот. Такие изменения в части молекулы, представляющей собой цитокин IL2, могут обеспечивать уменьшение аффинности белка с привитым цитокином к низкоаффинному рецептору IL2.

[0062] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере белковую тяжелую цепь и/или легкую цепь белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В другом связанном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены клетки-хозяева, которые являются подходящими для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид легкой цепи и/или тяжелой цепи белка на основе антитела с привитым цитокином. В еще одном аспекте предусмотрены способы продуцирования белков на основе антитела с привитым цитокином, включающие культивирование предусмотренных клеток-хозяев, описанных в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии, образования и секреции белка на основе антитела с привитым цитокином, и извлечение белка на основе антитела с привитым цитокином из культуры. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе.

[0063] В другом связанном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, для введения индивидууму.

[0064] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения иммунного нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен белок на основе антитела с привитым цитокином для применения в лечении или профилактике иммунного нарушения у индивидуума.

[0065] В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется иммунное нарушение, например, диабет 1 типа, системная красная волчанка, витилиго, хроническая болезнь "трансплантат против хозяина" (сGvHD), профилактика острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированный васкулит, очаговая алопеция, системная склеродермия, очаговая склеродермия и первичный антифосфолипидный синдром. По некоторым показаниям белок на основе антитела с привитым цитокином вводят совместно со стероидом (например, метилпреднизолоном, гидрокортизоном, преднизолоном, преднизолоном, будесонидом, дексаметазоном).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0066] "Антитело" относится к молекуле из семейства иммуноглобулинов, содержащей тетрамерную структурную единицу. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" цепь (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50–70 кДа), соединенные с помощью дисульфидной связи. Общеизвестные гены иммуноглобулинов включают в себя гены константных областей κ , λ , α , γ , δ , ϵ и μ , а также огромное количество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют как κ либо λ . Тяжелые цепи классифицируют как γ , μ , α , δ или ϵ , которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2).

[0067] Как легкая, так и тяжелая цепи подразделяются на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "переменный" используются в структурном смысле и функциональном смысле. N-конец каждой цепи определяет переменную (V) область или домен из приблизительно 100–110 или больше аминокислот, несущих основную ответственность за распознавание антигенов. Термины "переменная область легкой цепи" (V_L) и "переменная область тяжелой цепи" (V_H)

соответственно относятся к этим областям легких и тяжелых цепей. При спаривании V_H и V_L друг с другом образуется один антигенсвязывающий участок. Помимо V -областей, как тяжелые цепи, так и легкие цепи содержат константную (C) область или домен. Секретируемая форма C-области иммуноглобулина состоит из трех C-доменов CH1, CH2, CH3, необязательно CH4 (C μ) и шарнирной области. Мембраносвязанная форма C-области иммуноглобулина также имеет мембранные и внутриклеточные домены. Каждая легкая цепь имеет V_L на N-конце, за которой расположен константный домен (C) на ее другом конце. Константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, перемещение через плаценту, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т. п. Принято, что номера доменов константной области увеличиваются по мере их удаления от антигенсвязывающего участка или аминоконца антитела. N-конец представляет собой переменную область, а на C-конце находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксиконцевые домены тяжелой и легкой цепи соответственно. V_L выровнен с V_H , а CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает традиционные структуры антител и вариации антител. Таким образом, в объем данной идеи включены белки на основе антитела с привитым цитокином, полноразмерные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела и фрагменты таких антител.

[0068] Антитела существуют в виде интактных цепей иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо изученных фрагментов антител, образующихся в результате расщепления различными пептидазами. Термин "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одной или нескольким частям антитела, в которых сохранены шесть CDR. Таким образом, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием $F(ab)'_2$, димера Fab' , который как таковой представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H - C_H1 с помощью дисульфидной связи. $F(ab)'_2$ может быть восстановлен в мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирной области, в результате чего происходит превращение димера $F(ab)'_2$ в мономер Fab' . Мономер Fab' по сути представляет собой Fab с частью шарнирной области (Paul et al., *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993)). Хотя различные фрагменты антител определены с точки зрения расщепления интактного антитела, специалисту в данной области будет понятно, что такие фрагменты можно синтезировать *de novo* химическим путем либо с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Как используется в данном документе, "фрагмент антитела" относится к одной или нескольким частям антитела, полученным посредством модификации целых антител либо синтезированным *de novo* с помощью технологий рекомбинантных ДНК, которые сохраняют специфичность связывания и функциональную активность. Примеры фрагментов антител включают Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела (ScFv), Fab , Fab' , Fd (V_H - и $CH1$ -домены), dAb (V_H и выделенная CDR); а также мультимерные варианты этих фрагментов (например, $F(ab)'_2$) с той же самой специфичностью связывания. Белки

на основе антитела с привитым цитокином также могут содержать фрагменты антител, необходимые для достижения необходимой специфичности связывания и активности.

[0069] "Fab"-домен, как используется в данном контексте, содержит переменный домен тяжелой цепи, CH1-домен константной области, переменный домен легкой цепи и CL-домен константной области легкой цепи. Взаимодействие доменов стабилизируется с помощью дисульфидной связи между CH1- и CL-доменами. В некоторых вариантах осуществления домены тяжелой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке VH-CH, и домены легкой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке VL-CL. В некоторых вариантах осуществления домены тяжелой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке CH-VH, и домены легкой цепи в Fab расположены в порядке CL-VL. Несмотря на то, что Fab-фрагмент исторически идентифицировали при помощи расщепления интактного иммуноглобулина папаином, обычно "Fab" получают рекомбинантным путем с помощью любого способа. Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в отношении связывания антигена, т. е. он имеет один антигенсвязывающий участок.

[0070] "Домены, определяющие комплементарность" или "области, определяющие комплементарность" ("CDR") взаимозаменяемо относятся к гиперпеременным областям V_L и V_H . CDR представляют собой участок связывания цепей антитела с белком-мишенью, который обладает специфичностью в отношении такого белка-мишени. В каждой человеческой V_L или V_H имеется по три CDR (CDR1-3, пронумерованные последовательно от N-конца), составляющие приблизительно 15-20% от переменных доменов. CDR являются структурно комплементарными эпитопу белка-мишени и, таким образом, непосредственно отвечают за специфичность связывания. Остальные отрезки в V_L или V_H , так называемые каркасные области (FR), характеризуются меньшей изменчивостью аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0071] Положения CDR и каркасных областей можно определить с помощью различных определений, хорошо известных из уровня техники, например, согласно Kabat, Chothia и AbM (см., например, Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих активных центров также описаны в следующих источниках: Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000) и Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); (нумерация ImMunoGenTics (IMGT)) Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996) и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991) и Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0072] Согласно Kabat аминокислотные остатки CDR в V_H нумеруются 31–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в V_L нумеруются 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в V_H нумеруются 26–32 (HCDR1), 52–56 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в V_L нумеруются 26–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2) и 91–96 (LCDR3). При объединении определений CDR согласно Kabat и Chothia CDR состоят из аминокислотных остатков 26–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3) в человеческой V_H и аминокислотных остатков 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3) в человеческой V_L .

[0073] "Вариабельная область легкой цепи антитела" или "вариабельная область тяжелой цепи антитела", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему соответственно V_L или V_H . Эндогенная V_L кодируется генными сегментами V (вариабельным) и J (соединительным), а эндогенная V_H кодируется V, D (дополнительным) и J. Каждая из V_L или V_H содержит CDR, а также каркасные области (FR). Термин "вариабельная область" или "V-область" взаимозаменяемо относится к тяжелой или легкой цепи, содержащей FR1–CDR1–FR2–CDR2–FR3–CDR3–FR4. V-область может быть встречающейся в природе, рекомбинантной или синтетической. В настоящей заявке легкие цепи антител и/или тяжелые цепи антител могут совместно называться "цепями антител". Предусмотренная и дополнительно описанная в данном документе "вариабельная область легкой цепи антитела", или "вариабельная область тяжелой цепи антитела", и/или "вариабельная область", и/или "цепь антитела" необязательно содержит полипептидную последовательность цитокина, включенную в CDR.

[0074] C-концевая область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая, например, CH2- и CH3-домены, в данном документе представляет собой "Fc"-домен. "Fc-область", как используется в данном документе, относится к константной области антитела без учета первого домена константной области иммуноглобулина (CH1). Fc относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM и гибкой шарнирной области в N-концевом направлении от этих доменов. В случае IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. В случае IgG Fc содержит C γ 2- и C γ 3-домены иммуноглобулина и шарнирную область между C γ 1 и C γ . В данной области техники следует понимать, что границы Fc-области могут варьироваться, однако, как обычно определяется, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG содержит остатки C226 или P230 на своем карбоксильном конце при применении нумерации согласно EU-индексу, как изложено в Kabat et al. (1991, NIH Publication 91–3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). "Fc-область" может относиться к данной области в выделенном состоянии или данной области в качестве составной части антитела или фрагмента антитела. "Fc-область" включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты Fc-области, например, по CH2- и CH3-области, в том числе, например, имеющие

модификации, которые обеспечивают модулирование эффекторной функции. Fc-области также включают в себя варианты, которые не приводят к изменениям биологической функции. Например, одна или несколько аминокислот удалены с N-конца или C-конца Fc-области иммуноглобулина без существенной потери биологической функции. Например, в определенных вариантах осуществления C-концевой лизин модифицирован, заменен или удален. В конкретных вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc-области изменены или удалены. В определенных вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc (например, концевой лизин) удалены. В определенных других вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc заменены альтернативной аминокислотой (например, концевой лизин заменен). Такие варианты отбирают в соответствии с общими правилами, известными из уровня техники, чтобы оказываемый эффект в отношении активности был минимальным (см., например, Bowie, et al., *Science* 247:306–1310, 1990). Fc-домен представляет собой часть иммуноглобулина (Ig), которая распознается клеточными рецепторами, такими как FcR, и с которой связывается комплемент-активирующий белок C1q. Нижняя шарнирная область, которая кодируется в 5'-части экзона CH2, обеспечивает гибкость антитела для связывания с FcR-рецепторами.

[0075] "Химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой (a) константная область или ее часть изменена, заменена или замещена таким образом, что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) связан с константной областью, относящейся к другому или измененному классу, имеющей другую или измененную эффекторную функцию и/или полученной из другого или измененного вида, или с совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства химерному антителу, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством и т. д.; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, заменена или замещена на вариабельную область, обладающую другой или измененной антигенной специфичностью.

[0076] "Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность (например, специфичность связывания, активность) антитела, отличного от человеческого, но при этом является менее иммуногенным у людей. Этого можно достичь, например, путем сохранения отличных от человеческих CDR-областей и замены оставшихся частей антитела человеческими аналогами. См., например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851–6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65–92 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534–1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489–498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169–217 (1994).

[0077] "Человеческое антитело" включает в себя антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, человеческих последовательностей зародышевого типа,

или мутантных вариантов человеческих последовательностей зародышевого типа, или антитела, содержащего консенсусные последовательности каркасных областей, полученные в результате анализа последовательностей человеческих каркасных областей, например, как описано в Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57–86, 2000). Человеческие антитела могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются человеческими последовательностями (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматических мутаций *in vivo*, или консервативную замену, которая способствует стабильности или производству).

[0078] Термин "соответствующая последовательность зародышевого типа человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность человеческой варибельной области, которая обладает наиболее высокой установленной идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью варибельной области в сравнении со всеми другими известными аминокислотными последовательностями варибельной области, кодируемыми последовательностями варибельной области иммуноглобулина зародышевого типа человека. Соответствующая последовательность зародышевого типа человека также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности человеческой варибельной области, характеризующейся наиболее высокой идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью варибельной области в сравнении со всеми другими оцененными аминокислотными последовательностями варибельной области. Соответствующей последовательностью зародышевого типа человека могут быть только каркасные области, только области, определяющие комплементарность, каркасные области и области, определяющие комплементарность, варибельный сегмент (определенный выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат варибельную область. Идентичность последовательности может быть определена с применением способов, описанных в данном документе, например, выравнивания двух последовательностей с применением BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного из уровня техники. Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность зародышевого типа человека может характеризоваться по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью варибельной области.

[0079] Термин "валентность", используемый в данном документе, относится к количеству потенциальных участков связывания мишени в полипептиде. Каждый участок связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или специфический

участок в молекуле–мишени. Если полипептид содержит более одного участка связывания мишени, то каждый участок связывания мишени может специфично связывать одну и ту же или различные молекулы (например, может связываться с различными молекулами, например, различными антигенами, или различными эпитопами в одной и той же молекуле). Традиционное антитело, например, имеет два связывающих участка и является бивалентным; "тривалентный" и "тетравалентный" относится к присутствию, соответственно, трех связывающих участков и четырех связывающих участков в молекуле антитела. Белки на основе антитела с привитым цитокином могут быть моновалентными (т. е. связывать одну молекулу–мишень), бивалентными или поливалентными (т. е. связывать более одной молекулы–мишени).

[0080] Фраза "специфично связывает" или "специфичность связывания", если она используется в контексте описания взаимодействия между мишенью (например, белком) и белком на основе антитела с привитым цитокином, относится к реакции связывания, которая является определяющей для установления присутствия мишени в неоднородной популяции белков и других биологических веществ, например, в биологическом образце, например, образце крови, сыворотки крови, плазмы крови или ткани. Таким образом, при определенных установленных условиях белок на основе антитела с привитым цитокином с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретной мишенью на уровне, в по меньшей мере два раза превышающем фоновый уровень, и по существу не связывается в значительном количестве с другими мишенями, присутствующими в образце. В одном варианте осуществления при установленных условиях белок на основе антитела с привитым цитокином с определенной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном на уровне, в по меньшей мере десять (10) раз превышающем фоновый уровень, и по существу не связывается в значительном количестве с другими мишенями, присутствующими в образце. Для специфического связывания с белком на основе антитела с привитым цитокином в таких условиях может потребоваться, чтобы белок на основе антитела с привитым цитокином был отобран по его специфичности в отношении конкретного белка–мишени. Как используется в данном документе, специфическое связывание предусматривает белки на основе антитела с привитым цитокином, которые избирательно связываются с высокоаффинным рецептором IL2 человека, и не предусматривает белки на основе антитела с привитым цитокином, которые перекрестно реагируют, например, с другими членами суперсемейства рецепторов цитокинов. В некоторых вариантах осуществления отбирают такие белки на основе антитела с привитым цитокином, которые избирательно связываются с высокоаффинным рецептором IL2 человека и перекрестно реагируют с IL2R, отличным от человеческого (например, с IL2R яванского макака). В некоторых вариантах осуществления отбирают такие привитые белки на основе антител, которые избирательно связываются с высокоаффинным рецептором IL2 человека и реагируют с дополнительным антигеном–мишенью. Ряд форматов можно применять для отбора белков на основе антитела с привитым цитокином, которые характеризуются специфической

реактивностью в отношении конкретного белка антигена–мишени. Например, твердофазные иммунологические анализы ELISA традиционно применяются для отбора антител, характеризующихся специфической реактивностью в отношении белка (см., например, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998), где описаны форматы и условия иммунологического анализа, которые можно применять для определения специфической иммунной реактивности). Реакция специфического или избирательного связывания в типичном случае будет давать сигнал, в по меньшей мере два раза превышающий фоновый сигнал, и в более типичном случае в по меньшей мере 10–100 раз превышающий фоновый сигнал.

[0081] Термин "равновесная константа диссоциации (K_D , M)" относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹, M⁻¹). Равновесные константы диссоциации могут быть измерены с применением любого способа, известного из уровня техники. Как правило, белки на основе антитела с привитым цитокином будут характеризоваться равновесной константой диссоциации, составляющей менее чем приблизительно 10^{-7} или 10^{-8} M, например, менее чем приблизительно 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых вариантах осуществления менее чем приблизительно 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

[0082] Используемый в данном документе термин "эпитоп" или "связывающая область" относится к домену в белковом антигене, который отвечает за специфическое связывание между CDR антитела и белковым антигеном.

[0083] Используемый в данном документе термин "рецепторсвязывающая область цитокина" относится к домену в части белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющей собой привитый цитокин, который отвечает за специфическое связывание между привитым цитокином и его рецептором (например, высокоаффинным рецептором IL2). Существует по меньшей мере одна такая рецепторсвязывающая область цитокина, присутствующая в каждом белке на основе антитела с привитым цитокином, и каждая из связывающих областей может быть идентичной другим или отличаться от других.

[0084] Термин "агонист" взаимозаменяемо относится к антителу, способному активировать рецептор с индукцией полного или частичного рецептор–опосредованного ответа. Например, агонист высокоаффинного рецептора IL2 связывается с высокоаффинным рецептором IL2 и индуцирует IL2–опосредованную внутриклеточную передачу сигнала, активацию клеток и/или пролиферацию Treg–клеток. Агонист, представляющий собой белок на основе антитела с привитым цитокином, стимулирует передачу сигнала посредством высокоаффинного рецептора IL2 в некоторых отношениях аналогично нативному лиганду IL2. Связывание IL2 с высокоаффинным рецептором IL2 индуцирует активацию Jak1 и Jak2, что приводит к фосфорилированию STAT5. В некоторых вариантах осуществления агонист, представляющий собой белок на основе антитела с привитым цитокином, может быть идентифицирован по его способности связываться с высокоаффинным рецептором IL2 и индуцировать фосфорилирование

STAT5 и/или пролиферацию Treg-клеток.

[0085] Термины "IL2", или "IL-2", или "интерлейкин 2", или "интерлейкин-2" взаимозаменяемо относятся к члену семейства альфа-спиральных цитокинов, где нативный белок выполняет функции регуляции и поддержания воспалительных процессов. Особенностью IL2 является то, что N- и C-концы расположены вблизи друг от друга в пространстве, что делает белок цитокин IL2 подходящим для прививания на антитело. IL2, содержащий остатки 21–153 полноразмерного нативного человеческого белка, используется в качестве составной части агонистов, представляющих собой белки на основе антитела с привитым цитокином. Человеческий IL2, раскрытый в данном документе, характеризуется по всей своей длине по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:2 и сохраняет предпочтительную агонистическую активность белков на основе антитела с привитым цитокином, описанных в данном документе, и он был опубликован под номером доступа в GenBank NP_000577. SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность cDNA человеческого IL2. Нуклеиновая кислота человеческого IL2, кодирующая белок IL2, раскрытый в данном документе, характеризуется по всей своей длине по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:1, и она была опубликована под номером доступа в GenBank NM_000586.

[0086] Термин "белок на основе антитела с привитым цитокином", или "антитело с привитым цитокином", или "привитый" означает, что по меньшей мере один цитокин включен непосредственно в CDR антитела, прерывая последовательность CDR. Цитокин может быть включен в HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3. Цитокин может быть включен в HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3 и включен около N-концевой последовательности CDR или около C-концевой последовательности CDR. Цитокин, включенный в CDR, может уменьшать специфическое связывание части антитела с исходным белком-мишенью, или белок на основе антитела с привитым цитокином может сохранять свое специфическое связывание со своим белком-мишенью. Иллюстративные цитокины включают в себя без ограничения IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α , и TNF- β . Также можно привить цитокин на конкретную CDR одного "плеча" антитела и привить другой, отличный цитокин на CDR другого "плеча" антитела. Например, прививание IL2 на HCDR1 одного "плеча" антитела и прививание IL-7 на LCDR1 другого "плеча" белка на основе антитела с привитым цитокином может обеспечивать создание бифункционального белка на основе антитела с привитым цитокином.

[0087] Термин "выделенный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок по сути не содержат других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Они предпочтительно

находятся в однородном состоянии. Они могут находиться как в сухом состоянии, так и в водном растворе. Чистоту и однородность в типичном случае определяют с помощью методик аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом молекул, присутствующих в препарате, является по существу очищенным. В частности, выделенный ген отделен от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от кодируемого геном, представляющим интерес. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по сути одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это означает, что нуклеиновая кислота или белок являются на по меньшей мере 85% чистыми, более предпочтительно на по меньшей мере 95% чистыми и наиболее предпочтительно на по меньшей мере 99% чистыми.

[0088] Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одонитевой или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными со свойствами эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются посредством механизма, сходного с механизмом для встречающихся в природе нуклеотидов. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами можно осуществлять за счет получения последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605–2608 (1985); and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91–98 (1994)).

[0089] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и полимеру из не встречающихся в природе аминокислот.

[0090] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, закодированные в генетическом коде, а также такие аминокислоты,

которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые характеризуются такой же основной химической структурой, что и встречающаяся в природе аминокислота, т. е. имеют α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, к гомосерину, норлейцину, метионинсульфоксиду, метионинметилсульфонию. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте.

[0091] "Консервативно модифицированные варианты" распространяются как на аминокислотные последовательности, так и на последовательности нуклеиновой кислоты. Применительно к конкретным последовательностям нуклеиновой кислоты, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или фактически идентичные аминокислотные последовательности, или же, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, они относятся к по сути идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода любой данный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном задан аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариациями", которые представляют собой одну разновидность вариаций с консервативными модификациями. В данном документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области будет осознавать, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, неявно определен в каждой описанной последовательности.

[0092] Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, при которых происходит изменение, добавление или удаление одной аминокислоты или небольшой процентной доли аминокислот в кодируемой последовательности, относятся к "варианту с консервативной модификацией", если изменение приводит к замене аминокислоты на

химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны из уровня техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют, а не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

[0093] "Процентное значение идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом для оптимального выравнивания этих двух последовательностей часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидной), которая не содержит добавлений или делеций. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречается идентичное основание нуклеиновой кислоты или остаток аминокислоты, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

[0094] Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е. характеризуются по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей в определенной области или, если не указано, во всей последовательности эталонной последовательности) при сравнении и выравнивании для достижения максимального соответствия в окне сравнения или в установленной области при измерении с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра. В настоящем изобретении предусмотрены полипептиды или полинуклеотиды, которые являются по существу идентичными соответственно полипептидам или полинуклеотидам, приведенным в качестве примера в данном документе (например, переменным областям, приведенным в качестве примера под любой из SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:98, или SEQ ID NO:111. Идентичность имеет место в области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 15, 25 или 50 нуклеотидов, или более предпочтительно в области, имеющей длину 100–500 или 1000 или больше нуклеотидов,

или по всей длине эталонной последовательности. Что касается аминокислотных последовательностей, идентичность или существенная идентичность может иметь место в области, имеющей длину по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот, необязательно имеющей длину по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот, необязательно имеющей длину по меньшей мере приблизительно 150, 200 или 250 аминокислот, или по всей длине эталонной последовательности. Что касается более коротких аминокислотных последовательностей, например, аминокислотных последовательностей из 20 или меньшего количества аминокислот, существенная идентичность имеет место, если один или два аминокислотных остатка являются консервативно замененными в соответствии с консервативными заменами, определенными в данном документе.

[0095] При сравнении последовательностей обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости устанавливают координаты подпоследовательностей и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательностей. Могут применяться программные параметры по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает значения процентной идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью, исходя из программных параметров.

[0096] "Окно сравнения", как используется в данном документе, включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранного из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности были подвергнуты оптимальному выравниванию. Способы выравнивания последовательностей для целей сравнения хорошо известны из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для целей сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита–Уотермана (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана–Вунша (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с помощью способа поиска сходства Пирсона–Липмана (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в составе пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[0097] Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой

алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389–3402, и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403–410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным от Национального центра биотехнологической информации. На первом этапе данный алгоритм предусматривает идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) за счет идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому баллу T с положительным значением при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T известен под названием пороговый балл соседних слов (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве "затравок" для начала поисков, предназначенных для нахождения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения слов продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться суммарный балл выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей суммарные баллы рассчитывают с применением параметров M (вознаграждающий балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного балла применяют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда суммарный балл выравнивания уменьшается на величину X относительно своего максимального достигнутого значения; суммарный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию применяется длина слова (W), составляющая 11, ожидание (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию применяется длина слова, составляющая 3, и ожидание (E), составляющее 10, и матрица замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), выравнивания (B), составляющие 50, ожидание (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих нитей.

[0098] Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873–5787). Одной мерой сходства, предусмотренной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями возникло случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем приблизительно 0,2, более предпочтительно менее чем

приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

[0099] Показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами, выработка которых индуцирована полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются практически идентичными, является то, что две молекулы или их комплементарные цепи гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются практически идентичными, является то, что для амплификации последовательности могут применяться одни и те же праймеры.

[00100] Термин "связь" при использовании в контексте описания того, как связывающие области соединены в белке на основе антитела с привитым цитокином, включает в себя все возможные средства для физического связывания данных областей. Большое количество связывающих областей часто связаны с помощью химических связей, таких как ковалентная связь (например, пептидная связь или дисульфидная связь) или нековалентная связь, которая может представлять собой прямую связь (т. е. без линкера между двумя связывающими областями) либо непрямую связь (т. е. с помощью по меньшей мере одной линкерной молекулы между двумя или более связывающими областями).

[00101] Выражение "иммунное нарушение" или "иммунное заболевание" относится к дисфункции иммунной системы, при которой собственная иммунная система организма атакует здоровые ткани. Дисфункция может быть в компонентах иммунных клеток и включает в себя как иммунную систему как с чрезмерной активностью, так и с недостаточной активностью.

[00102] Термины "субъект", "пациент" и "индивидуум" взаимозаменяемо относятся к млекопитающему, например, к человеку или отличному от человека млекопитающему – примату. Млекопитающее также может являться лабораторным млекопитающим, например, мышью, крысой, кроликом, хомяком. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее может являться сельскохозяйственным млекопитающим (например, лошадью, овцой, быком, свиньей, верблюдом) или домашним млекопитающим (например, собакой, кошкой).

[00103] Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" какого-либо заболевания или нарушения в одном варианте осуществления относятся к уменьшению интенсивности проявлений заболевания или нарушения (т. е. замедлению, или остановке, или ослаблению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к облегчению

или уменьшению интенсивности проявлений по меньшей мере одного физического параметра, в том числе таких, которые могут быть неявными для пациента. В еще одном варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" означает модулирование заболевания или нарушения физическим путем (например, стабилизацию осязаемого симптома) либо физиологическим путем (например, стабилизацию физического параметра) или и то и другое. В еще одном варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относится к предупреждению или задержке появления, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения.

[00104] Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяемо относится к количеству, достаточному для достижения желаемого результата (т. е. снижения интенсивности воспаления, подавления боли, предупреждения воспаления, подавления или предупреждения воспалительной реакции). В некоторых вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательные побочные эффекты. Терапевтически приемлемое количество можно определять, вводя вначале низкую дозу, а затем постепенно увеличивать данную дозу до тех пор, пока не будет достигнут требуемый эффект. "Профилактически эффективная доза" и "терапевтически эффективная доза" белка на основе антитела с привитым цитокином IL2 может, соответственно, обеспечивать предупреждение появления или приводить к уменьшению тяжести симптомов заболевания, в том числе симптомов, ассоциированных с иммунными нарушениями.

[00105] Термин "совместное введение" относится к одновременному присутствию двух (или более) активных средств в организме индивидуума. Активные средства, которые вводятся совместно, могут доставляться одновременно или последовательно.

[00106] Используемая в данном документе фраза "состоящий по сути из" относится к родам или видам активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также к любым неактивным носителям или вспомогательным веществам для предполагаемой цели применения способов или композиций. В некоторых вариантах осуществления фраза "состоящий по сути из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от белка на основе антитела с привитым цитокином IL2. В некоторых вариантах осуществления фраза "состоящий по сути из" однозначно исключает включение большего количества дополнительных активных средств, отличных от белка на основе антитела с привитым цитокином IL2 и второго средства, вводимого совместно.

[00107] Формы существительного единственного числа включают формы множественного числа, если контекст четко не указывает на иное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00108] Фигура 1 представляет собой таблицу конструкций антител с привитым цитокином, в которой показано, что IgG.IL2D49A.H1 преимущественно обеспечивает размножение Treg по сравнению с рекомбинантным IL2 (Proleukin®).

[00109] Фигура 2 представляет собой таблицу, в которой сравниваются белки на

основе антитела с привитым цитокином с рекомбинантным IL2 (Proleukin®). Следует отметить, что молекула IgG.IL2D49A.H1 стимулирует рецептор IL2 на Treg-клетках, но не на эффекторных T-клетках (Teff) или NK-клетках, что измерено по фосфорилированию STAT5. Эта молекула также имеет более длительный период полужизни, чем Proleukin®, и вызывает более выраженное размножение Treg-клеток *in vivo*.

[00110] Фигура 3 представляет собой таблицу кратности изменений в панели различных типов иммуномодулирующих клеток при сравнении эквимоллярных доз белков на основе антитела с привитым цитокином и Proleukin®.

[00111] На фигуре 4 показаны экспериментальные данные по дифференциальной активации низкоаффинного или высокоаффинного рецептора IL2 белком на основе антитела с привитым цитокином по сравнению с Proleukin®, измеренной по фосфорилированию STAT5. Следует отметить, что IgG.IL2D49A.H1 стимулирует высокоаффинные рецепторы IL2, экспрессируемые на Treg-клетках, но не на CD4+ или CD8+ Tcon-клетках.

[00112] На фигуре 5 показаны экспериментальные данные относительно того, что Treg, размноженные с применением белков на основе антитела с привитым цитокином (например, IgG.IL2D49A.H1), являются лучшими супрессорами эффекторных T-клеток (Teff) (см. верхнюю панель). На нижней панели показаны экспериментальные данные относительно того, что Treg-клетки, размноженные с применением белков на основе антитела с привитым цитокином, стабильны при экспрессии белка Foxp3 и метилировании Foxp3.

[00113] На фигуре 6 показаны экспериментальные данные относительно того, что белки на основе антитела с привитым цитокином практически не влияют на NK-клетки, которые экспрессируют низкоаффинный рецептор IL2. Напротив, Proleukin® стимулирует NK-клетки, как измерено по активации pSTAT5.

[00114] На фигуре 7 показаны экспериментальные данные по фармакокинетическому (PK), фармакодинамическому (PD) профилю и профилю токсичности белка на основе антитела с привитым цитокином по сравнению с Proleukin® у яванских макаков. Например, IgG.IL2D49A.H1 характеризуется гораздо меньшим профилем токсичности в отношении эозинофилии, чем Proleukin®.

[00115] Фигура 8 представляет собой график, на котором показан увеличенный период полужизни IgG.IL2D49.H1.

[00116] На фигуре 9 показаны экспериментальные данные в отношении молекул белков на основе антитела с привитым цитокином на мышинной модели GvHD. Показано, что обработка с помощью белков на основе антитела с привитым цитокином на этой модели приводит к размножению Treg лучше, чем Proleukin®, при этом практически не влияя на CD4+/CD8+ Teff-клетки или NK-клетки.

[00117] На фигуре 10 показаны экспериментальные данные относительно потери массы тела, связанной с обработкой Proleukin®, на мышинной модели GvHD, тогда как при введении IgG.IL2D49.H1 наблюдается небольшая потеря массы тела.

[00118] На фигуре 11 показаны экспериментальные данные в отношении сравнения белков на основе антитела с привитым цитокином с Proleukin® на мышинной модели (NOD) с предиабетом, демонстрирующие, что IgG.IL2D49A.H1 предупреждает диабет 1 типа в этой модели.

[00119] На фигуре 12 показаны экспериментальные данные по сравнению соотношения Treg-клеток и CD8 эффекторных T-клеток на мышинной модели NOD с предиабетом.

[00120] На фигуре 13A показаны экспериментальные данные по фармакокинетике IgG.IL2D49A.H1 на мышинной модели NOD в дозе 1,3 мг/кг. На фигуре 13B показаны экспериментальные данные по фармакокинетике IgG.IL2D49A.H1 на мышинной модели NOD в дозе 0,43 мг/кг.

[00121] Фигура 14 представляет собой таблицу диапазонов доз, применяемых на мышинной модели NOD с предиабетом, и в ней сравниваются эквивалентные количества Proleukin®.

[00122] На фигуре 15A изображена серия графиков, показывающих величину активации pSTAT5 на человеческих PBMC, взятых у пациента с витилиго и обработанных *in vitro* IgG.IL2D49.H1, в сравнении с Proleukin®. На фигуре 15B изображена серия графиков, на которых показана величина активации pSTAT5 на человеческих PBMC, взятых у пациента с диабетом 1 типа и обработанных *in vitro* помощью IgG.IL2D49.H1 и Proleukin®.

[00123] На фигуре 16 показан график с данными ELISA, на котором показано, что при прививании IL2 на CDRH1 антитела к RSV связывание с RSV сохраняется. В то же время связывание с RSV снижается, если IL2 привит на CDRL3. Если IL2 привит на остоу другого антитела (Xolair), то связывание с RSV отсутствует.

[00124] На фигуре 17 показаны экспериментальные данные в отношении размножения Treg у яванского макака после однократного введения IgG.IL2D49A.H1.

[00125] На фигуре 18 показаны экспериментальные данные о влиянии увеличивающихся концентраций сшивающего антитела к человеческому IgG на избирательные виды активности GFTX3b_IL-2-H1-D49A.

[00126] На фигуре 19 показаны экспериментальные данные по избирательной передаче сигналов в PBMC пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями с применением GFTX3b_IL-2-H1-D49A.

[00127] На фигуре 20 показаны экспериментальные данные, что GFTX3b_IL-2-H1-D49A обладает более высокой, чем Proleukin, избирательностью в отношении передачи сигналов в Treg в сравнении с эффекторными T-клетками в PBMC человека.

Белки на основе антитела с привитым цитокином, нацеливающиеся на высокоаффинный рецептор IL2

[00128] В данном документе предусмотрены белковые конструкции, содержащие IL2, привитый на область, определяющую комплементарность (CDR), антитела. Белки на основе антитела с привитым цитокином демонстрируют подходящие свойства для

применения у людей–пациентов, например, они сохраняют иммуностимулирующую активность, сходную с таковой у нативного или рекомбинантного человеческого IL2. Однако негативные эффекты уменьшены, например, стимуляция NK–клеток. Другие виды активности и характеристики также продемонстрированы во всем настоящем описании. Таким образом, предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, обладающие улучшенным терапевтическим профилем по сравнению с ранее известными терапевтическими средствами на основе IL2 и модифицированного IL2, такими как Proleukin®, и способы применения предусмотренных белков на основе антитела с привитым цитокином в терапии.

[00129] Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые являются агонистами высокоаффинного рецептора IL2, с профилями избирательной активности. Предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина и последовательность легкой цепи иммуноглобулина. Каждая последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH), где константная область тяжелой цепи состоит из константных областей CH1, CH2 и CH3. Каждая последовательность легкой цепи иммуноглобулина содержит переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL). В каждом белке на основе антитела с привитым цитокином молекула IL2 включена в область, определяющую комплементарность (CDR), из VH или VL антитела.

[00130] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 1, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR1). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 2, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR2). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 3, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR3).

[00131] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 1, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR1). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 2, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR2). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 3, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR3).

[00132] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит последовательность IL2, включенную в CDR, при этом последовательность IL2 вставлена в последовательность CDR. Вставка может осуществляться в N–концевой области CDR или возле нее, в срединной области CDR или в C–концевой области CDR или возле нее. В других вариантах осуществления белок на

основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR, при этом последовательность IL2 заменяет всю последовательность CDR или ее часть. Замена может осуществляться в N-концевой области CDR, в срединной области CDR или в C-концевой области CDR или возле нее. Замена может затрагивать только одну или две аминокислоты последовательности CDR или всю последовательность CDR.

[00133] В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 привита непосредственно на CDR без пептидного линкера, без дополнительных аминокислот между последовательностью CDR и последовательностью IL2.

[00134] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат тяжелые цепи иммуноглобулина, представляющие собой тяжелые цепи антитела класса IgG. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь IgG относится к любому из подклассов IgG1, IgG2 или IgG4.

[00135] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, выбранные из известной последовательности иммуноглобулина, используемой в клинической практике. В определенных вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, которые представляют собой гуманизированные последовательности. В других определенных вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, которые представляют собой человеческие последовательности.

[00136] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, выбранные из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа.

[00137] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, характеризующиеся специфичностью связывания переменных доменов иммуноглобулина с мишенью, отличной от специфичности связывания молекулы IL2. В некоторых вариантах осуществления специфичность связывания переменного домена иммуноглобулина со своей мишенью сохраняется на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% в присутствии привитого цитокина. В определенных вариантах осуществления сохраняющаяся специфичность связывания направлена на мишень, отличную от человеческой. В определенных вариантах осуществления сохраняющаяся специфичность связывания направлена на вирус, например, RSV. В других вариантах осуществления специфичность связывания направлена на человеческую мишень, обладающую терапевтической пользой в рамках терапии с помощью IL2. В определенных вариантах осуществления нацеливание специфичности связывания иммуноглобулина представляет дополнительный терапевтически благоприятный эффект компонента IL2. В определенных вариантах

осуществления специфичность связывания иммуноглобулина со своей мишенью представляет синергетическую активность с IL2.

[00138] В некоторых других вариантах осуществления специфичность связывания иммуноглобулина со своей мишенью снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% в результате прививания молекулы IL2.

[00139] Предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином содержат молекулу IL2, включенную в область, определяющую комплементарность (CDR), из VH или VL белка на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:4. Предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином содержат молекулу IL2, включенную в область, определяющую комплементарность (CDR), из VH или VL белка на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:4.

[00140] Предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином содержат молекулу IL2, включенную в область, определяющую комплементарность (CDR), из VH или VL белка на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:6. Предусмотренные белки на основе антитела с привитым цитокином содержат молекулу IL2, включенную в область, определяющую комплементарность (CDR), из VH или VL белка на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:6.

[00141] В некоторых вариантах осуществления антитело с привитым цитокином

придает противовоспалительные свойства, превосходящие свойства человеческого IL2, рекомбинантного человеческого IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, придают повышенную активность Treg-клеткам, в то же время обеспечивая пониженную пропорциональную провоспалительную активность по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают преимущественную стимуляцию высокоаффинного рецептора IL2®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают преимущественную активацию Treg-клеток по сравнению с Teff-клетками, Tcon-клетками и/или NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают преимущественное размножение Treg-клеток по сравнению с Teff-клетками, Tcon-клетками и/или NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают повышенное размножение Treg-клеток без размножения CD8 эффекторных T-клеток или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают соотношение размножения Treg-клеток: NK-клеток, которое составляет, составляет приблизительно или составляет более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают соотношение размножения Treg-клеток: CD8 эффекторных T-клеток, которое составляет, составляет приблизительно или составляет более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают соотношение размножения Treg-клеток: CD4 Tcon-клеток, которое составляет, составляет приблизительно или составляет более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

[00142] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают эффективность передачи сигналов IL-2R, которая снижена в CD4 Tcon-клетках по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают эффективность передачи сигналов IL-2R, которая снижена в CD8 Teff-клетках по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают эффективность передачи сигналов IL-2R, которая снижена в NK-клетках по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают специфическую активацию Treg-клеток относительно

CD4 эффекторных Т-клеток, которая в приблизительно 1000 раз, в приблизительно 2000 раз, в приблизительно 3000 раз, в приблизительно 4000 раз, в приблизительно 5000 раз, в приблизительно 6000 раз, в приблизительно 7000 раз, в приблизительно 8000 раз, в приблизительно 9000 раз, в приблизительно 10000 или более раз выше, чем у человеческого IL2, рекомбинантного человеческого IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают специфическую активацию Treg-клеток относительно CD8 эффекторных Т-клеток, которая в приблизительно 100 раз, в приблизительно 200 раз, в приблизительно 300 раз, в приблизительно 400 раз, в приблизительно 500 раз, в приблизительно 600 раз, в приблизительно 700 раз, в приблизительно 800 раз, в приблизительно 900 раз, в приблизительно 1000 или более раз выше, чем у человеческого IL2, рекомбинантного человеческого IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают специфическую активацию Treg-клеток относительно CD8 эффекторных Т-клеток/Т-клеток памяти, которая в приблизительно 100 раз, в приблизительно 200 раз, в приблизительно 300 раз, в приблизительно 400 раз, в приблизительно 500 раз, в приблизительно 600 раз, в приблизительно 700 раз, в приблизительно 800 раз, в приблизительно 900 раз, в приблизительно 1000 или более раз выше, чем у человеческого IL2, рекомбинантного человеческого IL2 или Proleukin®.

[00143] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают пониженную токсичность, такую как повышение эозинофилии, по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают увеличенный период полужизни, такой как более 4 часов, более 6 часов, более 8 часов, более 12 часов, более 24 часов, более 48 часов, по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают снижение потери массы тела, например, у пациентов с болезнью "трансплантат против хозяина" (GvHD), по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, обеспечивают лучшую защиту от развития диабета 1 типа по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2 или Proleukin®.

[00144] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат модифицированный иммуноглобулин IgG, имеющий модифицированную Fc, придающую модифицированную эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления модифицированная Fc-область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина может

содержать мутацию или комбинацию мутаций, придающих сниженную эффекторную функцию, выбранных из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00145] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:20, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:33. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающих сниженную эффекторную функцию, выбранных из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00146] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:46, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:58. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающих сниженную эффекторную функцию, выбранных из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00147] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:71, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:84. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающих сниженную эффекторную функцию, выбранных из любой из D265A,

P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00148] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:97, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:110. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающих сниженную эффекторную функцию, выбранных из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

Сконструированные и модифицированные белки на основе антитела с привитым цитокином

[00149] В определенных вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином создают посредством прививания последовательности IL2 на CDR-область остова иммуноглобулина. Как тяжелые, так и легкие цепи иммуноглобулина получают с целью создания конечных привитых белков на основе антитела. Белки на основе антитела с привитым цитокином придают предпочтительную терапевтическую активность Treg-клеткам, однако белки на основе антитела с привитым цитокином характеризуются сниженной провоспалительной активностью по сравнению с нативным или рекомбинантным человеческим IL2 (rhIL2 или Proleukin®).

[00150] С целью конструирования белков на основе антитела с привитым цитокином последовательности IL2, содержащие определенные мутации (SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6), вставляют в CDR-петлю белка-остова, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Привитые конструкции можно получить с использованием любой из разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовались в клинических условиях, известных последовательностей иммуноглобулинов, которые находятся в настоящее время на стадии изыскания и/или клинической разработки, последовательностей антител зародышевого типа человека, а также последовательностей цепей иммуноглобулинов новых антител. Конструкции получают с помощью стандартных методик молекулярной биологии путем применения рекомбинантной ДНК, кодирующей соответствующие последовательности. Последовательности IL2 в иллюстративном остове, называемом GFTX3b, отображены в таблице 2. Точки вставки выбирали таким образом, чтобы они представляли собой срединную точку петли, на основании доступных данных структурного или гомологичного моделирования, однако точки вставки можно скорректировать так, чтобы

они находились около N- или C-конца CDR-петли.

[00151] Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые специфично связываются с высокоаффинным рецептором IL2, содержащие белок IL2, рекомбинантным путем вставленный в гетерологичный белок или полипептид, представляющий собой антитело, с получением белка на основе антитела с привитым цитокином. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанные в данном документе, или любой другой соответствующий остоновый полипептид антитела (например, белок иммуноглобулина, представляющий собой полное антитело, Fab-фрагмент, Fc-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, VH-домен, CDR VH, VL-домен, CDR VL и т. д.) и гетерологичный белок, полипептид или пептид, представляющий собой цитокин, например, IL2. Способы слияния или конъюгирования белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны из уровня техники. См., например, патенты США №№ 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851 и 5112946; европейские патенты №№ EP 307434 и EP 367166; международные публикации №№ WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535–10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590–5600; и Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337–11341. Кроме того, белки на основе антитела с привитым цитокином можно создавать с помощью методик перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (в совокупности называемых "перетасовкой ДНК"). Перетасовку ДНК можно применять для получения белков на основе антитела с привитым цитокином и/или для изменения активности антител или их фрагментов (например, антител или их фрагментов с более высокими значениями аффинности и более низкими значениями скорости диссоциации). См., в целом, патенты США №№ 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724–33; Narayana, 1998 Trends Biotechnol. 16(2):76–82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265–76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308–313 (каждый из данных патентов и публикаций тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять путем воздействия на них случайного мутагенеза с помощью ПЦР с внесением ошибок, случайной вставки нуклеотидов или других способов до проведения рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с антигенным белком, представляющим интерес, может быть подвергнут рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, сегментами, частями, доменами, фрагментами и т. д. одной или нескольких гетерологичных молекул цитокинов, например, IL2, для получения белков на основе антитела с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00152] Fab антитела содержит шесть CDR-петель – 3 в легкой цепи (CDRL1, CDRL2, CDRL3) и 3 в тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2, CDRH3), которые могут выступать

в качестве потенциальных участков вставки белка цитокина. Структурные и функциональные аспекты принимают во внимание с целью определения того, в какую(какие) CDR–петлю(петли) следует вставить цитокин. Поскольку размер и конформация CDR–петель в различных антителах значительно варьируются, оптимальная CDR для вставки может быть определена эмпирически для каждой конкретной комбинации антитело/белок. Кроме того, поскольку белок–цитокин будет вставлен в CDR–петлю, это может наложить дополнительные ограничения на структуру белка цитокина. Например, амино– и карбоксиконец белка цитокина должны обеспечивать возможность относительно близкого удержания в пространстве ($\sim 25 \text{ \AA}$). Кроме того, белок на основе антитела с привитым цитокином не должен зависеть от олигомеризации для биологической активности. Анализ доступных структур баз данных белков показывает, что многие белки цитокинов, включая IL2, попадают в эту категорию.

[00153] CDR цепей иммуноглобулина определяют с помощью хорошо известных систем нумерации, известных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе. Например, CDR были идентифицированы и определены с помощью (1) применения системы нумерации, описанной в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схемы нумерации "по Kabat"), NIH publication No. 91–3242; и (2) Chothia, см. Al–Lazikani et al., (1997) "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", J.Mol.Biol. 273:927–948. В случае идентифицированных аминокислотных последовательностей CDR, имеющих длину менее 20 аминокислот, одна или несколько консервативных замен аминокислотных остатков могут быть допустимыми, если при этом все еще сохраняются желаемые специфическое связывание и/или агонистическая активность.

[00154] Белок на основе антитела с привитым цитокином также можно получить с использованием антитела, имеющего одну или несколько из последовательностей CDR и/или VH и/или VL, показанных в данном документе (например, в таблице 2), в качестве исходного материала для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином, который может иметь измененные свойства по сравнению с исходным привитым белком на основе антитела. В качестве альтернативы, любые известные последовательности антител можно использовать в качестве остова для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, любое известное антитело, используемое в клинической практике, можно использовать в качестве остова исходного материала для получения привитого белка на основе антитела. Известные антитела и соответствующие последовательности иммуноглобулинов включают в себя, например, паливизумаб, алирокумаб, меполизумаб, нецитумумаб, ниволумаб, динутуксимаб, секукинумаб, эволокумаб, блинатумомаб, пембролизумаб, рамуцирумаб, ведолизумаб, силтуксимаб, обинутузумаб, трастузумаб, раксибакумаб, пертузумаб, белимумаб, ипилимумаб, деносумаб, тоцилизумаб, офатумумаб, канакинумаб, голимумаб, устекинумаб, цертолизумаб, катумаксомаб,

экулизумаб, ранибизумаб, панитумумаб, натализумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, эфализумаб, омализумаб, тозитумомаб, ибритумомаб, тиуксетан, адалимумаб, алемтузумаб, гемтузумаб, инфликсимаб, базиликсимаб, даклизумаб, ритуксимаб, абциксимаб, муромонаб или их модификации. Известные антитела и последовательности иммуноглобулинов также включают в себя последовательности антител зародышевого типа. Последовательности каркасных областей можно получить из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных литературных источников, которые содержат последовательности генов антител зародышевого типа. Например, последовательности ДНК зародышевого типа для генов вариабельной области человеческих тяжелой и легкой цепей можно найти в базе данных человеческих последовательностей зародышевого типа "VBase", а также в Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; и Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836. В еще некоторых других примерах антитела и соответствующие последовательности иммуноглобулинов из других известных структур, которые могут находиться на стадии раннего изыскания и/или разработки лекарственных средств, можно аналогичным образом адаптировать в качестве исходного материала для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00155] Можно использовать широкий спектр каркасов или остовов антител/иммуноглобулинов при условии, что полученный в результате полипептид содержит по меньшей мере одну связывающую область, которая приспособлена для включения цитокина (например, IL2). Такие каркасы или остовы включают в себя 5 основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов или их фрагментов и включают в себя иммуноглобулины от других видов животных, предпочтительно имеющие гуманизированные и/или человеческие составляющие. Специалисты в данной области продолжают проводить изыскание и разработку новых антител, каркасов, остовов и фрагментов.

[00156] Антитела можно создавать с помощью способов, которые известны из уровня техники. Для получения моноклональных антител можно применять любую методику, известную из уровня техники (см., например, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Методики получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778) можно адаптировать для получения антител с целью применения в белках на основе антитела с привитым цитокином. Кроме того, трансгенных мышей или другие организмы, такие как другие млекопитающие, можно использовать для экспрессии и идентификации приматизированных, или гуманизированных, или человеческих антител. В качестве альтернативы, технологию фагового дисплея можно применять для идентификации антител и гетеромерных Fab-фрагментов, которые специфически связываются с выбранными антигенами, для применения в белках на основе антитела с привитым цитокином (см., например,

McCafferty et al., выше; Marks et al., *Biotechnology*, 10:779–783, (1992)).

[00157] Способы приматизации или гуманизации антител, отличных от человеческих, хорошо известны из уровня техники. Как правило, приматизированное или гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не относящегося к примату или не относящегося к человеку. Такие аминокислотные остатки, отличные от остатков приматов или отличные от человеческих остатков, часто называют импортированными остатками, которые в типичном случае взяты из импортированного переменного домена. Гуманизацию можно выполнять по сути согласно способу Winter и сотрудников (см., например, Jones et al., *Nature* 321:522–525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323–327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534–1536 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593–596 (1992)) путем замены соответствующих последовательностей человеческого антитела CDR или последовательностями CDR грызунов. Соответственно, такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых существенно меньшая часть, чем интактный человеческий переменный домен, была заменена соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека. На практике приматизированные или гуманизированные антитела в типичном случае представляют собой антитела приматов или человеческие антитела, в которых некоторые остатки областей, определяющих комплементарность ("CDR"), и, возможно, некоторые остатки каркасных областей ("FR") заменены остатками из аналогичных участков у вида, из которого они происходят (например, из антител грызунов), для придания специфичности связывания.

[00158] В качестве альтернативы или дополнительно, способ замещения переменной области антитела, отличного от человеческого, человеческой переменной областью в антителе *in vivo* с сохранением тех же или обеспечением лучших характеристик связывания по сравнению с таковыми у антитела, отличного от человеческого, можно применять для превращения антител, отличных от человеческих, в сконструированные человеческие антитела. См., например, публикацию заявки на патент США № 20050008625, публикацию заявки на патент США № 2005/0255552. В качестве альтернативы, библиотеки человеческих V-сегментов можно создать путем последовательной замены кассетой, в ходе которой только часть V-сегмента эталонного антитела изначально заменяют библиотекой человеческих последовательностей; и идентифицированные человеческие "кассеты", обеспечивающие связывание в окружении остаточных аминокислотных последовательностей эталонного антитела, затем подвергают рекомбинации в ходе второго скрининга библиотек с созданием полностью человеческих V-сегментов (см. публикацию заявки на патент США № 2006/0134098).

[00159] Различные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования при получении белков на основе антитела с привитым цитокином можно получить путем ферментативной или химической модификации интактных антител, или синтезировать *de novo* с помощью технологий рекомбинантной ДНК (например,

одноцепочечный Fv), или идентифицировать с помощью библиотек фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552–554, 1990). Например, минитела можно получить с помощью способов, описанных в уровне техники, например, Vaughan and Sollazzo, *Comb Chem High Throughput Screen.* 4:417–30 2001. Биспецифические антитела можно получить с помощью разнообразных способов, включающих в себя прививание гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315–321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547–1553 (1992). Одноцепочечные антитела можно идентифицировать с помощью библиотек фагового дисплея или библиотек рибосомного дисплея, библиотек перетасованных генов. Такие библиотеки можно сконструировать из синтетических, полусинтетических или нативных и иммунокомпетентных источников. Выбранные последовательности иммуноглобулинов, таким образом, можно использовать при получении белковых конструкций на основе антитела с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00160] Антитела, антигенсвязывающие молекулы или молекулы на основе антитела с привитым цитокином по настоящему изобретению дополнительно включают в себя биспецифические антитела. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелая/легкая цепь и два различных связывающих участка. Другие антигенсвязывающие фрагменты или части антител включают в себя бивалентные scFv (диатела), биспецифические scFv-антитела, в которых молекула антитела распознает два различных эпитопа, одиночные связывающие домены (dAb) и минитела. Выбранные последовательности иммуноглобулинов, таким образом, можно использовать при получении белковых конструкций на основе антитела с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00161] Антигенсвязывающие фрагменты антител, например, Fab-фрагмент, scFv, можно применять в качестве строительных блоков для конструирования белков на основе антитела с привитым цитокином, и они могут необязательно включать в себя поливалентные форматы. В некоторых вариантах осуществления такие поливалентные молекулы содержат константную область антитела (например, Fc).

[00162] Белки на основе антитела с привитым цитокином можно конструировать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т. е. VH и/или VL) антитела, например, в одной или нескольких CDR-областях, и такие адаптированные последовательности VH- и/или VL-областей используют для прививания цитокина или для подготовки к прививанию цитокина. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести областях, определяющих комплементарность (CDR), тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR являются более разнообразными у отдельных антител, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать

рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретного антитела, посредством конструирования векторов экспрессии, которые содержат последовательности CDR из конкретного антитела, привитые на последовательности каркасных областей из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323–327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522–525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029–10033; патент США № 5225539 за авторством Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen et al.). В определенных случаях благоприятным является осуществление мутации остатков в пределах каркасных областей для сохранения или повышения антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторства Queen et al.).

[00163] В некоторых аспектах мутация аминокислотных остатков в CDR1–, CDR2– и/или CDR3–областях VH и/или VL для улучшения таким образом одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) антитела, представляющего интерес, известная как "созревание аффинности", может быть благоприятной, например, для оптимизации связывания антигена антителом с учетом того, что оно представлено в качестве составной части белка с привитым цитокином. Для введения мутации(мутаций) можно осуществлять сайт–направленный мутагенез или ПЦР–опосредованный мутагенез, и эффект в отношении связывания антитела или другого функционального свойства, представляющего интерес, можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, описанных в данном документе и представленных в примерах, и/или альтернативных или дополнительных анализах, известных из уровня техники. Можно вводить консервативные модификации. Мутации могут представлять собой замены, добавления или делеции аминокислот. Более того, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в пределах CDR–области.

[00164] Сконструированные антитела или фрагменты антител включают в себя антитела или их фрагменты, в которых были осуществлены модификации остатков каркасных областей в пределах VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. В некоторых вариантах осуществления такие модификации каркасных областей осуществляют для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в изменении одного или нескольких остатков каркасной области на соответствующую последовательность зародышевого типа. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать остатки каркасной области, которые отличаются от последовательности зародышевого типа, из которой происходит антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевого типа, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных областей в их конфигурацию зародышевого типа можно вводить "обратные" соматические мутации с восстановлением последовательности зародышевого типа посредством, например, сайт–направленного мутагенеза. Дополнительная модификация каркасной

области предусматривает мутацию одного или нескольких остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одной или нескольких CDR-областей для удаления T-клеточных эпитопов со снижением тем самым потенциальной иммуногенности антитела. Данный подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации заявки на патент США № 20030153043 авторства Carr et al.

[00165] Константные области антител или фрагментов антител, используемых для получения белка на основе антитела с привитым цитокином, могут в соответствии с необходимостью относиться к любому типу или подтипу и могут быть выбраны так, чтобы они происходили из вида субъекта, подлежащего лечению с помощью способов по настоящему изобретению (например, человека, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего, например, сельскохозяйственного млекопитающего (например, лошади, овцы, быка, свиньи, верблюда), домашнего млекопитающего (например, собаки, кошки) или грызуна (например, крысы, мыши, хомяка, кролика). В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в белках на основе антитела с привитым цитокином, сконструированы с целью создания гуманизированных антител или антител Humaneered®. В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в белках на основе антитела с привитым цитокином, представляют собой человеческие антитела. В некоторых вариантах осуществления изотип константной области антител представляет собой IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. В определенных вариантах осуществления изотип константной области представляет собой IgG₁. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат IgG. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антитела с привитым цитокином содержат Fc IgG2.

[00166] В качестве дополнения или альтернативы к модификациям, осуществляемым в пределах каркасных областей или CDR-областей, антитела или фрагменты антител, используемые при получении белков на основе антитела с привитым цитокином, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали модификации в пределах Fc-области, в типичном случае для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как, например, период полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело, фрагмент антитела или белок на основе антитела с привитым цитокином могут быть модифицированы химическим путем (например, к антителу могут быть присоединены один или несколько химических фрагментов) или быть модифицированы с изменением характера их гликозилирования, опять-таки для изменения одного или нескольких функциональных свойств белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00167] В одном варианте осуществления шарнирную область СН1 модифицируют таким образом, что число цистеиновых остатков в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Например, данный подход дополнительно

описан в патенте США № 5677425 авторства Bodmer et al., в котором число цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности белка на основе антитела с привитым цитокином. В другом варианте осуществления область Fc-шарнир антитела подвергают мутации для изменения биологического периода полужизни белка на основе антитела с привитым цитокином. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в пограничную область между доменами СН2-СН3 фрагмента Fc-шарнир, вследствие чего белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется нарушенным связыванием с белком А стафилококка (SpA) по сравнению со связыванием нативного домена Fc-шарнир с SpA. Данный подход более подробно описан в патенте США № 6165745 авторства Ward et al.

[00168] В настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антитела с привитым цитокином, которые специфически связываются с высокоаффинным рецептором IL2, которые характеризуются увеличенным периодом полужизни *in vivo*. В другом варианте осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Белки на основе антитела с привитым цитокином, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни *in vivo*, также можно создать путем введения одной или нескольких аминокислотных модификаций (т. е. замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или фрагмент шарнир-Fc-домен). Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 авторства Ward. См., например, международную публикацию № WO 98/23289; международную публикацию № WO 97/34631 и патент США № 6277375. В качестве альтернативы, для увеличения биологического периода полужизни белок на основе антитела с привитым цитокином изменяют в пределах СН1- или CL-области таким образом, чтобы он содержал эпитоп связывания рецептора реутилизации, полученный из двух петель СН2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 авторства Presta et al. В еще нескольких других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, одну или несколько аминокислот можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы белок на основе антитела с привитым цитокином характеризовался измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохранял антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор (FcR) или компонент C1 системы комплемента. Данный подход подробно описан, например, в патентах США №№ 5624821 и 5648260, оба авторства Winter et al.

[00169] В другом варианте осуществления одну или несколько аминокислот,

выбранных из аминокислотных остатков, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы белок на основе антитела с привитым цитокином характеризовался измененным связыванием C1q и/или пониженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Данный подход более подробно описан в патенте США № 6194551 авторства Idusogie et al.

[00170] Белки на основе антитела с привитым цитокином, содержащие такие мутации, опосредуют сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или не опосредуют ее. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки L234 и L235 в константной области IgG1 заменены на Ala234 и Ala235. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток N267 в константной области IgG1 заменен на Ala267.

[00171] В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют для изменения таким образом способности белка на основе антитела с привитым цитокином к фиксации комплемента. Этот подход дополнительно описан в публикации согласно PCT WO 94/29351 авторства Bodmer et al.

[00172] В еще одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности белка на основе антитела с привитым цитокином в отношении Fcγ-рецептора посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход дополнительно описан в публикации согласно PCT WO 00/42072 авторства Presta. Более того, связывающие участки на человеческом IgG1 для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591–6604).

[00173] В еще одном варианте осуществления модифицируют характер гликозилирования белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, можно получить агликозилированный белок на основе антитела с привитым цитокином (т. е. белок на основе антитела с привитым цитокином, у которого отсутствует гликозилирование). Характер гликозилирования может быть изменен, например, для повышения аффинности антитела в отношении "антигена". Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования в каркасной области варибельной области с устранением тем самым гликозилирования в этом сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела в отношении антигена. Такой подход подробно описан, например, патентах США №№ 5714350 и 6350861 авторства Co et al.

[00174] В качестве дополнения или альтернативы можно получить белок на основе антитела с привитым цитокином, который характеризуется измененным типом гликозилирования, такой как гипофукозилированный белок на основе антитела с привитым цитокином, имеющий уменьшенное количество фукозильных остатков, или

антитело, имеющее увеличенное содержание структур GlcNAc в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такой измененный характер гликозилирования увеличивает способность антител к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством экспрессии белка на основе антитела с привитым цитокином в клетке–хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в уровне техники, и их можно применять в качестве клеток–хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные белки на основе антитела с привитым цитокином, с получением таким образом белков на основе антитела с привитым цитокином с измененным характером гликозилирования. Например, в EP 1176195 авторства Hang et al. описывается линия клеток с функциональным нарушением гена FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, благодаря чему белки на основе антитела с привитым цитокином, экспрессируемые в такой линии клеток, демонстрируют гипофукозилирование. В публикации согласно PCT WO 03/035835 авторства Presta описан вариант линии клеток СНО, клетки Lecl3, с пониженной способностью к прикреплению фукозы к углеводам, связанным с Asn(297), что также приводит к гипофукозилированию белков на основе антитела с привитым цитокином, экспрессируемых в такой клетке–хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733–26740). В публикации согласно PCT WO 99/54342 авторства Umana et al. описываются линии клеток, сконструированные с возможностью экспрессии гликозилтрансфераз, модифицирующих гликопротеины (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), благодаря чему белки на основе антитела с привитым цитокином, экспрессируемые в сконструированных линиях клеток, характеризуются увеличенным содержанием структур GlcNAc в точках ветвления, что приводит к увеличению активности ADCC у антител (см. также Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176–180).

[00175] В некоторых вариантах осуществления один или несколько доменов или областей белка на основе антитела с привитым цитокином соединены с помощью линкера, например, пептидного линкера, такого как линкеры, хорошо известные из уровня техники (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444–6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121–1123). Длина пептидного линкера может варьироваться, например, линкер может иметь длину 1–100 аминокислот, в типичном случае линкер имеет длину от пяти до 50 аминокислот, например, имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, или 50 аминокислот.

[00176] В некоторых вариантах осуществления IL2 привит на последовательность CDR необязательно с одной или несколькими пептидными линкерными последовательностями. В определенных вариантах осуществления один или несколько пептидных линкеров независимо выбраны из последовательности $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m$ (SEQ ID NO: 115), последовательности $(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ (SEQ ID NO: 116) или любой комбинации последовательности $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m/(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ (SEQ ID NO 115 и 116 соответственно), где

каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 5, и каждое m независимо представляет собой целое число от 0 до 10. Примеры линкеров включают в себя без ограничения линкеры на основе глицина или линкеры Gly/Ser G/S, такие как $(G_mS)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и m представляет собой целое число, равное 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (SEQ ID NO: 117). В определенных вариантах осуществления один или несколько линкеров содержат повторы G_4S (SEQ ID NO: 118), например, линкер Gly-Ser $(G_4S)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное или большее 1 (SEQ ID NO: 118). Например, $n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$ и $n=6$, $n=7$, $n=8$, $n=9$ и $n=10$. В некоторых вариантах осуществления Ser может быть заменен на Ala, например, линкеры G/A, такие как $(G_mA)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и m представляет собой целое число, равное 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (SEQ ID NO: 119). В определенных вариантах осуществления один или несколько линкеров содержат повторы G_4A (SEQ ID NO: 120), $(G_4A)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное или большее 1 (SEQ ID NO: 120). Например, $n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$ и $n=6$, $n=7$, $n=8$, $n=9$ и $n=10$. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит несколько повторов линкеров. В других вариантах осуществления линкер содержит комбинации и множества из G_4S (SEQ ID NO: 118) и G_4A (SEQ ID NO: 120).

[00177] Другие примеры линкеров включают в себя линкеры, в основе которых лежат гибкие линкерные последовательности, которые встречаются в природе в антителах, для сведения к минимуму иммуногенности, обусловленной линкерами и сочленениями. Например, в молекулярной структуре антитела существует природная гибкая связь между переменным доменом и константным CH1-доменом. Данная природная связь содержит примерно 10–12 аминокислотных остатков, составляемых 4–6 остатками от C-конца V-домена и 4–6 остатками от N-конца CH1-домена. В белках на основе антитела с привитым цитокином, например, могут использоваться линкеры, в состав которых включены концевые 5–6 аминокислотных остатков или 11–12 аминокислотных остатков CH1 в качестве линкера. N-концевые остатки CH1-домена, в частности, первые 5–6 аминокислотных остатков, принимают конформацию петли без устойчивой вторичной структуры и, таким образом, могут выступать в качестве гибкого линкера. N-концевые остатки CH1-домена представляют собой природное удлинение переменных доменов, поскольку они представляют собой часть последовательностей Ig, и поэтому в значительной степени сводят к минимуму любую иммуногенность, потенциально обусловленную линкерами и сочленениями. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит модифицированную пептидную последовательность на основе последовательности шарнирной области.

[00178] Кроме того, белки на основе антитела с привитым цитокином могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид для облегчения очистки белков на основе антитела с привитым цитокином. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой

гексагистидиновый пептид (SEQ ID NO: 121), такой как, среди прочих, метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., Чатсворт, Калифорния), многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821–824, например, гексагистидин (SEQ ID NO: 121) обеспечивает удобную очистку привитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают без ограничения гемагглютининовую ("HA") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell 37:767), и метку "flag".

[00179] Антитела также могут быть прикреплены к твердым подложкам, которые являются особенно применимыми для иммунологических анализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают без ограничения стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Анализы для определения активности белков на основе антитела с привитым цитокином

[00180] Анализы для идентификации белков на основе антитела с привитым цитокином известны из уровня техники и описаны в данном документе. Агонистические белки на основе антитела с привитым цитокином связываются с высокоаффинным рецептором IL2 и способствуют внутриклеточной передаче сигнала, приводящей к эффектам Treg, а также иммуностимулирующим эффектам, индуцируют ее, стимулируют ее.

[00181] Связывание белков на основе антитела с привитым цитокином с высокоаффинным рецептором IL2 можно определить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Например, связывание с высокоаффинным рецептором IL2 можно определить с помощью известных методик, в том числе без ограничения ELISA, вестерн-блоттинга, поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore) и проточной цитометрии.

[00182] Внутриклеточную передачу сигнала посредством высокоаффинного рецептора IL2 можно измерить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Например, активация посредством IL2 способствует активации и передаче сигнала STAT5. Способы измерения активации STAT5 являются стандартными в данной области техники (например, определение статуса фосфорилирования белка STAT5, анализы репортерных генов, анализы нисходящей передачи сигнала и т. д.). Активация посредством высокоаффинного рецептора IL2 усиливала эффекты Treg. Кроме того, пониженное связывание низкоаффинного рецептора IL2 снижает пролиферацию естественных клеток-киллеров (NK) и CD8 эффекторных T-клеток. Способы измерения пролиферации клеток являются стандартными в данной области техники (например, анализы включения ³H-тимидина, мечение с помощью CFSE). Способы измерения продуцирования цитокинов хорошо известны из уровня техники (например, анализы ELISA, анализы ELISpot). При выполнении анализов *in vitro* тестируемые клетки или надосадочную жидкость культуры тестируемых клеток, приводимые в контакт с

агонистическим белком на основе антитела с привитым цитокином, можно сравнивать с контрольными клетками или образцами надосадочной жидкости культуры контрольных клеток, которые не были приведены в контакт с агонистическим белком на основе антитела с привитым цитокином и/или которые были приведены в контакт с рекомбинантным человеческим IL2 (например, Proleukin®).

[00183] Активность белков на основе антитела с привитым цитокином также можно измерить *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых аспектах способы измерения активации STAT5 в различных типах клеток *ex vivo* от животных, которые получали лечение белками на основе антитела с привитым цитокином, по сравнению с контрольными животными, которые не получали лечение, и/или животными, которые получали лечение аналогичным образом с помощью Proleukin®, можно применять для демонстрации дифференциальной активности агонистических белков на основе антитела с привитым цитокином в разных типах клеток. Предпочтительные агонистические белки на основе антитела с привитым цитокином обладают способностью обеспечивать активацию и размножение Treg-клеток. Например, активацию и размножение Treg-клеток *in vivo* можно измерить с помощью любого способа, известного из уровня техники, например, с помощью проточной цитометрии. Предпочтительные агонистические белки на основе антитела с привитым цитокином могут быть терапевтически полезными для предупреждения, уменьшения, подавления или устранения иммунных нарушений, например: диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (cGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома. Эффективность агонистических белков на основе антитела с привитым цитокином при диабете 1 типа и SLE можно определить путем введения терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином субъекту и сравнения субъекта до и после введения белка на основе антитела с привитым цитокином. Эффективность агонистических белков на основе антитела с привитым цитокином при терапии диабета 1 типа и SLE также можно определить путем введения терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином тестируемому субъекту и сравнения тестируемого субъекта с контрольным субъектом, которому не вводили антитело, и/или сравнения с субъектом, который получал лечение аналогичным образом с помощью Proleukin®.

Полинуклеотиды, кодирующие агонистические белки на основе антитела с привитым цитокином

[00184] В другом аспекте предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белковые тяжелые и легкие цепи белков на основе антитела с привитым цитокином. Белки на основе антитела с привитым цитокином можно получить с помощью любых способов, известных из уровня техники, в том числе без ограничения рекомбинантной экспрессии, химического синтеза и ферментативного расщепления

тетрамерных антител. Рекомбинантная экспрессия может осуществляться в любых подходящих клетках-хозяевах, известных из уровня техники, например, в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, бактериальных клетках-хозяевах, дрожжевых клетках-хозяевах, клетках-хозяевах, представляющих собой клетки насекомых, и т. д.

[00185] В данном документе предусмотрены полинуклеотиды, которые кодируют переменные области, приведенные в качестве примера под любым из SEQ ID NO:21, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:99, и SEQ ID NO:112.

[00186] В настоящем изобретении, таким образом, предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полипептидные легкие и/или тяжелые цепи белков на основе антитела с привитым цитокином, описанных в данном документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области или сегменты легких или тяжелых цепей, содержащие области, определяющие комплементарность, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO:73 и SEQ ID NO:99. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO: 112.

[00187] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:36.

[00188] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:49. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:62.

[00189] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий

тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:88.

[00190] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:101. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:114.

[00191] Полинуклеотиды могут кодировать только последовательность варибельной области белка на основе антитела с привитым цитокином. Они также могут кодировать как варибельную область, так и константную область белка на основе антитела с привитым цитокином. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит варибельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из белков на основе антитела с привитым цитокином. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, которые являются по существу идентичными варибельным областям тяжелой цепи и легкой цепи соответственно одного из привитых белков на основе антитела.

[00192] В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты содержат ДНК. В других вариантах осуществления полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты содержат РНК, которая может быть однострессовой или двухстрессовой.

[00193] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или несколько цепей иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и необязательно сигналы секреции. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит вектор, кодирующий одну цепь иммуноглобулинового белка и сигналы секреции. В других определенных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит один или несколько векторов, кодирующих две цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и сигналы секреции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит один вектор, кодирующий две цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и сигналы секреции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит два вектора, один из которых кодирует тяжелую цепь иммуноглобулинового белка, а другой кодирует легкую цепь иммуноглобулинового белка в белке на основе

антитела с привитым цитокином, при этом каждая из них содержит сигналы секреции. Рекомбинантная клетка–хозяин может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка–хозяин относится к линии эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка–хозяин относится к линии клеток млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка–хозяин представляет собой клетку СНО. В некоторых вариантах осуществления линия клеток–хозяев представляет собой линию клеток СНО для продуцирования антител.

[00194] Кроме того, предусмотрены способы получения белков на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии (i) культивирования клетки–хозяина, содержащей один или несколько векторов, кодирующих цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином, в условиях, подходящих для экспрессии, образования и секреции белка на основе антитела с привитым цитокином, и (ii) извлечения белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00195] Полинуклеотидные последовательности можно получить путем твердофазного синтеза ДНК *de novo* или путем ПЦР–мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, описанных в данном документе), кодирующей полипептидную цепь белка на основе антитела с привитым цитокином. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять с помощью способов, известных из уровня техники, таких как фосфотриэфирный способ из Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68:90, 1979; фосфодиэфирный способ из Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ из Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; и способ с использованием твердой подложки из патента США № 4458066. Введение мутаций в последовательность полинуклеотида с помощью ПЦР можно осуществлять, как описано, например, в *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; и Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

[00196] Также предусмотрены векторы экспрессии и клетки–хозяева для продуцирования белков на основе антитела с привитым цитокином, описанных выше. Различные векторы экспрессии можно использовать для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептидные цепи иммуноглобулинов или их фрагменты в белках на основе антитела с привитым цитокином. Для продуцирования иммуноглобулиновых белков в клетке–хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего, можно применять как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, а также искусственные человеческие хромосомы (см., например, Harrington et al., *Nat Genet* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов, соответствующих белкам на основе антитела с привитым цитокином, в клетках млекопитающих (например,

человеческих), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные из уровня техники, для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, папилломавируса, вируса Эпштейна–Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

[00197] Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток–хозяев, в которых следует экспрессировать вектор. В типичном случае векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими иммуноглобулиновый белок в белке на основе антитела с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор используют для предупреждения экспрессии встроенных последовательностей в условиях, отличающихся от индуцирующих. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозный, lacZ, металлотионеиновый промотор или промотор гена белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать в неиндуцирующих условиях без смещения в популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками–хозяевами. Для эффективной экспрессии цепи иммуноглобулина или ее фрагмента в белках на основе антитела с привитым цитокином, помимо промоторов, также могут быть необходимы или желательны другие регуляторные элементы. Такие элементы, как правило, включают кодон инициации трансляции ATG и смежный сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить путем включения энхансеров, соответствующих применяемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, для увеличения экспрессии в клетках–хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, можно применять энхансер SV40 или энхансер CMV.

[00198] В векторах экспрессии также может быть предусмотрено положение последовательности сигнала секреции для образования белка на основе антитела с привитым цитокином, который экспортируется из клетки и в культуральную среду. В определенных аспектах вставленные последовательности иммуноглобулинов в белках на основе антитела с привитым цитокином связываются с сигнальными последовательностями до включения в вектор. Векторы, подлежащие применению для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают возможность экспрессии переменных областей в виде привитых белков с константными областями, что таким образом приводит к

продуцированию интактных белков на основе антитела с привитым цитокином или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

[00199] Клетки–хозяева, несущие и экспрессирующие цепи белка на основе антитела с привитым цитокином, могут быть прокариотическими либо эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, применимым для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие подходящие для применения микробные хозяева включают бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и других энтеробактерий, таких как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для этих прокариотических хозяев также можно создать векторы экспрессии, которые, как правило, содержат последовательности для контроля экспрессии, совместимые с клеткой–хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое число разнообразных хорошо известных промоторов, как, например, лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета–лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Как правило, промоторы контролируют экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии полипептидов в белках на основе антитела с привитым цитокином также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Также можно применять клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

[00200] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления для экспрессии и продуцирования полипептидов в белках на основе антитела с привитым цитокином используют клетки–хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих. Например, они могут относиться к любой линии клеток млекопитающего, несущей экзогенный вектор экспрессии. Они охватывают любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животных или человеческие клетки. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток–хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, в том числе линии клеток СНО, различные линии клеток *Cos*, клетки *HeLa*, линии клеток миеломы, трансформированные В–клетки и гибридомы. Применение тканевой культуры клеток млекопитающих для экспрессии полипептидов в общих чертах обсуждается, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток–хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, могут содержать последовательности для контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49–68, 1986), и необходимые сайты, несущие информацию для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Такие векторы экспрессии обычно содержат промоторы, происходящие из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфическими в отношении типа клеток, специфическими в отношении стадии развития и/или

модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают без ограничения металлотионеиновый промотор, конститутивный большой поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор ρ 13 MRP, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как немедленно–ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор–энхансер, известные из уровня техники.

[00201] Способы введения векторов экспрессии, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, варьируются в зависимости от типа клетки–хозяина. Например, трансфекцию с использованием хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно применять для других клеток–хозяев (см. в общих чертах Sambrook et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную липосомами, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, депротенинизированную ДНК, искусственные вирионы, прививание на структурный белок VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное средством поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Чтобы обеспечить длительное получение рекомбинантных белков с высоким выходом, зачастую будет требоваться стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют иммуноглобулиновые цепи белка на основе антитела с привитым цитокином, можно получить с применением векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные экспрессионные элементы и ген селективируемого маркера. После введения вектора клетки можно оставить расти в течение 1–2 дней в обогащенной среде перед их переносом на селективную среду. Задачей селективируемого маркера является придание устойчивости к факторам отбора, и его присутствие обеспечивает возможность роста клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности, в селективных средах. Пролиферацию устойчивых стабильно трансфицированных клеток можно обеспечивать с применением методик культивирования тканей, соответствующих типу клеток.

Композиции, содержащие белки на основе антитела с привитым цитокином

[00202] Предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтические композиции необязательно дополнительно содержат другие терапевтические средства, которые являются подходящими для лечения или предупреждения указанного нарушения. Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию или облегчают получение композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, средства для покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми.

[00203] Фармацевтическую композицию можно вводить с помощью ряда способов, известных в данной области техники. Путь и/или способ введения варьируются в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительно, чтобы введение представляло собой парентеральное введение (например, выбранное из любого из внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, интратекального, внутриартериального или подкожного) или введение осуществлялось вблизи участка-мишени. Фармацевтически приемлемый носитель является подходящим для введения посредством любого одного или нескольких из внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, интратекального, внутриартериального, подкожного, интраназального, ингаляционного, спинального или эпидермального введения (например, с помощью инъекции или прививки). В зависимости от пути введения активное соединение, например, белок на основе антитела с привитым цитокином, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожного введения.

[00204] Белок на основе антитела с привитым цитокином в отдельности или в комбинации с другими подходящими компонентами может быть получен в виде аэрозольных составов (т. е. они могут быть "небулизированными") для введения путем ингаляции. Аэрозольные составы могут быть помещены в приемлемые сжатые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т. п.

[00205] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной и жидкой. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться благодаря включению в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия или желатина. В определенных вариантах осуществления композиции могут быть получены для хранения в лиофилизированной форме с использованием соответствующих вспомогательных веществ (например, сахарозы).

[00206] Фармацевтические композиции могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно практикуемыми в данной области техники. Фармацевтически приемлемые носители определяются отчасти конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, имеется широкое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций. Применимые способы составления белка на основе антитела с привитым цитокином и определения соответствующей дозы и схемы введения доз могут быть

найжены, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); и в Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press., а также в Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 31st Edition., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, каждая из которых тем самым включена в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в соответствии с положениями GMP. В типичном случае в фармацевтических композициях используется терапевтически эффективная доза или эффективная доза белка на основе антитела с привитым цитокином. Белок на основе антитела с привитым цитокином составляют в виде фармацевтически приемлемой лекарственной формы с помощью традиционных способов, известных специалистам в данной области. Схемы введения дозы корректируют для обеспечения желаемого ответа (например, терапевтического ответа). При введении терапевтически или профилактически эффективной дозы можно вводить низкую дозу, а затем постепенно увеличивать ее до тех пор, пока не будет достигнут желаемый ответ при минимальных или отсутствующих нежелательных побочных эффектах. Например, можно вводить одну болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление композиций для парентерального применения в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозирования. Единичная лекарственная форма, применяемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[00207] Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять для того, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, эффективным в отношении композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от разнообразных фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов.

Совместный состав со вторым средством

[00208] В некоторых вариантах осуществления фармакологические композиции содержат смесь белка на основе антитела с привитым цитокином и одного или нескольких дополнительных фармакологических средств. Иллюстративные вторые средства для включения в смеси с белком на основе антитела с привитым цитокином по настоящему изобретению включают без ограничения противовоспалительные средства, иммуномодулирующие средства, аминсалицилаты и антибиотики. Соответствующий выбор может зависеть от предпочтительного состава, дозировки и/или способа доставки.

[00209] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно составлен (т. е. предусмотрен в виде смеси или приготовлен в смеси) с противовоспалительным средством. В конкретных вариантах осуществления можно применять кортикостероидные противовоспалительные средства в сочетании с белком на основе антитела с привитым цитокином. Кортикостероиды для применения можно выбрать из любого из метилпреднизолон, гидрокортизон, преднизон, буденисонид, мезаламин и дексаметазон. Соответствующий выбор будет зависеть от предпочтений относительно состава и доставки.

[00210] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно составлен с иммуномодулирующим средством. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулятор выбран из любого из 6-меркаптопурина, азатиоприна, циклоспорина А, такролимуса и метотрексата. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулятор выбран из средства, воздействующего на TNF (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб, голимумаб), натализумаб и ведолизумаб.

[00211] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно составлен со средством на основе аминсалицилата. В конкретных вариантах осуществления аминсалицилат выбран из сульфасалазина, мезаламина, бальсалазида, олсалазина или других производных 5-аминсалициловой кислоты.

[00212] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно составлен с антибактериальным средством. Иллюстративные антибактериальные средства включают без ограничения сульфонамиды (например, сульфаниламид, сульфадиазин, сульфаметоксазол, сульфизоксазол, сульфацетамид), триметоприм, хинолоны (например, налидиксовую кислоту, циноксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, спарфлоксацин, флероксацин, перфлоксацин, левофлоксацин, гареноксацин и гемифлоксацин), метенамин, нитрофурантоин, пенициллины (например, пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, нафциллин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин и пиперациллин), цефалоспорины (например, цефазолин, цефалексин, цефадроксил, цефокситин, цефаклор, цефпрозил, цефуроксим, цефуроксим ацетил, лоракарбеф, цефотетан, цефоранид, цефотаксим, цефподоксим проксетил, цефибутен, цефдинир, цефдиторен пивоксил, цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон,

цефтазидим и цефепин), карбапенемы (например, имипенем, азтреонам) и аминогликозиды (например, неомицин, канамицин, стрептомицин, гентамицин, торамицин, нетилмицин и амикацин).

Изделия/наборы

[00213] В некоторых аспектах белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (т. е. в наборе). Предусмотренный белок на основе антитела с привитым цитокином, как правило, находится во флаконе или контейнере. Таким образом, изделие содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковке на контейнере или вместе с ним. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылку, флакон, шприц, пакет для раствора и т. д. При необходимости белок на основе антитела с привитым цитокином может находиться в жидкой или высушенной (например, лиофилизированной) форме. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для получения композиции для лечения, предупреждения и/или уменьшения интенсивности проявлений иммунного нарушения. Этикетка или инструкция по применению препарата указывает, что композиция используется для лечения, предупреждения и/или уменьшения интенсивности проявлений иммунного нарушения. Изделия (наборы), содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе, необязательно содержат одно или несколько дополнительных средств. В некоторых вариантах осуществления изделие (набор) содержит белок на основе антитела с привитым цитокином и фармацевтически приемлемый разбавитель. В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (наборе) с одним или несколькими дополнительными активными средствами в том же самом составе (например, в виде смесей). В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (наборе) со вторым или третьим средством в отдельных составах (например, в отдельных контейнерах). В определенных вариантах осуществления изделие (набор) содержит аликвоты белка на основе антитела с привитым цитокином, где аликвота предусматривает одну или несколько доз. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены аликвоты для множества введений, при этом дозы являются одинаковыми или разными. В конкретных вариантах осуществления различные схемы введения доз в соответствии с необходимостью предусматривают возрастание или уменьшение дозы. В некоторых вариантах осуществления дозы белка на основе антитела с привитым цитокином и второго средства являются независимо одинаковыми или независимо разными. В определенных вариантах осуществления изделие (набор) содержит дополнительное средство, выбранное из любого противовоспалительного средства, иммуномодулирующего средства, аминосалицилата и антибиотика. Выбор одного или нескольких дополнительных средств будет зависеть от дозы, доставки и болезненного состояния, подлежащего лечению.

Способы лечения и применение композиций для лечения иммунных нарушений

Состояния, подлежащие лечению или предупреждению

[00214] Белки на основе антитела с привитым цитокином находят применение в лечении, уменьшении интенсивности проявлений или профилактике иммунных нарушений. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения иммунных нарушений у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В настоящем изобретении также в одном аспекте предусмотрен белок на основе антитела с привитым цитокином для применения в качестве терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен белок на основе антитела с привитым цитокином для применения в качестве терапевтического средства для лечения или профилактики иммунного нарушения у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение белка на основе антитела с привитым цитокином для изготовления лекарственного препарата для лечения иммунного нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая такой белок на основе антитела с привитым цитокином, для применения в лечении или уменьшении интенсивности проявлений иммунного нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

[00215] Состояния, подлежащие лечению, включают иммунные нарушения. В терапевтических целях у индивидуума может иметься иммунное нарушение. В превентивных или профилактических целях индивидуум может находиться в состоянии ремиссии относительно активного состояния иммунного нарушения или может ожидать его наступления в будущем. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется иммунное нарушение, подозревается наличие иммунного нарушения, или имеет место стадия ремиссии относительно иммунного нарушения. При иммунных нарушениях, подлежащих лечению с помощью белка на основе антитела с привитым цитокином, получают пользу от активации передачи сигнала рецептора IL2 на Treg-клетках. Иммунные нарушения, подлежащие лечению, включают без ограничения: диабет 1 типа, системную красную волчанку, витилиго, хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (cGvHD), профилактику острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированный васкулит, очаговую алопецию, системную склеродермию, очаговую склеродермию и первичный антифосфолипидный синдром.

Введение белков на основе антитела с привитым цитокином

[00216] Врач или ветеринар может начинать введение доз белка на основе антитела с привитым цитокином, используемого в фармацевтической композиции, с уровней, более низких, чем уровни, необходимые для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. В целом, эффективные дозы композиций варьируются в зависимости от многих различных факторов, в том числе от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению, способов введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента, того,

является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения в типичном случае необходимо подбирать для оптимизации безопасности и эффективности. В случае введения белка на основе антитела с привитым цитокином доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1–10 мг/кг. Введение доз может происходить ежедневно, еженедельно, один раз в две недели, ежемесячно или, при необходимости или при желании, чаще или реже. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3–6 месяцев.

[00217] Белок на основе антитела с привитым цитокином можно вводить в однократной дозе или дробных дозах. Белок на основе антитела с привитым цитокином обычно вводят множество раз. Интервалы между отдельными дозами могут составлять, при необходимости или при желании, неделю, две недели, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровней белка на основе антитела с привитым цитокином в крови у пациента. В некоторых способах дозу корректируют для достижения концентрации белка на основе антитела с привитым цитокином в плазме крови, составляющей 1–1000 мкг/мл, и в некоторых способах 25–300 мкг/мл. В качестве альтернативы, белок на основе антитела с привитым цитокином можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота варьируются в зависимости от периода полужизни белка на основе антитела с привитым цитокином в организме пациента. В целом белки на основе антитела с привитым цитокином характеризуются более длительным периодом полужизни, чем нативный IL2 или рекомбинантные цитокины, такие как Proleukin®. Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, в профилактических путях применения относительно низкую дозу вводят с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Как правило, в терапевтических путях применения иногда необходимо введение относительно высокой дозы с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не ослабеет или не завершится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное уменьшение интенсивности проявлений симптомов заболевания. После этого пациенту можно осуществлять введение согласно профилактической схеме.

Совместное введение со вторым средством

[00218] Термин "комбинированная терапия" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения, описанного в настоящем изобретении. Такое введение охватывает совместное введение этих терапевтических средств по существу одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное соотношение активных ингредиентов. В качестве альтернативы,

такое введение охватывает совместное введение в виде нескольких или отдельных контейнеров (например, капсулы, порошки и жидкости) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разбавлены до требуемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также охватывает применение каждого типа терапевтического средства последовательным образом приблизительно в одно и то же время либо в разное время. В любом случае схема лечения будет обеспечивать полезные эффекты комбинации лекарственных средств при лечении состояний или нарушений, описанных в данном документе.

[00219] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно вводят с одним или несколькими дополнительными фармакологическими средствами. В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином и дополнительное одно или несколько средств вводят в виде смеси. В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином и дополнительное одно или несколько средств вводят в виде отдельных составов. В определенных вариантах осуществления, когда используют отдельные составы, введение является одновременным. В определенных вариантах осуществления, когда используют отдельные составы, введение является последовательным. В определенных вариантах осуществления, когда используют отдельные составы, введение происходит одним и тем же путем. В определенных вариантах осуществления, когда используют отдельные составы, введение происходит разными путями. Иллюстративные дополнительные средства для совместного введения с белком на основе антитела с привитым цитокином включают без ограничения противовоспалительные средства, иммуномодулирующие средства, аминосалицилаты и антибиотики. Соответствующий выбор может зависеть от предпочтительного состава, дозировки и/или способа доставки. Белки на основе антитела с привитым цитокином также находят свое применение в комбинированных средствах терапии с дополнительными утвержденными процедурами для лечения состояний, связанных с иммунными нарушениями, например, с помощью хирургического вмешательства.

[00220] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином совместно вводят с противовоспалительным средством. В конкретных вариантах осуществления можно применять кортикостероидные противовоспалительные средства в сочетании с белком на основе антитела с привитым цитокином. Кортикостероиды для применения можно выбрать из любого из метилпреднизолона, гидрокортизона, преднизона, буденисонида, мезаламина и дексаметазона. Соответствующий выбор будет зависеть от предпочтений относительно состава и доставки.

[00221] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином вводят совместно с иммуномодулирующим средством. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулятор выбран из любого из 6-меркаптопурина, азатиоприна, циклоспорина А, такролимуса и метотрексата. В другом

варианте осуществления иммуномодулятор выбран из средства, воздействующего на TNF (например, инфликсимаба, адалимумаба, цертолизумаба, голимумаба), натализумаба и ведолизумаба.

[00222] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином вводят совместно со средством на основе аminosалицилата. В конкретных вариантах осуществления аminosалицилат выбран из сульфасалазина, мезаламина, бальсалазида, олсалазина или других производных 5-аминосалициловой кислоты.

[00223] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином вводят совместно с антибактериальным средством. Иллюстративные антибактериальные средства включают без ограничения сульфонамиды (например, сульфаниламид, сульфадиазин, сульфаметоксазол, сульфизоксазол, сульфациетамид), триметоприм, хинолоны (например, налидиксовую кислоту, цинноксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, спарфлоксацин, флероксацин, перлоксацин, левофлоксацин, гареноксацин и гемифлоксацин), метенамин, нитрофурантоин, пенициллины (например, пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, нафциллин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин и пиперациллин), цефалоспорины (например, цефазолин, цефалексин, цефадроксил, цефокситин, цефаклор, цефprozил, цефуроксим, цефуроксим ацетил, лоракарбеф, цефотетан, цефоранид, цефотаксим, цефподоксим проксетил, цефibuтен, цефдинир, цефдиторен пивоксил, цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим и цефепин), карбапенемы (например, имипенем, азтреонам) и аминогликозиды (например, неомицин, канамицин, стрептомицин, гентамицин, торамицин, нетилмицин и амикацин).

[00224] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином вводят совместно со стандартом лечения. Например, в лечении диабета I типа стандартом лечения является введение инсулина или инсулинотерапия. Белки на основе антитела с привитым цитокином, раскрытые в данном документе, все равно будут успешно стимулировать иммунную толерантность, поскольку инсулин прежде всего восстанавливает нормальные уровни сахара.

Примеры

Пример 1. Создание белков на основе антитела с привитым цитокином IL2

[00225] Белки на основе антитела с привитым цитокином получали путем встраивания последовательности IL2 в CDR-области различных иммуноглобулиновых остовов, а затем как тяжелые, так и легкие цепи иммуноглобулинов применяли для получения конечных белков на основе антитела и цитокина. Белки на основе антитела с привитым цитокином придают предпочтительные терапевтические свойства IL2; в то же время белки на основе антитела с привитым цитокином характеризуются сниженными нежелательными эффектами, такими как повышенная активность NK-клеток, по сравнению с rhIL2.

[00226] С целью создания белков на основе антитела с привитым цитокином последовательности IL2, содержащие мутеины (SEQ ID NO:4 или 6), вставляли в CDR-петли остова, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Белки на основе антитела с привитым цитокином получали с применением разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовали в клинических условиях, а также последовательностей антител зародышевого типа. Последовательности IL2 в иллюстративном остове, называемом GFTX3b, отображены в таблице 2. Точки вставки выбирали таким образом, чтобы они представляли собой срединную точку петли, на основании доступных данных структурного или гомологичного моделирования. Белки на основе антитела с привитым цитокином получали с помощью стандартных технологий молекулярной биологии путем использования рекомбинантной ДНК, кодирующей соответствующие последовательности.

[00227] Выбор того, какую CDR выбрать для прививания цитокина, осуществляют на основе параметров необходимых биологических и биофизических свойств и благоприятного профиля разработки. Программное обеспечение для моделирования было лишь частично применимым при предсказании того, какая CDR и какое положение в CDR будут обеспечивать необходимые параметры, поэтому, таким образом, создают все шесть возможных молекул антител с привитым цитокином и затем оценивают в биологических анализах. При достижении необходимой биологической активности затем определялись с биофизическими свойствами, такими как структурная разрешающая способность, в отношении того, как молекула антитела с привитым цитокином взаимодействует с соответствующим рецептором цитокина.

[00228] В случае молекул антител с привитым IL2 изначально определяли структуру антитела-кандидата, рассматриваемого для прививания цитокина. Исходя из указанной структуры, было отмечено, что паратоп, часть антитела, которая взаимодействует с эпитопом, находился в крайнем положении N-конца "плеча" антитела, и что цитокин, привитый в указанном положении, будет представлять цитокин своему соответствующему рецептору. Благодаря технологии прививания каждый белок на основе антитела с привитым IL2 ограничен CDR-петлей с различной длиной, последовательностью и структурным окружением. Ввиду этого IL2 прививали на все шесть CDR, соответствующих LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3 и HCDR-1, HCDR-2 и HCDR-3. На фигуре 1 показаны различные иллюстративные версии цитокиновых прививок на основе антитела и IL2, которые включают различные точечные мутации и смещение точки вставки IL2 в N- или C-часть CDR-петли (nH1, cH1, nH2, cH2). Исходя из таблицы на фигуре 1, очевидно, что белки на основе антител с привитым цитокином отличаются по своей активности, включая то, что IL2, привитый на CDR2 легкой цепи (IgG.IL2.L2), не экспрессировался. Также наблюдалось, что молекулы антител с привитым цитокином IL2 с измененной функцией Fc (например, "молчащим" Fc) характеризовались лучшим профилем.

[00229] Была выбрана HCDR-1, поскольку она характеризовалась наилучшей

комбинацией свойств (биофизических и биологических), а точечные мутации IL2, которые были включены, обеспечивали усиление желаемых биологических свойств. При выборе точки вставки выбирали структурный центр CDR–петли, поскольку это обеспечивало наличие наибольшего пространства с каждой стороны (линейный размер 3,8Å x число остатков), и, без ограничения какой–либо теорией, это обеспечивало получение стабильной молекулы, давая возможность IL2 более свободно укладываться независимым образом. Поскольку структура остова GFTX3b для прививания уже была известной, также был известным и структурный центр каждой CDR. Он совпадал с центром последовательности CDR–петли, определенным с применением формата нумерации по Chothia. Как упоминалось ранее, точку вставки прививаемых молекул IL–2 смещали от центра в направлении N– либо C–концевой части CDR–петли. В то же время смещение IL2 в пределах CDR–петли не обуславливало значительную разницу в биологической активности.

[00230] Подводя итог, следует отметить, что точку вставки в каждой CDR выбирали на структурной основе, исходя из гипотезы, что прививание в CDR будет обеспечивать некоторый уровень стерического несоответствия отдельных субъединиц рецептора IL2. В основе окончательного выбора того, какая CDR для прививания была наиболее эффективной для конкретного цитокина, лежали желаемые биологические и биофизические свойства. Природа рецептора цитокина, взаимодействия цитокин/рецептор и механизм передачи сигнала также играли роль, и этот выбор осуществляли посредством сравнения каждой отдельной молекулы на основе антитела и цитокина по ее соответствующим свойствам.

ТАБЛИЦА 1

SEQ ID NO:1	ДНК, кодирующая IL2 дикого типа	AGTTCCTATCACTCTCTTTAATCACTACT CACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGT ACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCA СТАAGTCTTGCACCTTGTCAAAACAGTGC ACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACAC AGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGAT TTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAA TTACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGC TCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAG GCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCT AGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAA GTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTT TCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCA ATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAG GGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA
-------------	---------------------------------	---

		<p>TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAAT TTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAA AGCATCATCTCAACACTGACTTGATAATT AAGTGCTTCCCACTTAAAACATATCAGGC CTTCTATTTATTTAAATATTTAAATTTTAT ATTTATTGTTGAATGTATGGTTTGCTACCT ATTGTAAC TATTATTCTTAATCTTAAACT ATAAATATGGATCTTTTATGATTCTTTTTG TAAGCCCTAGGGGCTCTAAAATGGTTTCA CTTATTTATCCCAAATATTTATTATTATG TTGAATGTTAAATATAGTATCTATGTAGA TTGGTTAGTAAACTATTTAATAAATTTG ATAAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA</p>
SEQ ID NO:2	Белок IL2 дикого типа	<p>MYRMLLSIALSLALVTNSAPSSSTKKT QLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</p>
SEQ ID NO:3	ДНК, кодирующая мутеин IL2	<p>GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGG CCCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAAC AACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAG AAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGA AGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAG AACTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGAT CTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAC TGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGC GAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCG TGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTC TGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC</p>
SEQ ID NO:4	Белок–мутеин IL2, мутантная аминокислота выделена жирным шрифтом и подчеркиванием	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLL<u>L</u>ALQMLNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT</p>

SEQ ID NO:5	ДНК, кодирующая мутеин IL2	GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGG CCCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAAC AACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAG AAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGA AGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAG AACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGAT CTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAC TGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGC GAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCG TGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTC TCCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC
SEQ ID NO:6	Белок-мутеин IL2, мутантные аминокислоты выделены жирным шрифтом и подчеркиванием	APTSSSTKKTQLQLEHLLLA <u>L</u> QMILNGINNY KNPKLTRMLTFK <u>F</u> YMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF <u>S</u> QSIISTLT
SEQ ID NO:7	ДНК, кодирующая IL2 без сигнальной последовательности	GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGG ACCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAAC AACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAG AAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGA AGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAG AACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGAT CTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAC TGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGC GAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCG TGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTC TGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC
SEQ ID NO:8	Белок IL2 без сигнальной последовательности	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFK <u>F</u> YMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT
SEQ ID NO:9	ДНК, кодирующая мутеин IL2	GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGG ACCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAAC AACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAG AAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGA AGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAG AACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGAT CTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAC

		TGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGC GAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCG TGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTC TCCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC
SEQ ID NO:10	Белок–мутеин IL2, мутантная аминокислота выделена жирным шрифтом и подчеркиванием	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF <u>SQSIISTLT</u>

ТАБЛИЦА 2

IgG.IL2D49A.H1		
SEQ ID NO:11 (объединенная)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLALQMILNGINN</u> <u>YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE</u> <u>LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL</u> <u>TSTSGMSVG</u>
SEQ ID NO:12 (объединенная)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO: 13 (объединенная)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:14 (Kabat)	HCDR1	<u>APTSSSTKKTQLQLEHLLALQMILNGINNYKNP</u> <u>KLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL</u> <u>EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET</u> <u>TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLST</u> GMSVG
SEQ ID NO:15 (Kabat)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:16 (Kabat)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:17 (Chothia)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLALQMILNGINN</u> <u>YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE</u> <u>LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL</u> <u>TSTSGM</u>
SEQ ID NO:18	HCDR2	WWDDK

(Chothia)		
SEQ ID NO:19 (Chothia)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:20	VH	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL<u>APTSST</u> <u>KKTQLOLEHLLLALQOMILNGINNYKNPKLTRM</u> <u>LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNL</u> <u>AOSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE</u> <u>YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG</u> WIRQPPGKALEWLADIWDDKKDYNPSLKSRLTIS KDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNW YFDVWGAGTTVTVSS</p>
SEQ ID NO:21	ДНК, кодирую щая VH	<p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTG GTCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCA CCTTCTCCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCC AGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACAT CTGCTGCTGGCCCTGCAGATGATCCTGAACGGCA TCAACA ACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGC CACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGA GGA ACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCT GGCCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGG GACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGG AACTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCG AGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAAT TTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCC GTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGG CTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAA GTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCC GACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATGA TCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGG CACCACCGTGACCGTGTCTCT</p>
SEQ ID NO:22	Тяжелая	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL <u>APTSST</u>

	цепь	<p><u>KKTQLOLEHLLLALQMILNGINNYKNPKLTRM</u> <u>LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNL</u> <u>AOSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE</u> <u>YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG</u> WIRQPPGKALEWLADIWDDKDYNSPLKSRLTIS KDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNW YFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO:23	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	<p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTG GTCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCA CCTTCTCCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCC AGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACAT CTGCTGCTGGCCCTGCAGATGATCCTGAACGGCA TCAACA ACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGC CACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGA GGA ACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCT GGCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGG GACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGG AACTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCG AGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAAT TTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCC GTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGG CTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAA</p>

				<p> GTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCC GACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATGA TCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGG CACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTAGCACCAAG GGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCA AGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACA GTGTCCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCG TGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCCTT CAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGG ACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAACT GCTGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCTCGGGAGGAACAGTACA ACTCCACCTACCG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAG ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAA CCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAAACTGACCGTG GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGG CAAG </p>
SEQ	ID	NO:24	LCDR1	KAQLSVGYMH

(объединенная)		
SEQ ID NO:25 (объединенная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:26 (объединенная)	LCDR3	FQGSGYPFT
SEQ ID NO:27 (Kabat)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:28 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:29 (Kabat)	LCDR3	FQGSGYPFT
SEQ ID NO:30 (Chothia)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO:31 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO:32 (Chothia)	LCDR3	GSGYPF
SEQ ID NO:33	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:34	ДНК, кодирую щая VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO:35	Легкая цепь	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

		KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLISKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:36	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAG CGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTG AAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG AACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
IgG.II2D49A– C154S.H1		
SEQ ID NO:37 (объединенная)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQLEHLLALQMILNGINN</u> <u>YKNPKLTRMLTFKFPMPKKATELKHLOCLEEE</u> <u>LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL</u> <u>TSTSGMSVG</u>
SEQ ID NO:38 (объединенная)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:39 (объединенная)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:40 (Kabat)	HCDR1	<u>APTSSSTKKTQLEHLLALQMILNGINNYKNP</u> <u>KLTRMLTFKFPMPKKATELKHLOCLEEELKPL</u>

		<u>EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET</u> <u>TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTSTS</u> GMSVG
SEQ ID NO:41 (Kabat)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:42 (Kabat)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:43 (Chothia)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQLOLEHLLLALQMILNGINN</u> <u>YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE</u> <u>LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL</u> <u>TSTSGM</u>
SEQ ID NO:44 (Chothia)	HCDR2	WWDDK
SEQ ID NO:45 (Chothia)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:46	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL <u>APTSSST</u> <u>KKTQLOLEHLLLALQMILNGINNYKNPKLTRM</u> <u>LTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE</u> <u>YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTSTS</u> GMSVG WIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTIS KDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNW YFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO:47	ДНК, кодирую щая VH	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTG GTCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCA CCTTCTCCGGCTTCAGCCTGGCCCCCTACCTCCTCC AGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACAT CTGCTGCTGGCCCTGCAGATGATCCTGAACGGCA TCAACAACACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGC CACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGA GGAAGTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCT GGCCAGTCCAAGAAGTCCACCTGAGGCCTCGG

		<p>GACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGG AACTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCG AGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAAT TTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTCCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCC GTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGG CTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAA GTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCC GACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATGA TCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGG CACCACCGTGACCGTGTCTCT</p>
SEQ ID NO:48	Тяжелая цепь	<p><u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLAPTSST</u> <u>KKTQLOLEHLLLALQMLNGINNYKNPKLTRM</u> <u>LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNL</u> <u>AOSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE</u> <u>YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTSTSGMSVG</u> WIRQPPGKALEWLADIWDDKDYNSPLKSRLTIS KDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNW YFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO:49	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	<p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTG GTCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCA CCTTCTCCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCC AGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACAT CTGCTGCTGGCCCTGCAGATGATCCTGAACGGCA</p>

TCAACA ACTACAAGA ACCCCAAGCTGACCCGGA
TGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGC
CACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGA
GGA ACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCT
GGCCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGG
GACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGG
AACTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCG
AGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAAT
TTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTCCCAGTCCAT
CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCC
GTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCC
CTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC
AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGG
CTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAA
GTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCC
GACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATGA
TCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGG
CACCACCGTGACCGTGTCCCTCTGCTAGCACCAAG
GGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCA
AGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACA
GTGTCCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCG
TGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGG
CCTGTACTCCCTGTCCCTCCGTGGTCACAGTGCCTT
CAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCA
ACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGG
ACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGA
CCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAACT
GCTGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC
CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC
ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA
GCCTCGGGAGGAACAGTACA ACTCCACCTACCG
GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC

		TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAG ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAA CCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAAACTGACCGTG GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGG CAAG
SEQ ID NO:50 (объединенная)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:51 (объединенная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 52(объединенная)	LCDR3	FQSGYPFT
SEQ ID NO:53 (Kabat)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:54 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:55 (Kabat)	LCDR3	FQSGYPFT
SEQ ID NO:56 (Chothia)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO:57 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO:58 (Chothia)	LCDR3	GSGYPF
SEQ ID NO:59	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:60	ДНК, кодирую щая VL	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAG</p>
SEQ ID NO:61	Легкая цепь	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
SEQ ID NO:62	ДНК, кодирую щая легкую цепь	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAG CGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTG AAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG AACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT</p>

		GC
IgG.IL2.L3		
SEQ ID NO:63 (объединенная)	HCDR1	GFSLSSTSGMSVG
SEQ ID NO:64 (объединенная)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:65 (объединенная)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:66 (Kabat)	HCDR1	TSGMSVG
SEQ ID NO:67 (Kabat)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:68 (Kabat)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:69 (Chothia)	HCDR1	GFSLSSTSGM
SEQ ID NO:70 (Chothia)	HCDR2	WWDDK
SEQ ID NO:71 (Chothia)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:72	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMSV GWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLT ISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITN WFYFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO:73	ДНК, кодирую щая VH	CAAGTCACCCTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGG TCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCCTGCAC CTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGT CCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGA CAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCA AGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGC CGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATG ATCACC AACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTG

		GCACCACCGTGACCGTGTCCCTCT
SEQ ID NO:74	Тяжелая цепь	<p>QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSV GWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLT ISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITN WYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO:75	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	<p>CAAGTCACCCTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGG TCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCAC CTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGT CCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGA CAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCA AGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGC CGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATG ATCACC AACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTG GCACCACCGTGACCGTGTCCCTCTGCTAGCACCAA GGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGC AAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCCCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCG GCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCC TTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAG ACCCACACCTGTCCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAAC</p>

		<p>TGCTGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAG ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAA CCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTG GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCTGTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGG CAAG</p>
SEQ ID NO:76 (объединенная)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:77 (объединенная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:78 (объединенная)	LCDR3	<p>FQGS<u>GAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN</u> <u>NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEE</u> <u>ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL</u> <u>KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST</u> <u>LTYPFT</u></p>
SEQ ID NO:79 (Kabat)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:80 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:81 (Kabat)	LCDR3	<p>FQGS<u>GAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN</u> <u>NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEE</u></p>

		<u>ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL</u> <u>KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST</u> <u>LTYPFT</u>
SEQ ID NO:82 (Chothia)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO:83 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO:84 (Chothia)	LCDR3	<u>GSGAPTSSSTKKTQLOLEHLLLDLQMLNGINNY</u> <u>KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL</u> <u>KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL</u> <u>TYPF</u>
SEQ ID NO:85	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEATYYCFQSG <u>AAPTSSSTKKTQLOL</u> <u>EHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP</u> <u>KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</u> <u>EFLNRWITFCQSIISTLTYPFTFGGGTKLEIK</u>
SEQ ID NO:86	ДНК, кодирую щая VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CTGGCGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTG CAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAAG AACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTCAAGT TCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAAC ATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAAGTGAAGCCCC TGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCCAGTCCAAGA ACTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAA

		<p>CATCAACGTGATCGTGCTGGAAGGGCTCC GAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAG ACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGA TCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGAC CTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTG GAAATCAAG</p>
SEQ ID NO:87	Легкая цепь	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEATYYCFQGS<u>APTSSSTKKTQLQL</u> <u>EHLLEDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP</u> <u>KKATELKHLOCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</u> <u>EFLNRWITFCQSIISTLTYPFTFGGGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
SEQ ID NO:88	ДНК, кодирую щая легкую цепь	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CTGGCGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTG CAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAAG AACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTCAAGT TCTACATGCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAAC ATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCC TGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAA CATCAACGTGATCGTGCTGGAAGGGCTCC GAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAG ACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGA</p>

		TCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGAC CTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGA GCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
IgG.IL2C217S.L3		
SEQ ID NO:89 (объединенная)	HCDR1	GFSLSTSGMSVG
SEQ ID NO:90 (объединенная)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:91 (объединенная)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:92 (Kabat)	HCDR1	TSGMSVG
SEQ ID NO:93 (Kabat)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO:94 (Kabat)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:95 (Chothia)	HCDR1	GFSLSTSGM
SEQ ID NO:96 (Chothia)	HCDR2	WWDDK
SEQ ID NO:97 (Chothia)	HCDR3	SMITNWFYFDV
SEQ ID NO:98	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSV GWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLT ISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITN

		WYFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO:99	ДНК, кодирую щая VH	CAAGTCACCCTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGG TCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCAC CTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGT CCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGA CAAGAAGGACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCA AGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGC CGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATG ATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTG GCACCACCGTGACCGTGTCTCT
SEQ ID NO:100	Тяжелая цепь	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSV GWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLT ISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITN WYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:101	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	CAAGTCACCCTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGG TCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCAC CTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGT CCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGA CAAGAAGGACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCA AGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGC CGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCATG ATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTG

		GCACCACCGTGACCGTGTCCCTCTGCTAGCACCAA GGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGC AAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCCCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCG GCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCC TTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAG ACCCACACCTGTCCCTGCCCTGCTCCTGAAC TGCTGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCTCGGGAGGAACAGTACA ACTCCACCTACCG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAG ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAA CCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAAACTGACCGTG GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGG CAAG
SEQ ID NO:102 (объединенная)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:103 (объединенная)	LCDR2	DTSKLAS

SEQ ID NO:104 (объединенная)	LCDR3	<u>FQGS</u> <u>GAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ</u> <u>MILNGIN</u> <u>NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH</u> <u>LQCLEE</u> <u>ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN</u> <u>VIVLEL</u> <u>KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ</u> <u>SIIST</u> <u>LTYPFT</u>
SEQ ID NO:105 (Kabat)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO:106 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO:107 (Kabat)	LCDR3	<u>FQGS</u> <u>GAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ</u> <u>MILNGIN</u> <u>NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH</u> <u>LQCLEE</u> <u>ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN</u> <u>VIVLEL</u> <u>KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ</u> <u>SIIST</u> <u>LTYPFT</u>
SEQ ID NO:108 (Chothia)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO:109 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO:110 (Chothia)	LCDR3	<u>GSG</u> <u>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ</u> <u>MILNGINNY</u> <u>KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH</u> <u>LQCLEEEL</u> <u>KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN</u> <u>VIVLELK</u> <u>GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ</u> <u>SIISTL</u> <u>TYPF</u>
SEQ ID NO:111	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEATYYCFQGS <u>GAPTSSSTKKTQLQ</u> <u>EHLLLDLQ</u> <u>MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP</u> <u>KKATELKH</u> <u>LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNIN</u> <u>VIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</u> <u>EFLNRWITFSQ</u> <u>SIISTLTYPFTFGGGTKLEIK</u>
SEQ ID NO:112	ДНК, кодирую щая VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG

		<p>CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CTGGCGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTG CAGATGATCCTGAACGGCATCAACAATAACAAG AACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTCAAGT TCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAAC ATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCC TGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAA CATCAACGTGATCGTGCTGGAACCTGAAGGGCTCC GAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAG ACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGA TCACCTTCTCCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC TACCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGG AAATCAAG</p>
SEQ ID NO:113	Легкая цепь	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWY QQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCFQSGS<u>APTSSSTKKTQLQL</u> <u>EHLLEDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP</u> <u>KKATELKHLOCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</u> <u>EFLNRWITFSQSIISTLTYPFTFGGGTKLEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
SEQ ID NO:114	ДНК, кодирую щая легкую цепь	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGT CCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTG CAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCG TGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGAGTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCC</p>

		<p>GACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCT CTGGCGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAAC CCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTG CAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAAG AACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTCAAGT TCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAAC ATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAAGTGAAGCCCC TGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGA ACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAA CATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCC GAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAG ACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGA TCACCTTCTCCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACC TACCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGG AAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTT CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA GGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCC TGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
--	--	--

Пример 2. Белки на основе антитела с привитым цитокином демонстрируют большую активность в отношении Treg-клеток и увеличенный период полужизни

[00231] Выбрали IgG.IL2D49A.H1 и IgG.IL2.L3, поскольку они достигали желаемых биологических эффектов по сравнению с Proleukin® (на фигуре 1 кратко изложены относительные изменения). Эти эффекты включают в себя избирательность в отношении IL-2R на Treg по сравнению с Tcon и NK-клеток, больший период полужизни при размножении Treg по сравнению с Tcon и NK-клеток у мышей.

[00232] При оценке стимуляции высокоаффинного рецептора IL-2 как Proleukin®, так и прививка IgG.IL2D49A.H1 продемонстрировали сравнимую интенсивность сигнала на Treg-клетках, но IgG.IL2D49A.H1 показал снижение активности или ее отсутствие как на CD8 эффекторных T-клетках, так и на NK-клетках, в отличие от Proleukin®. IL2, привитый на CDRL3 (IgG.IL2.L3), показал меньшую интенсивность сигнала на Treg, чем

Proleukin®, но отсутствие активности на NK–клетках. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (hPBMC) приобретали у NemaCare Corp. и тестировали *in vitro* с применением Proleukin®, IgG.IL2D49A.H1 или IgG.IL2.L3 для оценки избирательной активности в отношении высокоаффинного рецептора IL–2. Клетки помещали в бессывороточную тестовую среду и добавляли в каждую лунку. В лунки добавляли либо белок на основе антитела с привитым цитокином, либо нативный человеческий IL–2 и инкубировали в течение 20 мин. при 37°C. Через 20 мин. клетки фиксировали, окрашивали в отношении поверхностных маркеров, пермеабелизировали и окрашивали антителом к STAT5 (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя.

[00233] Фармакокинетические исследования IgG.IL2D49A.H1 или IgG.IL2.L3 в плазме крови показали увеличенный период полужизни по сравнению с Proleukin® после лишь 1 дозы. Размножение клеток оценивали в селезенке предиабетических мышей NOD через 8 дней после одной обработки с помощью Proleukin® или прививок. IgG.IL2D49A.H1 обеспечивал достижение превосходного размножения Treg по сравнению с эффекторными T–клетками и NK–клетками и был лучше переносимым, чем Proleukin®, у предиабетических мышей. Краткое изложение данных по стимуляции STAT5, PK/PD для IgG.IL2D49A.H1 и IgG.IL2.L3 показано на фигуре 2. Показано, что белки на основе антитела с привитым цитокином могут характеризоваться не только большим периодом полужизни, чем Proleukin®, но и стимуляцией целевых Treg–клеток без нежелательной стимуляции эффекторных T–клеток и NK–клеток.

Пример 3. Белок на основе антитела с привитым цитокином демонстрирует большую активность в отношении Treg–клеток

[00234] У мышей с диабетом без ожирения (NOD) спонтанно развивается диабет 1 типа, и их часто используют в качестве животной модели для диабета 1 типа у человека. Предиабетическим мышам NOD вводили эквимолярно Proleukin® (3х/неделя) и различные белки на основе антитела с привитым цитокином (1х/неделя). Через восемь дней после первой обработки селезенки обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток и промывали в RPMI (10% FBS). Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов (Sigma, № R7757) и подсчитывали клетки в отношении количества и жизнеспособности клеток. Окрашивание для FACS осуществляли согласно стандартным протоколам с помощью буфера для FACS (1хPBS+0,5% BSA+0,05% азид натрия). Клетки окрашивали поверхностными антителами: крысиным антителом к мышиному CD3, конъюгированным с BV605 (BD Pharmingen № 563004), крысиным антителом к мышиному CD4, конъюгированным с Pacific Blue (BD Pharmingen № 558107), крысиным антителом к мышиному CD8, конъюгированным с PerCp (BD Pharmingen № 553036), крысиным антителом к мышиному CD44, конъюгированным с FITC (Pharmingen № 553133), крысиным антителом к мышиному CD25, конъюгированным с APC (Ebioscience № 17–0251), и затем фиксировали/пермеабелизировали и окрашивали на наличие FoxP3 с помощью набора для окрашивания с антителом к мышиному/крысиному FoxP3,

конъюгированным с PE (Ebioscience № 72–5775). Клетки анализировали на BD LSR Fortessa® или BD FACS LSR II®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®. На фигуре 3 показаны значения кратности и соотношения, рассчитанные для каждой селезенки в виде абсолютного числа, при сравнении IgG.IL2D49A.H1 и IgG.IL2D113A.H1 с Proleukin®. Увеличение размножения Treg–клеток без размножения CD8 эффекторных T–клеток или NK–клеток с помощью IgG.IL2D49A.H1 показано в верхнем ряду. Это контрастирует с Proleukin® в низкой дозе и более высокой дозе, который приводит к размножению клеток всех типов.

Пример 4. Интенсивность передачи сигнала IL–2R снижена в CD4 Tcon и CD8 Teff, но не в Treg, in vitro

[00235] Как Proleukin®, так и IgG.IL2D49A.H1 тестировали in vitro в отношении интенсивности сигнала на IL–2R как в PBMC человека, так и в PBMC яванского макака. И IgG.IL2D49A.H1, и Proleukin® в эквимоллярных концентрациях IL2 продемонстрировали сходную интенсивность сигнала на Treg–клетках, которые экспрессируют высокоаффинный IL–2R, но только IgG.IL2D49A.H1 продемонстрировал пониженную активность на обычных CD4 и CD8 эффекторных T–клетках, которые экспрессируют низкоаффинный рецептор IL–2. Эти результаты наблюдались в PBMC как человека, так и яванского макака. Для анализа клетки PBMC помещали в бессывороточную тестовую среду и добавляли в каждую лунку. Или IgG.IL2D49A.H1, или Proleukin® добавляли в лунки и инкубировали в течение 20 минут при 37°C. Через 20 минут клетки фиксировали, окрашивали в отношении поверхностных маркеров, пермеабелизировали и окрашивали антителом к STAT5 (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки анализировали на BD LSR Fortessa®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®.

[00236] Результат, показанный на фигуре 4, был особенно наглядным. В PBMC как человека, так и яванского макака активацию pSTAT5 с помощью IgG.IL2D49A.H1 обнаружили на Treg, при этом очень низкую – на CD8 эффекторных T–клетках.

Пример 5. IgG.IL2D49A.H1 обеспечивает размножение функциональных и стабильных Treg in vitro

[00237] Улучшенная избирательность в отношении Treg сопровождается функциональным эффектом. Treg, размноженные с применением IgG.IL2D49A.H1, являются эквивалентными или лучшими супрессорами эффекторных T–клеток, чем Treg, размноженные с помощью Proleukin®. Для этого анализа PBMC человека очищали из цельной крови центрифугированием в градиентах Ficoll–Нураque (GE HealthCare, кат. № 17–1440–03). В PBMC лизировали RBC (Amimed, кат. № 3–13F00–H). CD4+ T–клетки обогащали с применением набора для обогащения CD4+ T–клеток EasySep (StemCell Technologies, кат. № 19052). Обогащенные CD4+ окрашивали антителом к CD4, конъюгированным с V500 (клон RPAT4), антителом к CD127, конъюгированным с PerCP–Cy5.5, и антителом к CD25, конъюгированным с APC, и сортировали с выделением CD4+CD127–CD25+ природных регуляторных T–клеток (nTreg) и CD4+CD127+CD25– T–

респондеров (Tresp). Сортированные Treg высевали ($1 \times 10^5/100$ мкл/лунка) в повторах в 96-луночные круглодонные микропланшеты, заполненные средой, и стимулировали микрогранулами при соотношении гранул к клетке 3:1 в присутствии 1 нМ или 0,3 нМ Proleukin® или IgG.IL2D49A.H1 в эквимольных концентрациях. После 24-часовой инкубации при 37°C лунки повторно заполняли 100 мкл среды, содержащей ту же концентрацию IL2. На 3-й день культуры суспендировали, разделяли пополам и повторно заполняли 100 мкл среды, содержащей ту же концентрацию IL2. На 6-й день культуры обрабатывали, как на 3-й день. На 8-й день клетки собирали, объединяли в пробирки и удаляли гранулы путем помещения пробирок на мультистендовый магнит на 1–2 минуты. Надосадочную жидкость, содержащую клетки, собирали и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем клетки подсчитывали и снова высевали в количестве приблизительно $5 \times 10^5/мл$ в 48-луночные микропланшеты с плоским дном, заполненные средой, содержащей 1/5 от исходной концентрации IL2. После 2-дневного перерыва клетки собирали, подсчитывали и анализировали или применяли в анализе супрессии. Размноженные Treg и свежеоттаявшие CD4+CD127+CD25- Т-клетки-респондеры (Tresp) метили, как описано в инструкциях производителя, с помощью 0,8 мкМ CTViolet (Life Technologies, кат. № C34557) и 1 мкМ CFSE (Life Technologies, кат. № C34554) соответственно. Для оценки супрессорных свойств размноженных Treg 3×10^4 меченных CFSE Tresp высевали в трех повторностях отдельно или с мечеными CTViolet Treg (при различном соотношении Tresp:Treg) и стимулировали с применением Dynabead при соотношении гранул к клетке 1:8 (конечный объем 200 мкл/лунка). Через 4–5 дней клетки собирали и оценивали пролиферацию клеток-респондеров с помощью проточной цитометрии.

[00238] Статус метилирования оценивали в свежих и размноженных Treg при сравнении с Tresp-клетками. Геномную ДНК (gDNA) выделяли из $>5,0 \times 10^5$ клеток с помощью Allprep® DNA/RNA Mini от Qiagen (кат. № 80204). Затем 200 нг gDNA обрабатывали с помощью набора для модификации ДНК Imprint® от Sigma (кат. № MOD50) для превращения неметилированных цитозинов в урацил (в то время как метилированные цитозины остаются неизменными). Затем оценивали количественное метилирование на 8 нг подвергнутой превращению с помощью бисульфита gDNA с применением ПЦР в реальном времени на основе специфического для последовательности зонда с использованием EpiTect MethyLight® PCR+ROX (Qiagen, кат. № 59496), контрольной ДНК EpiTect (Qiagen, кат. № 59695), стандартной метилированной (Life Technologies, кат. № 12AAZ7FP) и неметилированной (Life Technologies, кат. № 12AAZ7FP) плазмид, метилированных и неметилированных в Treg-специфической деметилированной области (TSDR) прямого и обратного праймеров и зондов (MicroSynth). Процент метилирования рассчитывали, как описано в Руководстве по ПЦР EpiTect MethyLight®.

[00239] На фигуре 5 графически показано стабильное деметилирование локуса Foxp3 в Treg, размноженных с применением Proleukin® и IgG.IL2D49A.H1. Человеческие

Treg, размноженные с применением IgG.IL2D49A.H1 *in vitro*, являются стабильными благодаря экспрессии и деметилированию Foxp3, что приводит к стабильным Treg-клеткам.

Пример 6. Сниженная интенсивность передачи сигнала IL-2R в человеческих NK *in vitro* при применении IgG.IL2D49.H1

[00240] IgG.IL2D49A.H1 демонстрировал сниженную интенсивность передачи сигнала в NK-клетках по сравнению с Proleukin® в эквимольных концентрациях. Клетки PBMC помещали в бессывороточную тестовую среду и добавляли в каждую лунку. Или IgG.IL2D49A.H1, или Proleukin® добавляли в лунки и инкубировали в течение 20 минут при 37°C. Через 20 минут клетки фиксировали 1,6% формальдегидом, промывали и окрашивали в отношении поверхностных маркеров. Спустя 30 минут нахождения при комнатной температуре образцы промывали и ресуспендированные клеточные осадки пермеабелизировали с помощью метанола при -20°C, промывали и окрашивали в отношении STAT5 и ДНК-интеркаляторов. Клетки пропускали на Cytof и данные анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo®. Результаты показаны на фигуре 6, где IgG.IL2D49A.H1 характеризуется небольшим эффектом в отношении NK-клеток или его отсутствием. Наоборот, обработка с помощью Proleukin® повышала активность pSTAT5 на NK-клетках как нежелательный побочный эффект обработки Proleukin®.

Пример 7. Оценка фармакокинетики (PK), фармакодинамики (PD) и токсикологических эффектов IgG.IL2D49A.H1 при подкожном введении самкам яванского макака

[00241] IgG.IL2D49A.H1 у яванских макаков продемонстрировал продолжительную фармакокинетику, превосходство в размножении Treg относительно эффекторных T-клеток и меньшую токсичность, чем при применении Proleukin® в низких дозах. Это неклиническое лабораторное исследование проводили в соответствии с утвержденным Комитетом Novartis по уходу и использованию животных общим протоколом № TX 4039, с этим протоколом и в соответствии со стандартными операционными процедурами (SOP) лаборатории.

[00242] Животным подкожно вводили IgG.IL2D49A.H1 или Proleukin® в первый день исследования. Кровь отбирали у всех животных при каждом уровне дозы на протяжении исследования. В 1-й день до введения дозы, через 1 час, 6 часов и 12 часов после введения дозы и затем на 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й, 7-й, 8-й, 10-й и 12-й день. Все образцы крови для фармакокинетики и фармакодинамики центрифугировали и получали образцы плазмы крови. Полученные образцы плазмы крови переносили в одну полипропиленовую пробирку и замораживали при примерно -70°C или ниже. Все образцы анализировали и концентрации IgG.IL2D49A.H1 и Proleukin® в плазме крови измеряли с помощью иммунологических анализов. Рассчитывали фармакокинетические параметры, такие как период полужизни, а клетки иммунофенотипировали с помощью FACS для фармакодинамики. Протокол анализа IL-2/IL-2 Gygos представляет собой следующее.

Каждый образец анализировали в двух повторностях, при этом для каждого из дублирующих анализов требовалось 5 мкл образца, который был разбавлен 1:20. Имобилизованное антитело представляет собой козье биотинилированное антитело к человеческому IL-2 (R&D Systems BAF202) и обнаруживается с помощью антитела к человеческому IL-2, конъюгированного с Alexa 647, клон MQ1-17H12 (Biolegend 500315) LOQ: 0,08 нг/мл, все иммунологические анализы проводили с применением Gyrolab Bioaffy200® с Gyros CD-200s®.

[00243] На фигуре 7 показаны различия между IgG.IL2D49A.H1 и Proleukin®. IgG.IL2D49A.H1 имеет период полужизни 12 часов, тогда как Proleukin® имеет период полужизни 3 часа. При увеличенном периоде полужизни IgG.IL2D49A.H1 повышается активность Treg и значительно снижается токсичность в отношении эозинофилии.

Пример 8. IgG.IL2D49A.H1 демонстрирует увеличенный период полужизни по сравнению с Proleukin®

[00244] IgG.IL2D49A.H1 демонстрировал период полужизни, составляющий примерно 12 часов, по сравнению с периодом полужизни Proleukin®, составляющим 4 часа, после однократного введения. Необработанным животным CD-1 вводили дозу внутривенно или подкожно и собирали кровь от всех животных до введения дозы, через 1 час, 3, 7, 24, 31, 48, 55 и 72 часа после введения дозы. Образцы крови центрифугировали и получали образцы плазмы крови. Полученные образцы плазмы крови переносили в одну полипропиленовую пробирку и замораживали при -80°C. Все образцы анализировали и концентрации IgG.IL2D49A.H1 в плазме крови измеряли с применением иммунологических анализов. Протокол анализа IL-2/IL-2 Gyros представляет собой следующее. Каждый образец анализировали в двух повторностях, при этом для каждого из дублирующих анализов требовалось 5 мкл образца, который был разбавлен 1:20. Имобилизованное антитело представляет собой козье биотинилированное антитело к человеческому IL-2 (R&D Systems BAF202) и обнаруживается с помощью антитела к человеческому IL-2, конъюгированного с Alexa 647, клон MQ1-17H12 (Biolegend 500315) LOQ: 0,08 нг/мл, все иммунологические анализы проводили с применением Gyrolab Bioaffy200® с Gyros CD-200s®. Этот анализ продолжается после определения периода полужизни в примере 7. Результаты этого анализа показаны на фигуре 8, где период полужизни IgG.IL2D49A.H1 определен как 12-14 часов, в отличие от Proleukin®, который имеет период полужизни, составляющий 4 часа.

Пример 9. Размножаются человеческие Treg, а не эффекторные T-клетки или NK-клетки у мышей с ксено-GvHD

[00245] IgG.IL2D49A.H1 обеспечивает избирательное размножение Treg по сравнению с эффекторными T-клетками или NK-клетками на модели ксено-GvHD, тогда как Proleukin® не обеспечивает этого. Мышам NOD-scid IL2R-гамма-ноль (NSG) вводили hPBMC от здоровых доноров путем внутрибрюшинной инъекции (HemaCare Corp). Через 24 часа после инъекции животным вводили дозы IgG.IL2D49A.H1 1х/неделя или Proleukin® 5х/неделя в течение всего периода исследования. Массу тела

контролировали два раза в неделю на протяжении всего исследования. По четыре мыши на группу собирали через 28 дней после первой дозы, и обрабатывали селезенки с получением суспензий отдельных клеток и промывали в RPMI (10% FBS). Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов и подсчитывали клетки в отношении количества и жизнеспособности клеток. Окрашивание для FACS осуществляли согласно стандартным протоколам с помощью буфера для FACS (1xPBS+0,5% BSA+0,05% азид натрия). Клетки окрашивали поверхностными антителами, а затем фиксировали/пермеабелизировали и окрашивали на FoxP3 в соответствии с набором для окрашивания с антителом к мышиному/крысиному FoxP3, конъюгированным с PE (Ebioscience, № 72–5775). Клетки анализировали на BD LSR Fortessa®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®. Значения кратности и соотношения основаны на относительном количестве, рассчитанном из абсолютного значения для каждой селезенки. На фигуре 9 показано, что IgG.IL2D49A.H1 обеспечивает размножение Treg-клеток намного лучше, чем Proleukin® в этой мышинной модели, а также уменьшает нежелательное размножение Tcon- и NK-клеток.

[00246] Если мышей с ксено-GvHD обрабатывали IgG.IL2D49A.H1 и вводили человеческие РВМС (чужеродные клетки), они сохраняли нормальную массу тела в ходе курса обработки. В отличие от этого, у мышей, получавших Proleukin®, наблюдалась сильная потеря массы тела. Массу тела контролировали два раза в неделю на протяжении всего исследования, а процент массы тела рассчитывали, принимая во внимание исходную массу животных на момент включения. Это улучшение связано с влиянием IgG.IL2D49A.H1 в отношении усиления Treg в этой модели, и данные графически показаны на фигуре 10. Эти данные указывают на то, что IgG.IL2D49A.H1 и другие белки на основе антитела с привитым цитокином имеют больший терапевтический индекс и запас для безопасности.

Пример 10. IgG.IL2D49A.H1 предупреждает развитие диабета 1 типа на модели диабета у мышей NOD

[00247] Предиабетическим самкам NOD вводили эквимолярно Proleukin® (3x/неделя) и IgG.IL2D49A.H1 (1x/неделя) путем внутрибрюшинной инъекции. В течение всего периода исследования (4 месяца после первой дозы) у мышей дважды в неделю контролировали содержание глюкозы в крови и массу тела. На фигуре 11 показано, что у мышей, обработанных IgG.IL2D49A.H1, сохранялся низкий уровень глюкозы в крови. Таким образом, мыши, обработанные с помощью IgG.IL2D49A.H1, не имели прогресса до явного диабета 1 типа (T1D). В отличие от этого, мыши, обработанные Proleukin®, имели вначале низкие уровни глюкозы в крови, но со временем которые увеличивались и привели к появлению симптомов диабета 1 типа.

Пример 11. IgG.IL2D49A.H1 при сравнении с низкой дозой Proleukin® у предиабетических мышей NOD

[00248] IgG.IL2D49A.H1 продемонстрировал превосходство в размножении Treg, лучшую переносимость и отсутствие побочных эффектов при применении одной дозы по

сравнению с 3 дозами Proleukin® на модели мышей NOD. Предиабетическим самкам NOD вводили эквивалентно низкие дозы Proleukin® (3х/неделя) и IgG.IL2D49A.H1 (1х/неделя) путем внутрибрюшинной инъекции. По четыре мыши на группу отбирали через 4 дня после первой дозы и обрабатывали селезенки с получением суспензий отдельных клеток и промывали в RPMI (10% FBS). Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов и подсчитывали клетки в отношении количества и жизнеспособности клеток. Окрашивание для FACS осуществляли согласно стандартным протоколам с помощью буфера для FACS (1xPBS+0,5% BSA+0,05% азид натрия). Клетки окрашивали поверхностными антителами: крысиным антителом к мышиному CD3, конъюгированным с BV605 (BD Pharmingen № 563004), крысиным антителом к мышиному CD4, конъюгированным с Pacific Blue (BD Pharmingen № 558107), крысиным антителом к мышиному CD8, конъюгированным с PerCp (BD Pharmingen № 553036), крысиным антителом к мышиному CD44, конъюгированным с FITC (Pharmingen № 553133), крысиным антителом к мышиному CD25, конъюгированным с APC (Ebioscience № 17-0251), и затем фиксировали/пермеабелизировали и окрашивали на наличие FoxP3 с помощью набора для окрашивания с антителом к мышиному/крысиному FoxP3, конъюгированным с PE (Ebioscience № 72-5775). Клетки анализировали на BD LSR Fortessa® или BD FACS LSR II®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®. Значения кратности и соотношения основаны на относительном количестве, рассчитанном из абсолютного значения для каждой селезенки. Введение однократной дозы IgG.IL2D49A.H1 продемонстрировало обеспечение большего размножения Treg, чем повторяющееся введение Proleukin® на модели мышей NOD, как показано на фигуре 12.

Пример 12. Фармакокинетика эффективной дозы IgG.IL2D49A.H1 на модели мышей NOD

[00249] Фармакокинетику IgG.IL2D49A.H1 при 1,3 мг/кг и 0,43 мг/кг анализировали в плазме крови вплоть до 48 часов после 1 дозы. Предиабетическим мышам NOD в возрасте 10 недель внутрибрюшинно вводили IgG.IL2D49A.H1 в двух разных концентрациях и кровь отбирали у всех животных через 1 час, 3, 7, 24 и 48 часов после введения дозы. Образцы крови центрифугировали и получали образцы плазмы крови. Полученные образцы плазмы крови переносили в одну полипропиленовую пробирку и замораживали при -80°C. Каждый образец анализировали для определения концентраций IgG.IL2D49A.H1 в плазме крови с применением трех различных способов, адаптированных для платформы Gygos: 1) иммобилизация и обнаружение на основе IL2, 2) иммобилизация на основе IL2 и обнаружение на основе hFc, и 3) иммобилизация и обнаружение на основе hFc.

Каждый образец анализировали в двух повторностях, при этом для каждого из дублирующих анализов требовалось 5 мкл образца, который был разбавлен 1:20. В анализе Gygos IL-2/IL-2 применяли иммобилизованное козьё биотинилированное антитело к человеческому IL-2 (R&D Systems BAF202) и обнаруживали с помощью

антитела к человеческому IL-2, конъюгированного с Alexa 647, клон MQ1-17H12 (Biolegend 500315). Для обнаружения IL-2/Fc применяют иммобилизованное козье биотинилированное антитело к человеческому IL-2 (R&D Systems BAF202), и для выявления – козье антитело к человеческому IgG, Fc-специфичное, конъюгированное с Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch 109-605-098). Для анализа человеческого Fc/Fc применяли иммобилизованное козье биотинилированное антитело к человеческому IgG, Fc-специфичное (Jackson ImmunoResearch, № 109-065-098). На стадии обнаружения применяли козье антитело к человеческому IgG, Fcγ-специфичное, конъюгированное с Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch, № 109-605-098). Все иммунологические анализы проводили с применением Gyrolab Bioaffy200® с Gyros CD-200s. Предел количественного определения (LOQ) в этой мышинной модели составляет 48 часов, как показано на фигуре 13А. Данное сравнивают с Proleukin® и слитым белком IL2-Fc на фигуре 13В. Этот график показывает, что LOQ выше в случае белков на основе антитела с привитым цитокином, таких как IgG.IL2D49.H1.

Пример 13. Определение диапазона доз у предиабетических мышей NOD

[00250] IgG.IL2D49A.H1 продемонстрировал обеспечение превосходство в размножении Treg относительно CD4 Tcon и CD8 эффекторных T-клеток по сравнению с Proleukin® в тех же эквимольных концентрациях. Нежелательные явления, такие как смертность, были обнаружены в группах с самым высоким уровнем Proleukin®, и смертность не наблюдалась у мышей, получавших любую дозу IgG.IL2D49.H1.

[00251] Предиабетическим самкам NOD вводили эквимольно низкие дозы IL-2 (3x/неделя) и IgG.IL2D49A.H1 (1x/неделя) путем внутрибрюшинной инъекции. По три мыши в группе умерщвляли через 8 дней после первой дозы и собирали селезенки. Селезенки обрабатывали с получением суспензий отдельных клеток и промывали в RPMI (10% FBS). Собирали кровь, эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов и подсчитывали клетки в отношении количества и жизнеспособности клеток. Окрашивание для FACS осуществляли согласно стандартным протоколам с помощью буфера для FACS (1xPBS+0,5% BSA+0,05% азид натрия). Клетки окрашивали поверхностными антителами, а затем фиксировали/пермеабелизовали и окрашивали на FoxP3 в соответствии с набором для окрашивания с антителом к мышинному/крысиному FoxP3, конъюгированным с PE (Ebioscience, № 72-5775). Клетки анализировали на BD LSR Fortessa®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®. Соотношения основаны на относительном количестве клеток, рассчитанном для каждой селезенки. Эти данные представлены на фигуре 14. В таблице представлен формат диапазона доз для белков на основе антитела с привитым цитокином. Также продемонстрировано, что IgG.IL2D49A.H1 обладал более высоким терапевтическим индексом, чем Proleukin®, так как доза хорошо переносилась в более широком диапазоне. В отличие от этого, введение Proleukin® в более высоких дозах вызывало заболеваемость и смертность у мышей. Самая высокая доза Proleukin® вызывала достаточную заболеваемость и смертность, так что обработку при этой дозе пришлось прекратить.

Пример 14. Передача сигнала STAT5 в PBMC человека

[00252] IgG.IL2D49A.H1 был избирательным в отношении активации Treg по сравнению с Tcon и NK в PBMC здоровых доноров–людей, а также в PBMC от доноров с аутоиммунными нарушениями. Интенсивность передачи сигнала STAT5 была снижена в Tcon, но не в Treg после обработки *in vitro* с применением IgG.IL2D49.H1. Человеческие PBMC от здоровых пациентов и пациентов с аутоиммунными нарушениями (Немасаре Сорг) помещали в бессывороточную тестовую среду и добавляли в каждую лунку. Добавляли в лунки IgG.IL2D49A.H1 и инкубировали в течение 20 мин. при 37°C. Через 20 минут клетки фиксировали, окрашивали в отношении поверхностных маркеров, пермеабелизировали и окрашивали антителом к STAT5 (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки анализировали на BD LSR Fortessa®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®. Данные на фигуре 15А показывают, что обработка с помощью IgG.IL2D49A.H1 PBMC, взятых у пациентов с витилиго, показала очень низкую активацию NK–клеток, CD4 Tcon или CD8 эффекторных Т–клеток при сохранении активности Treg. Этот результат также наблюдался в PBMC, взятых у пациентов с SLE и болезнью Хашимото (данные не представлены). На фигуре 15В показано, что PBMC, взятые у пациентов с диабетом 1 типа (T1D) и обработанные с помощью IgG.IL2D49A.H1 и Proleukin®, обладали в значительной степени сниженной активностью pSTAT5 на NK–клетках, CD8 эффекторных Т–клетках или CD4 Tcon–клетках. Поскольку обработка с помощью IgG.IL2D49A.H1 была эффективной в нормальных PBMC и хорошо переносилось в PBMC, взятых у пациентов с T1D, это указывает на то, что белки на основе антитела с цитокином будут применимы при лечении T1D, даже если пациент получает инсулинотерапию. Это указывает на то, что IgG.IL2D49A.H1 будет хорошо переноситься пациентами с этими иммунными нарушениями и будет обеспечивать эффективную борьбу с этими иммунными нарушениями.

Пример 15. Связывание белков на основе антитела с привитым цитокином

[00253] Последовательности IL2, содержащие мутеины (SEQ ID NO:4 или 6), вставляли в CDR–петли остова, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Белки на основе антитела с привитым цитокином получали с применением разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовали в клинических условиях, а также последовательностей антител зародышевого типа. Антиген одного из применяемых антител представлял собой RSV. Для определения того, приводило ли прививание IL2 на CDR данного антитела к снижению или устранению связывания с RSV, проводили анализ ELISA в отношении белков RSV в PBS–буфере либо в карбонатном буфере. Как показано на фигуре 16, на это, по–видимому, влияло то, какая CDR была выбрана для прививания IL2. Например, IgG.IL2D49A.H1 характеризуется связыванием с RSV, аналогичным таковому у непривитого (немодифицированного) исходного антитела. В отличие от этого, прививание IL2 на CDR3 легкой цепи (CDR–L3) или CDR–H3 приводило к снижению связывания. Как и ожидалось, прививание IL2 на нерелевантное

антитело (Xolair) приводит к отсутствию связывания. Это демонстрирует то, что белки на основе антитела с привитым цитокином могут сохранять связывание с исходной мишенью остова антитела, или данное связывание может снижаться.

Пример 16. Размножение Treg у приматов, отличных от человека

[00254] IgG.IL2D49A.H1 вводили яванским макакам в двух однократных возрастающих подкожных дозах, которые давали с 4-недельным интервалом без введения, чередуясь между 2 группами доз (3М/группа). За этим следовала 2-недельная фаза многократной дозы в двух группах (3М/группа), которые получали 6 подкожных доз (через день в течение двух недель) буфера или 5 мг/кг IgG.IL2D49A.H1. Изменения в популяциях лимфоцитов, оцененные с помощью проточной цитометрии (иммунофенотипирование) из "фазы однократной дозы" (две дозы с интервалом 29 дней), показаны на фигуре 17. При дозах 125 и 375 мкг/кг наблюдалось увеличение значений абсолютного количества Treg в 3–4 раза и до 5,5 раз без какого-либо видимого эффекта в отношении Tcon или NK-клеток. Максимальное размножение Treg наблюдалось на 4-й день, а к 10-му дню количество Treg возвращалось к исходному уровню. IgG.IL2D49A.H1 был безопасным и хорошо переносимым, и не было никаких случаев смертности, клинических признаков или изменений в массе тела, потреблении пищи, уровнях цитокинов или клинической патологии. Кроме того, в исследовании не наблюдалось сердечно-сосудистых эффектов (ЭКГ или артериальное давление) после однократной дозы до 2,4 мг/кг или многократного введения доз через день в течение двух недель при 5 мг/кг. Не было никаких показаний трансудации или других связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями наблюдений.

Пример 17. Риск эффектов антител к лекарственному средству

[00255] Чтобы определить риск эффектов антител к лекарственному средству в отношении профиля избирательности GFTX3b_IL-2-H1-D49A, проводили анализы передачи сигнала в присутствии Fc-сшивающего антитела в зависимости от дозы.

[00256] РВМС человека ресуспендировали в полной среде RPMI при 3×10^6 клеток/мл, высевали при 3×10^5 клеток/лунку (100 мкл) и оставляли на 2 ч. На отдельном 96-луночном планшете получали максимальные концентрации Proleukin, GFTX3b_IL-2-H1-D49A и GFTX3b_IL-2-H1-D49A+молярный избыток козьего F(ab')₂ к человеческому IgG, козьего F(ab')₂ к человеческому IgG отдельно (Southern Biotech, кат. № 2042-01, партия № J1715-PI77) и получали кривые титрования при 2X конечной концентрации в среде. Для всех условий максимальная концентрация эквивалента IL2 составляла 200 нМ. Получали максимальную концентрацию и получали 10-точечную кривую разведения ниже максимальной концентрации (с включающим разведением 1:2) для Proleukin и GFTX3b_IL-2-H1-D49A. Кроме того, получали кривые титрования с максимальной концентрацией GFTX3b_IL-2-H1-D49A при 200 нМ (эквивалента IL-2) и антитела к человеческому IgG при 0,5x, 1x, 2,5x, 5x и 10x GFTX3b_IL-2-H1-D49A на основе молярности. Получали 10-точечную кривую разведения 1:10 ниже максимальной концентрации для каждого условия. Получали титры антитело к человеческому

IgG+GFTX3b_IL-2-N1-D49A и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре перед добавлением в PBMC.

[00257] Подготовленные условия (или только среду) добавляли в PBMC до конечного объема 100 мкл/лунка. PBMC стимулировали в течение 25 мин. при 37°C, 5% CO₂. После инкубации клетки быстро фиксировали, обрабатывали для штрих-кодирования, окрашивали на поверхности, пермеабелизировали и окрашивали в отношении pSTAT5 и Foxp3. Клетки считывали на Cytof и данные анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo. Повышение концентраций сшивающего антитела к человеческому IgG не влияет на избирательные виды активности GFTX3b_IL-2-N1-D49A (фигура 18).

Пример 18. Избирательность передачи сигнала сохраняется у пациентов с разными аутоиммунными нарушениями

[00258] Человеческие PBMC от пациентов с аутоиммунными нарушениями (Nemasare Corp) помещали в бессывороточную тестовую среду и добавляли в каждую лунку. На отдельном планшете получали максимальные концентрации либо Proleukin, либо GFTX3b_IL-2-N1-D49A, и получали кривые титрования при 4х конечной концентрации в среде. Получали максимальную концентрацию (200 нМ эквивалента IL-2) и 4-точечную кривую разведения (или 10-точечную для AD) ниже максимальной концентрации либо для GFTX3b_IL-2-N1-D49A, либо для нативного человеческого IL-2 (Proleukin). Полученные условия добавляли в лунки и инкубировали в течение 25 мин. при 37°C. Через 25 мин. клетки фиксировали, окрашивали в отношении поверхностных маркеров, пермеабелизовали и окрашивали внутриклеточными антителами (pSTAT5, Foxp3) для отбора на Cytof (все антитела от Fluidigm) в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с применением программного обеспечения FlowJo.

[00259] GFTX3b_IL-2-N1-D49A был избирательным в отношении T_{reg} по сравнению с CD4 T_{con} и CD8 T_{eff} при нескольких исследуемых аутоиммунных показателях, в том числе при диабете 1 типа, SLE, витилиго и атопическом дерматите (фигура 19). Интенсивность передачи сигнала IL-2R была снижена в T_{con} и T_{eff}, но не в T_{reg}, in vitro.

Пример 19. Избирательность передачи сигнала в Treg при сравнении с эффекторными T-клетками в человеческих PBMC

[00260] Клетки PBMC помещали в среду RPMI и добавляли в каждую лунку. В лунки добавляли либо D49A с привитым IL-2, либо нативный человеческий IL-2 и инкубировали в течение 25 мин. при 37°C. Через 25 мин. клетки фиксировали 1,6% формальдегидом, промывали и окрашивали в отношении поверхностных маркеров. Спустя 30 мин. нахождения при комнатной температуре образцы промывали, а ресуспендированные клеточные осадки пермеабелизировали с помощью метанола при -20°C, промывали и окрашивали в отношении STAT5 и ДНК-интеркаляторов. Клетки пропускали на Cytof и данные анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo.

[00261] GFTX3b_IL-2-D49A продемонстрировал высокую специфичность по

сравнению с Proleukin в отношении передачи сигнала на Treg по сравнению с T-эффекторами в эквимольных концентрациях IL-2 (фигура 20).

[00262] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в сущность и область действия настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, номера доступа последовательностей, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:
 - (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области, определяющие комплементарность (CDR), HCDR1, HCDR2, HCDR3; и
 - (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую LCDR1, LCDR2, LCDR3;и
 - (с) молекулу интерлейкина 2 (IL2), привитую на CDR VH или VL.
2. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 1, где молекула IL2 привита на CDR тяжелой цепи.
3. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 2, где CDR тяжелой цепи выбрана из области 1, определяющей комплементарность (HCDR1), области 2, определяющей комплементарность (HCDR2), и области 3, определяющей комплементарность (HCDR3).
4. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 3, где молекула IL2 привита на HCDR1.
5. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 1, где молекула IL2 привита на CDR легкой цепи.
6. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 5, где CDR легкой цепи выбрана из области 1, определяющей комплементарность (LCDR1), области 2, определяющей комплементарность (LCDR2), и области 3, определяющей комплементарность (LCDR3).
7. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–6, где молекула IL2 содержит мутацию, которая обеспечивает снижение аффинности молекулы IL2 в отношении низкоаффинного рецептора IL2.
8. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–7, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию Treg-клеток в большей степени, чем нативный IL2 или Proleukin®.
9. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–8, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию CD8 эффекторных T-клеток в меньшей степени, чем нативный IL2 или Proleukin®.
10. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–9, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется более длительным периодом полужизни, чем нативный IL2 или Proleukin®.
11. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–10, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:4.
12. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–10, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:6.
13. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–12, дополнительно содержащий тяжелую цепь антитела класса IgG.
14. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 13, где тяжелая цепь

антитела класса IgG выбрана из IgG1, IgG2 или IgG4.

15. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–14, где специфичность связывания CDR с мишенью снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% благодаря привитой молекуле IL2.

16. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–15, где специфичность связывания CDR с мишенью сохраняется на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% в присутствии привитой молекулы IL2.

17. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–16, где специфичность связывания CDR отличается от специфичности связывания молекулы IL2.

18. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–17, где специфичность связывания CDR направлена на антиген, отличный от человеческого.

19. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 18, где антиген, отличный от человеческого, представляет собой вирус.

20. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 19, где вирус представляет собой респираторно–синцитиальный вирус (RSV).

21. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 20, где RSV выбран из RSV подгруппы А и RSV подгруппы В.

22. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–21, где часть белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющая собой остов антитела, является гуманизированной или человеческой.

23. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 17, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:18, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:30, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:31 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:32;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:43, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:44, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:45; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:56, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:57 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:58;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:69, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:70, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:71; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:82, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:83 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:84; или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:95, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:96, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:97; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:108, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:109 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:110.

24. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:20, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 33;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 46, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 59;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:72, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO:85; или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:98, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO:111.

25. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–24, дополнительно содержащий модифицированную Fc–область, соответствующую сниженной эффекторной функции.

26. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 25, где модифицированная Fc–область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A.

27. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 26, где модифицированная Fc–область содержит комбинацию мутаций, выбранную из одной или нескольких из D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A и P329G/L234A/L235A.

28. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO: 17, HCDR2 под SEQ ID NO:18, HCDR3 под SEQ ID NO:19, LCDR1 под SEQ ID NO:30, LCDR2 под SEQ ID NO:31, LCDR3 под SEQ ID NO:32, модифицированную Fc–область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует размножение НК–клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

29. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO:43, HCDR2 под SEQ ID NO:44, HCDR3 под SEQ ID NO:45, LCDR1 под SEQ ID NO:56, LCDR2 под SEQ ID NO:57, LCDR3 под SEQ ID NO:58, модифицированную Fc–область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует размножение НК–клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

30. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO:69, HCDR2 под SEQ ID NO:70, HCDR3 под SEQ ID NO:71, LCDR1 под SEQ ID NO:82, LCDR2 под SEQ ID NO:83, LCDR3 под SEQ ID NO:84, модифицированную Fc–область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует размножение НК–клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

31. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO:95, HCDR2 под SEQ ID NO:96, HCDR3 под SEQ ID NO:97, LCDR1 под SEQ ID NO:108, LCDR2 под SEQ ID NO:109, LCDR3 под SEQ ID NO:110, модифицированную Fc–область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует размножение НК–клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

32. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

- (i) тяжелую цепь под SEQ ID NO:23 и легкую цепь под SEQ ID NO:36;
- (ii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:49 и легкую цепь под SEQ ID NO:62;
- (iii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:75 и легкую цепь под SEQ ID NO:88; или
- (iv) тяжелую цепь под SEQ ID NO:101 и легкую цепь под SEQ ID NO:114.

33. Рекомбинантная клетка–хозяин, подходящая для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащая нуклеиновые кислоты по п. 32, кодирующие полипептидные тяжелые и легкие цепи белка и необязательно сигнал секреции.

34. Рекомбинантная клетка–хозяин по п. 33, которая относится к линии клеток млекопитающего.

35. Рекомбинантная клетка–хозяин по п. 34, где линия клеток млекопитающего представляет собой линию клеток CHO.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–31 и фармацевтически приемлемый носитель.

37. Способ лечения иммунного нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–31 или фармацевтической композиции по п. 36.

38. Способ по п. 37, где иммунное нарушение выбрано из группы, состоящей из: диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (cGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV–индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома.

39. Способ по п. 37 или п. 38, где белок на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

40. Способ по п. 39, где терапевтическое средство представляет собой другой белок на основе антитела с привитым цитокином.

41. Способ обеспечения размножения Treg–клеток в организме пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту белка на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1–31 или фармацевтической композиции по п. 36.

42. Способ по п. 41, где Treg–клетки размножаются, а CD8 эффекторные T–клетки не размножаются.

43. Способ по п. 41 или п. 42, где Treg–клетки размножаются, а NK–клетки не размножаются.

44. Применение белка на основе антитела с привитым цитокином в лечении иммунного нарушения, содержащего:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 17, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:18, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:19, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:30, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:31 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 под SEQ ID NO:43, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:44, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:45; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 под SEQ ID NO:56, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:57 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:58,

в лечении иммунного нарушения.

45. Применение по п. 44, где иммунное нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета 1 типа, системной красной волчанки, витилиго, хронической болезни "трансплантат против хозяина" (сGvHD), профилактики острой болезни "трансплантат против хозяина" (pGvHD), HIV-индуцированного васкулита, очаговой алопеции, системной склеродермии, очаговой склеродермии и первичного антифосфолипидного синдрома.

46. Применение по п. 44 или п. 45, где белок на основе антитела с привитым цитокином вводится в комбинации с другим терапевтическим средством.

По доверенности

ФИГ.1

Название	Выход (мг/л)	Агрегация (%)	Tm	LAL (EU/мг)	Формат	Treg (кратность размн.)	NK (кратность размн.)	CD8 Teff (кратность размн.)	IL-2Rαβ γ (EC ₅₀ отн. IL-2)	IL-2Rβγ (EC ₅₀ отн. IL-2)
Proleukin rhIL-2	N/A	N/A	N/A	N/A	Непривитый	1,5	2,4	1,9	1	1
IgG.IL2D49A.H1	4	0,1	70,4/72,9	1,11	DZ0A в H1	1,2	1,3	1,2	40	4400
GFTX3b-IL3-H1	9,6	1,8	68,6	0,95	H1	1,5	0,8	2,1	1	0,3
GFTX3b-IL3-H2	6,6	1,6	67,4	0,76	H2	0,9	0,9	2,2	6	1
GFTX3b-IL3-H3	6,8	2,3	67	0,96	H3	1,1	1,2	1,3	250	3400
GFTX3b-IL3-L1	3,4	1,9	63,7/76,5	1,04	L1	0,9	0,5	2	1	0,5
GFTX3b-IL3-L2	-	-	-	-	L2	-	-	-	-	-
GFTX3b-IL3-L3	3,6	3,6	69,3	0,98	L3	1,5	0,7	4,1	4	4
GFTX3b_LALA-IL2-nH1	7,7	3,2	64,9	0,64	Смещение к N-концу в H1	1,6	1	3,3	0,3	2
GFTX3b_LALA-IL2-cH1	8,9	1,6	63,4/67	0,15	Смещение к C-концу в H1	1,7	1	2,2	1	70
GFTX3b_LALA-IL2-nH2	-	-	-	-	Смещение к N-концу в H2	-	-	-	-	-
GFTX3b_LALA-IL2-cH2	4,2	1,1	67,8	0,69	Смещение к C-концу в H2	1,4	0,6	3,1	0,1	3

ФИГ.2

Слитый белок на основе антитела и цитокина демонстрирует большую активность на Treg-клетках и увеличенный период полужизни

Конструкция	Стимуляция IL-2R (фосфорилирование STAT5 в первичных клетках человека)			PK (увели- чение T1/2)	PD (клеточное размножение у мышей in vivo)		
	Treg	Teff	NK		Treg	Teff	NK
rhIL-2 (Proleukin®)	++	+	+	-	+	+	+
IgG.IL2D49A.H1	++	-	-	+	+++	-	-
GFTX3b_IL2-L3	+	+	-	+	++	+/-	-

ФИГ.3

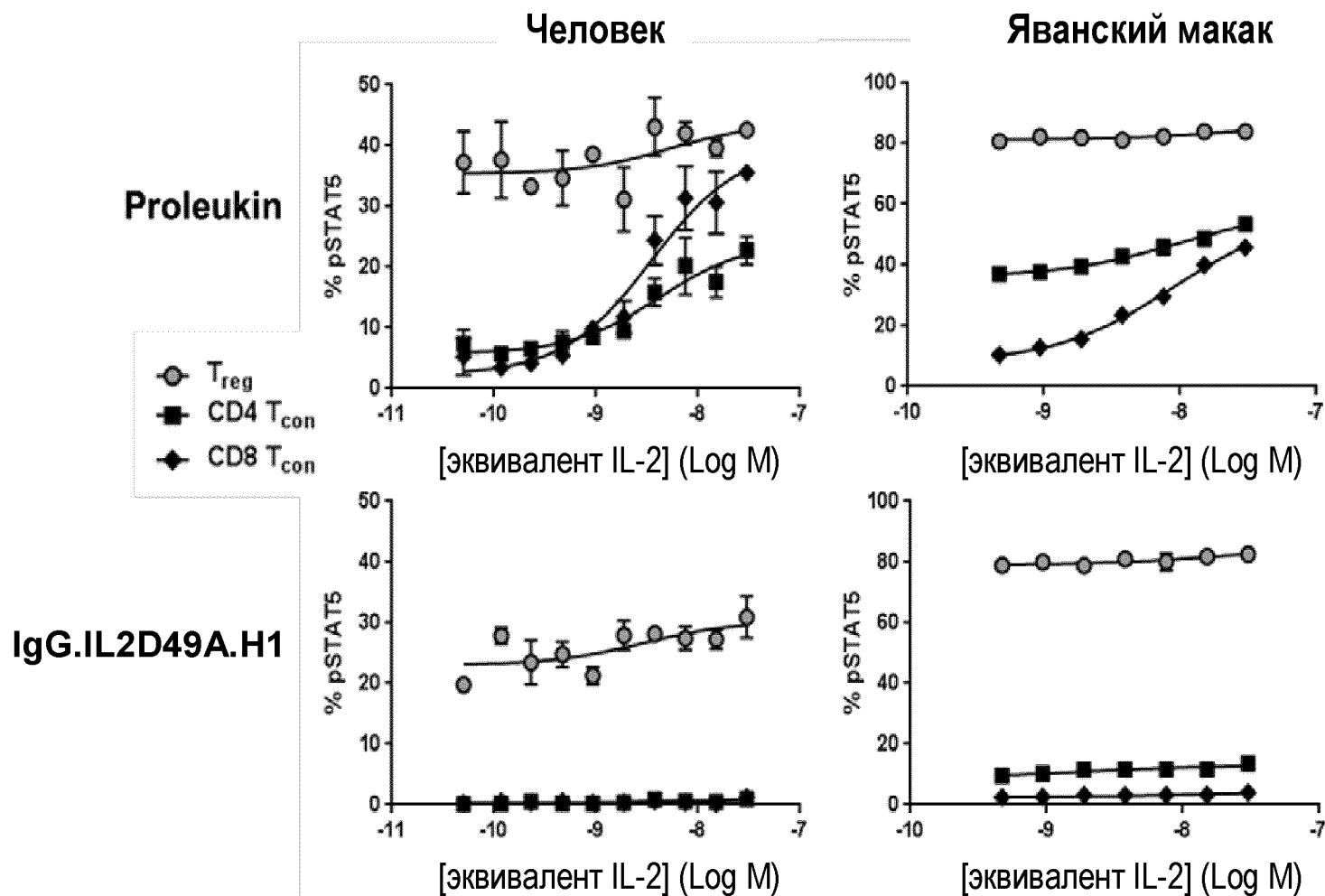
Слитый белок на основе антитела и цитокина демонстрирует большую активность на Treg-клетках

*Доза слитого белка на основе антитела и цитокина 7 мг/кг по сравнению с эквимольной дозой 0.6 мг/кг IL2

Конструкция	Доза*	Кратность T _{reg}	Кратность NK	Кратность CD8 _{eff}	Кратность CD4 _{eff}	T _{reg} : NK	T _{reg} : CD8 _{eff}	T _{reg} : CD4 _{eff}
IgG.IL2D49A.H1	7 мг/кг	5.9	0.7	0.7	2.1	9.4	11.7	2.9
GFTX3b_IL2-H1-D113A	7 мг/кг	1.7	0.7	2.9	1.3	2.0	1.0	1.3
GFTX3b_IL2-L3	7 мг/кг	1.7	0.7	3.2	0.9	0.7	0.6	2.0
GFTX3b_IL2-H2	7 мг/кг	1.3	0.8	1.2	1.0	1.6	1.4	1.3
GFTX3b_IL2-H1	7 мг/кг	1.2	0.9	1.6	1.2	1.6	1.2	1.1
IL-2 (Proleukin)	0.6 мг/кг	1.0	0.7	0.6	0.9	1.6	1.6	1.1
IL-2 (Proleukin)	3 мг/кг	1.4	1.4	2.8	2.2	1.0	0.5	1.0

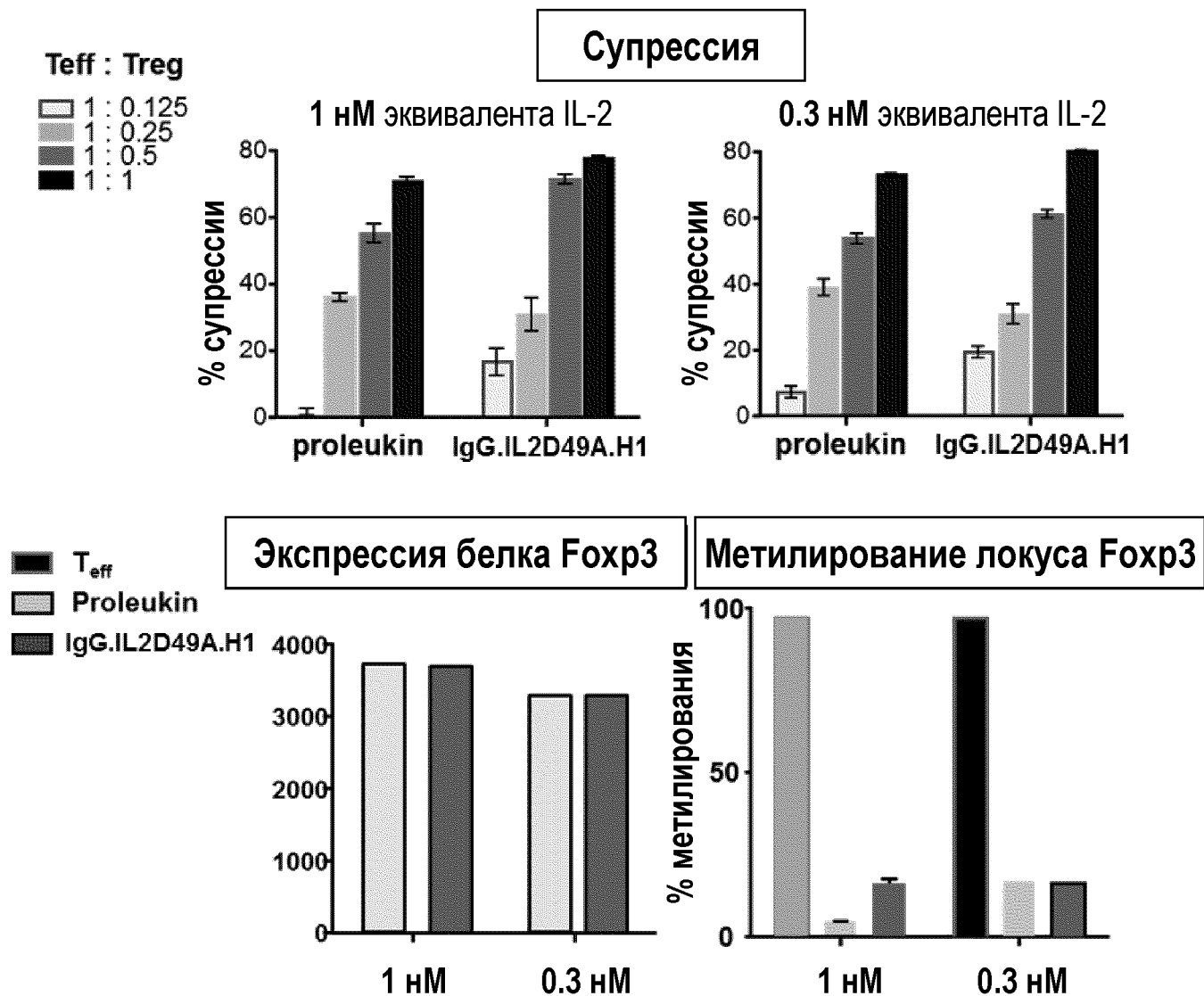
ФИГ.4

Интенсивность передачи сигнала IL-2R снижена на CD4 Tcon и CD8 Teff, но не на Treg in vitro



ФИГ.5

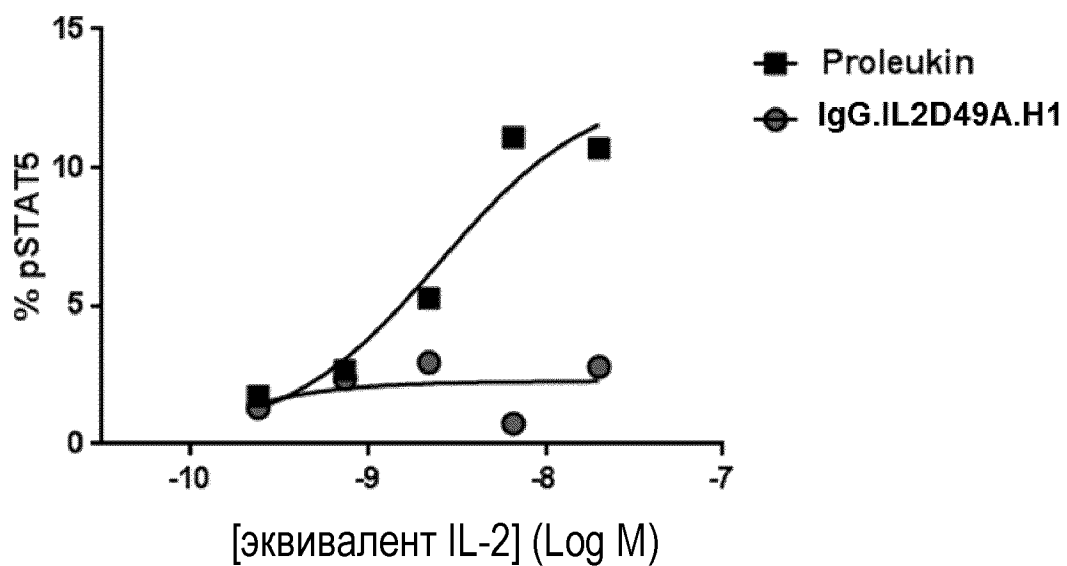
IgG.IL2D49A.H1 обеспечивает размножение функциональных и стабильных Treg in vitro



ФИГ.6

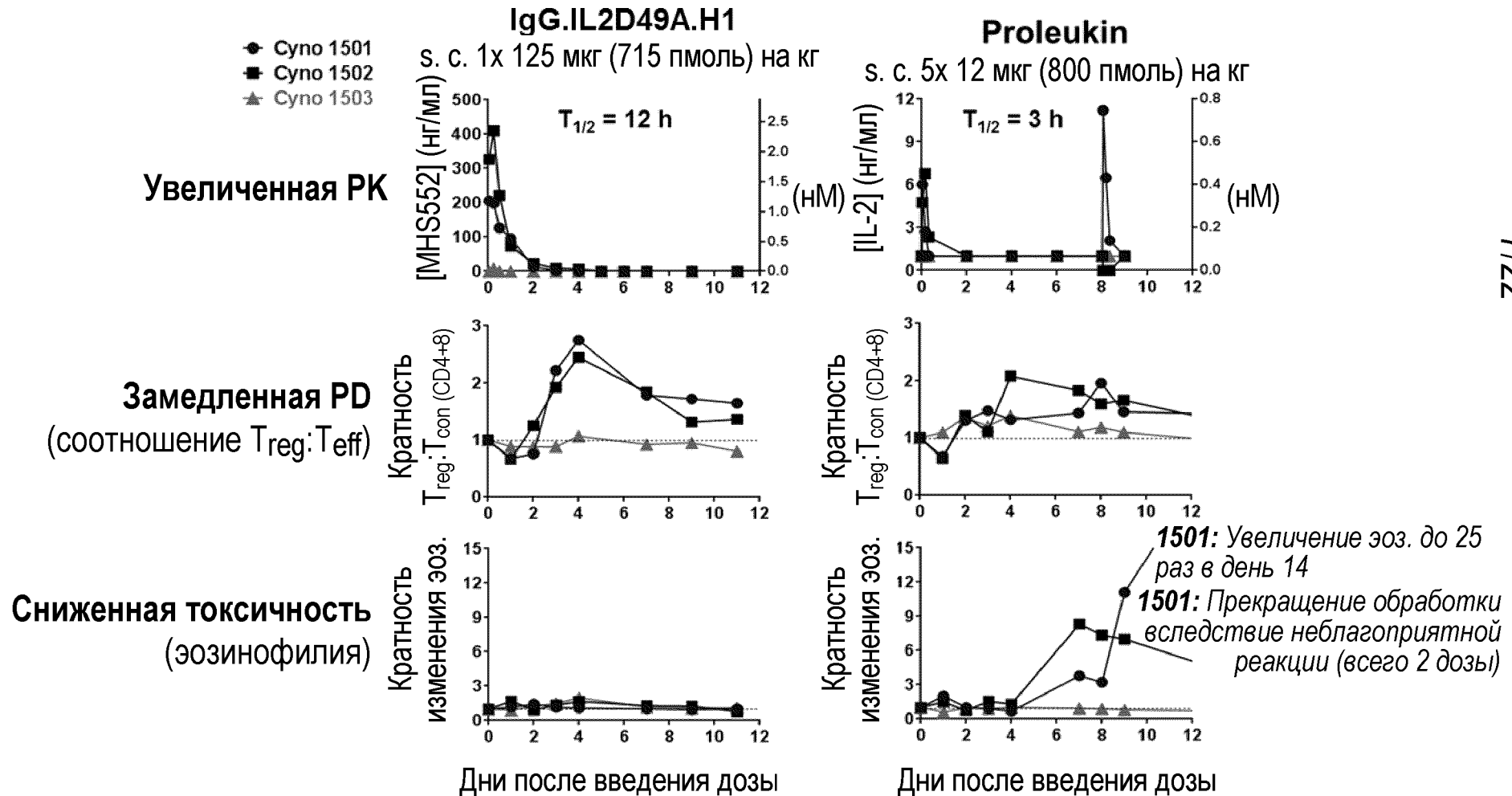
Интенсивность передачи сигнала IL-2R снижена в человеческих NK
in vitro при применении IgG.IL2D49A.H1

Активность на IL-2R в человеческих NK-клетках



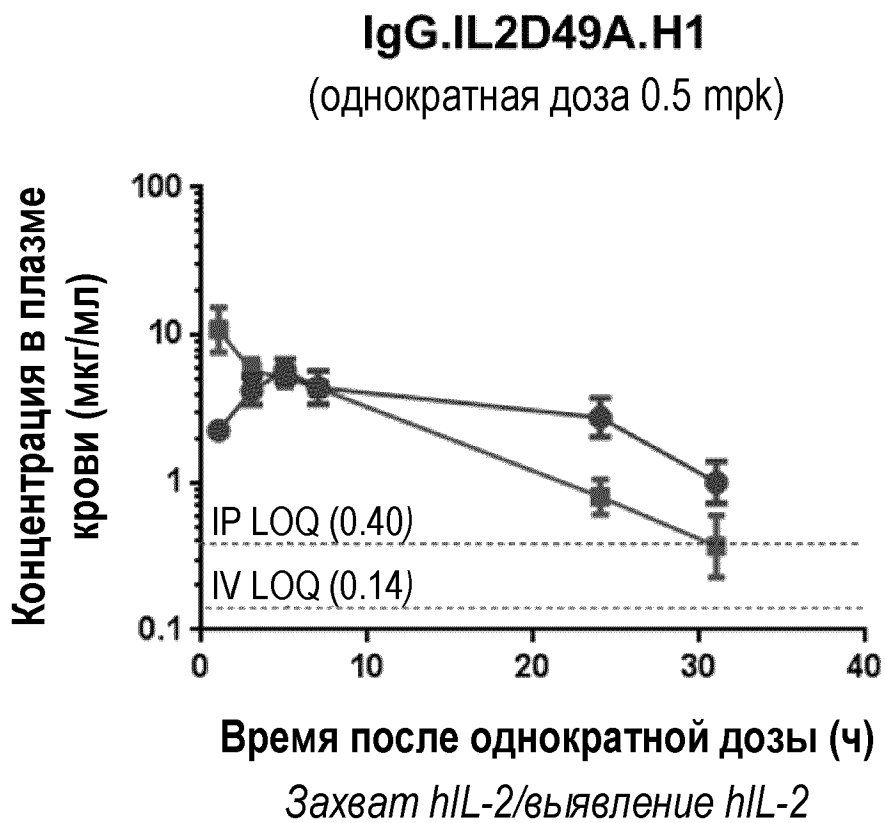
ФИГ.7

Оценка фармакокинетики (PK), фармакодинамики (PD) и токсикологических эффектов IgG.IL2D49A.H1 при введении подкожно самкам яванского макака



ФИГ.8

Белок на основе антитела с привитым цитокином демонстрирует период полужизни 12-14 часов по сравнению с периодом полужизни IL2 4 часа

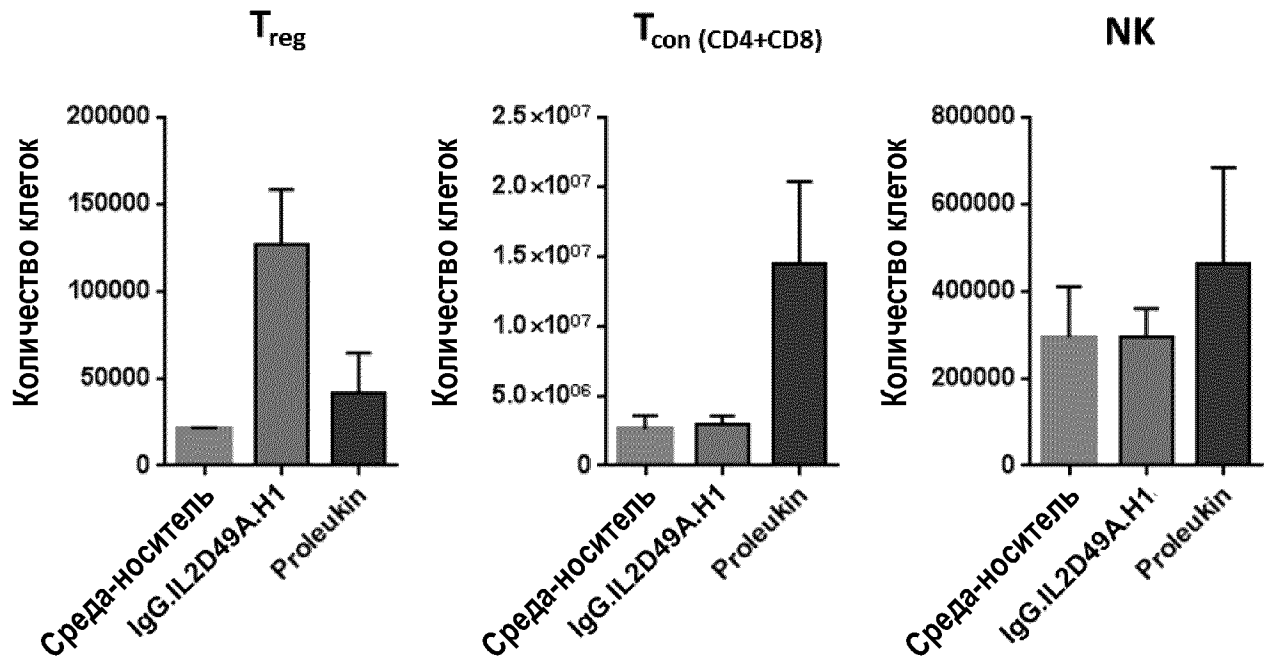


ФИГ.9

Размножаются человеческие T_{reg} , а не T_{eff} или NK у мышей с ксено-GvHD

Модель GVDH

■ Среда-носитель	5x еженедельно
■ IgG.IL2D49A.H1	1x еженедельно при 50 мкг/кг = 0.6 нмоль IL-2 на кг
■ Proleukin	5x еженедельно при эквимольном количестве прививки IL-2D49A.H1

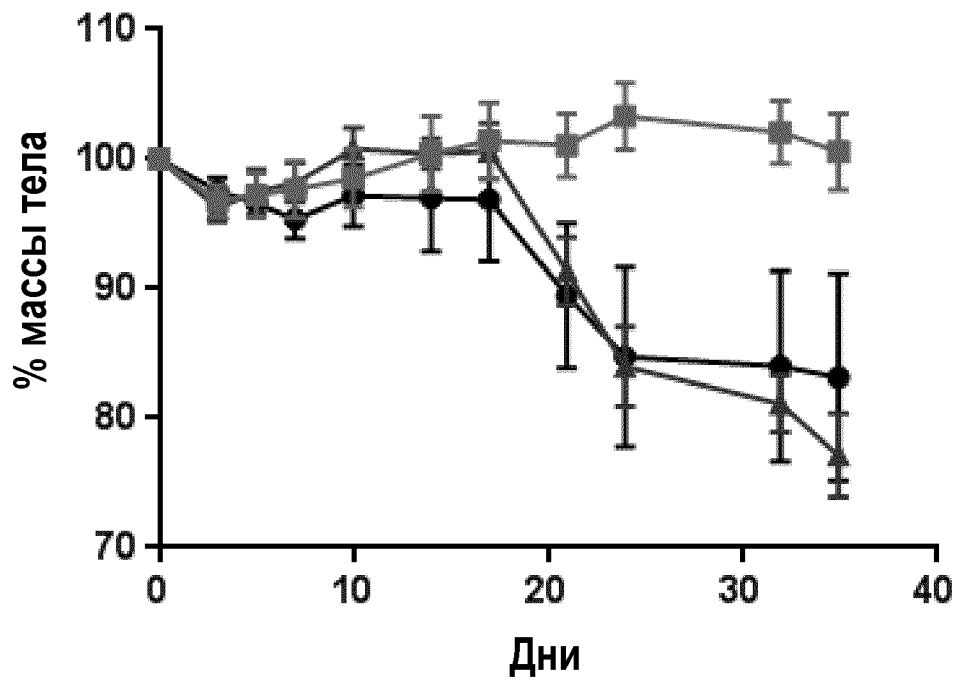


ФИГ.10

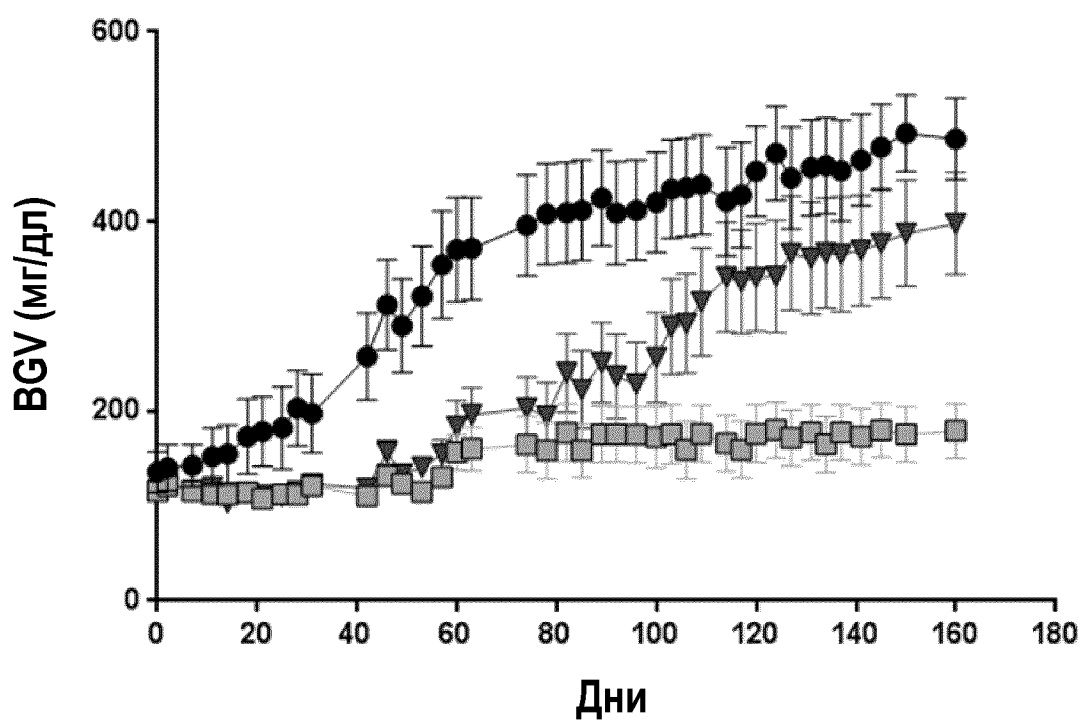
IgG.IL2D49A.H1 снижает интенсивность проявления потери массы тела у мышей с ксено-GvHD

Потеря массы тела при GvHD

- **IgG.IL2D49A.H1** 1x еженедельно при 50 мкг/кг = 0.6 нмоль IL-2-экв.
- ▲ **Proleukin** 5x еженедельно при эквимоллярном кол-ве прививки IL-2D49A
- **Среда-носитель** 5x еженедельно



ФИГ.11

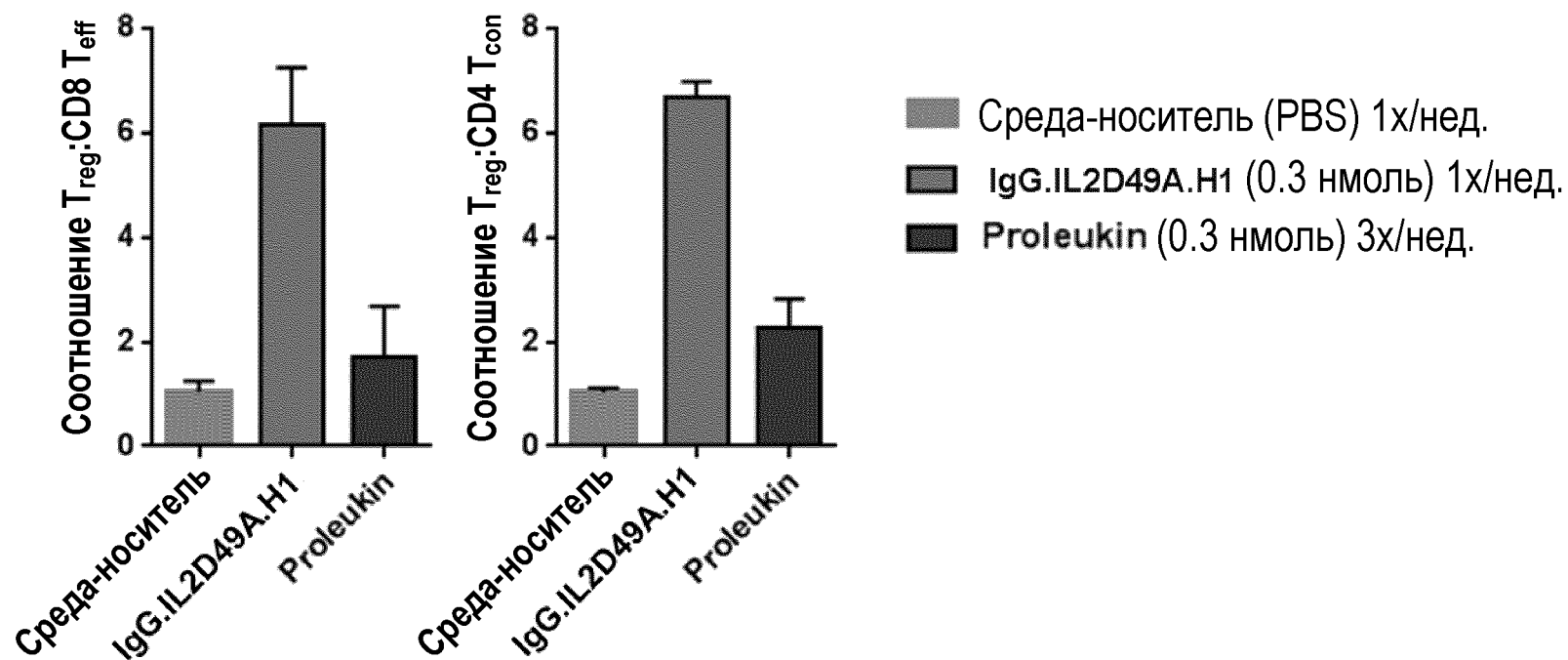
IgG.IL2D49A.H1 предупреждает развитие диабета 1 типа у мышей NOD**Значения уровня глюкозы в крови в течение времени**

- Среда-носитель (PBS) 1x/нед.
- IgG.IL2D49A.H1 (0.3 нмоль) 1x/нед.
- ▼ Proleukin (0.3 нмоль) 3x/нед.

ФИГ.12

IgG.IL2D49A.H1 по сравнению с Proleukin в низкой дозе у предиабетических мышей NOD

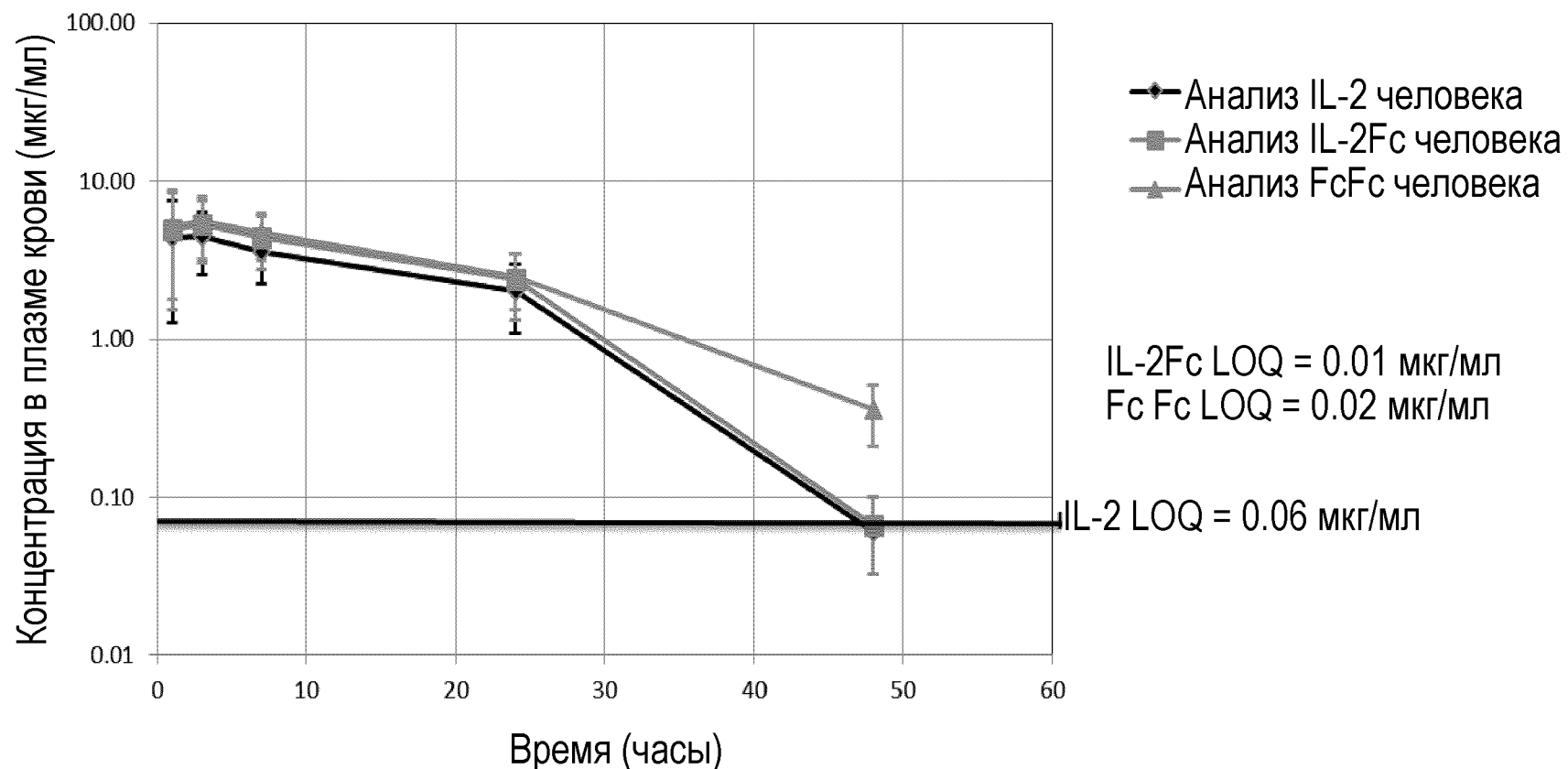
Популяции Т-клеток в селезенке, день 4



ФИГ.13А

Фармакокинетика эффективной дозы IgG.IL2D49A.H1 в мышинной модели NOD

Группа 2: 1.3 мг/кг IgG.IL2D49A.H1:
анализ Gyros



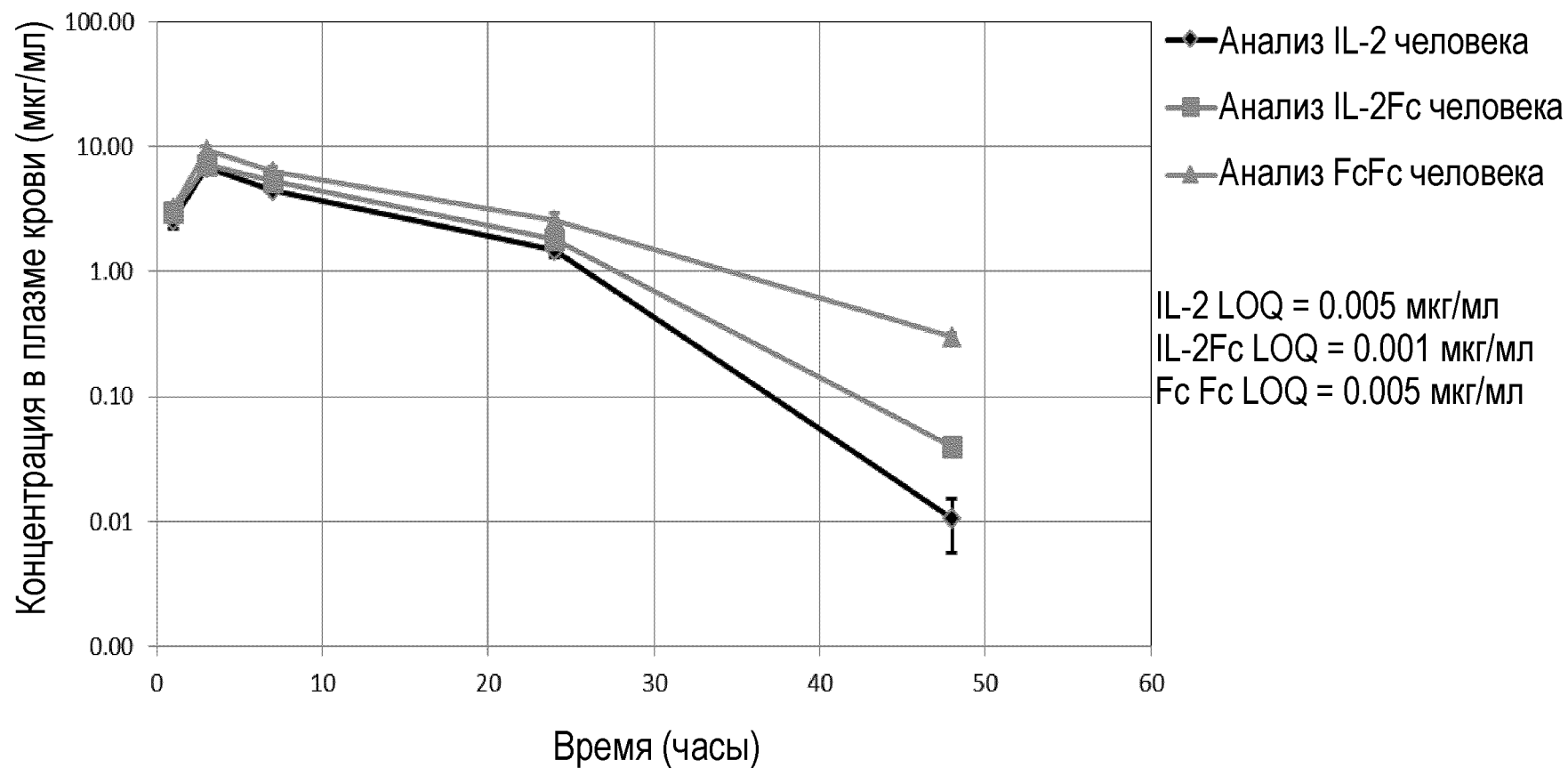
13/22

***Через 48 часов расчеты среднего значения и планок ошибки IL-2 включают результаты при LOQ. Значения, рассчитанные с помощью LOQ, могут быть на уровне или ниже LOQ.

ФИГ.13В

Фармакокинетика эффективной дозы IgG.IL2D49A.H1 в мышинной модели NOD

Группа 1: 0.43 мг/кг IgG.IL2D49A.H1:
анализ Gyros



***Во все моменты времени и при всех анализах среднее значение и планки ошибки основаны на 2 из 3 животных.

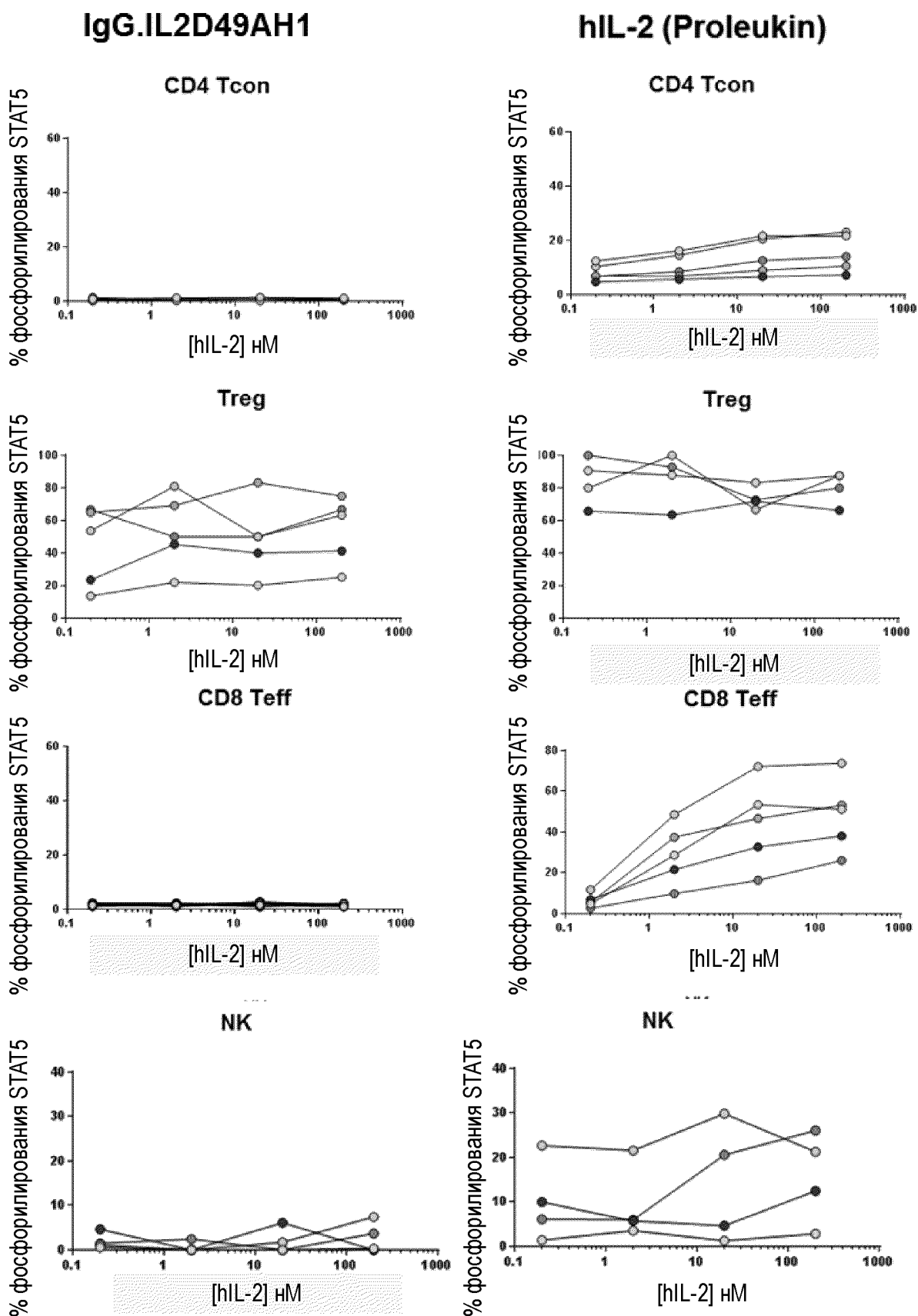
ФИГ.14

Данные по диапазону доз у предиабетических мышей NOD

Доза	IgG.II2D49A.H1 (селезенка, кровь)		Proleukin (селезенка, кровь)		Переносимость (смерть)
	Treg/CD4 Tcon	Treg/CD8Teff	Treg/CD4 Tcon	Treg/CD8Teff	
0.01	3, 2	2	1, 0.4	1	
0.03	1.10.45	1.4	0.9, 0.45	1.2	
0.1	1.25, 0.8	2	1, 0.5	1.1	
0.3	6	6	2	1	
1	3, 3,	2.5	1.5, 0.6	1.5	
3	10, 5	6	2, 1	2	Proleukin
9	10, 5	6	2, 1	2	Proleukin, все

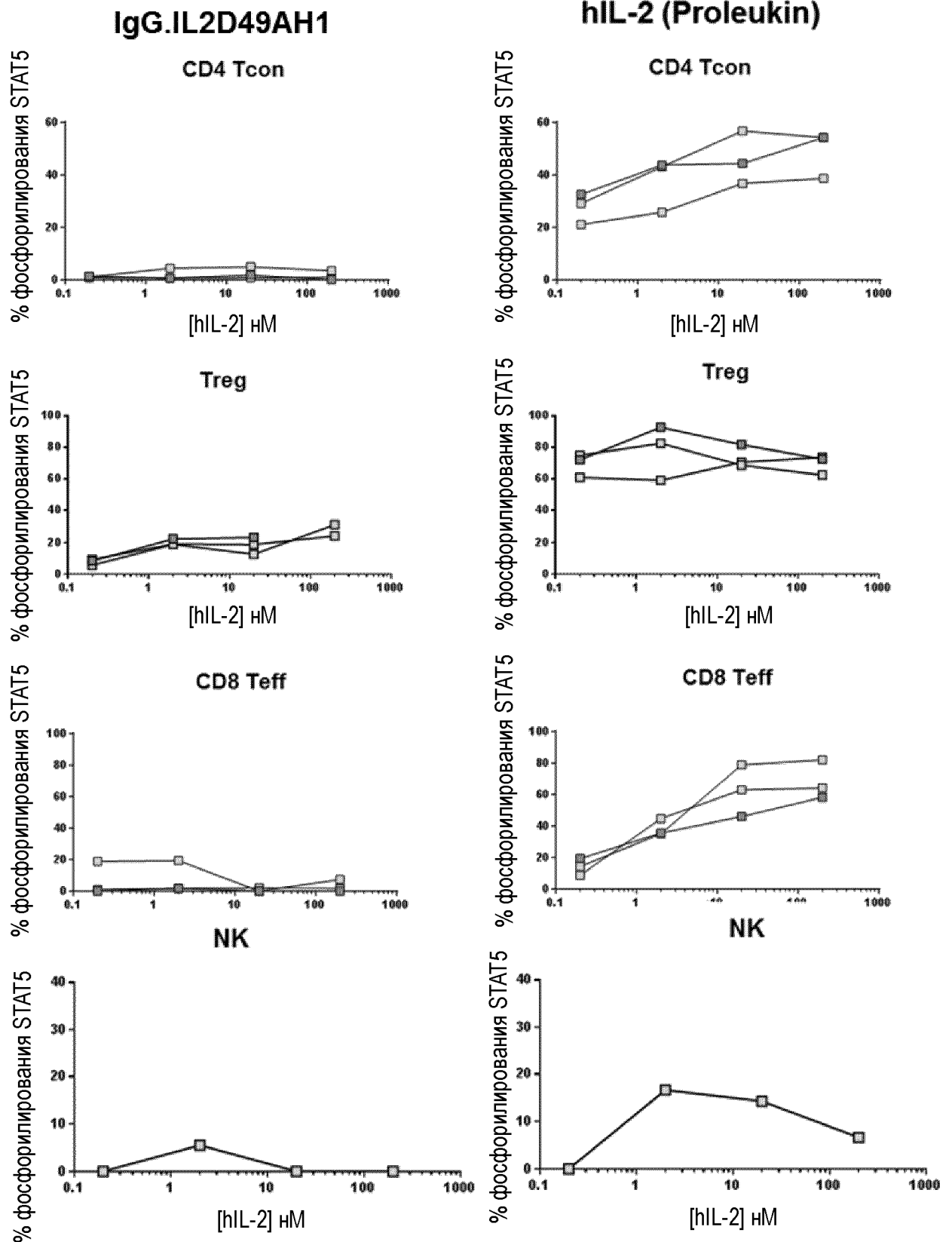
ФИГ.15А

Профили и передачи и сигнала с помощью IgG.IL2D49A.H1 и Proleukin® в PBMC пациентов с витилиго



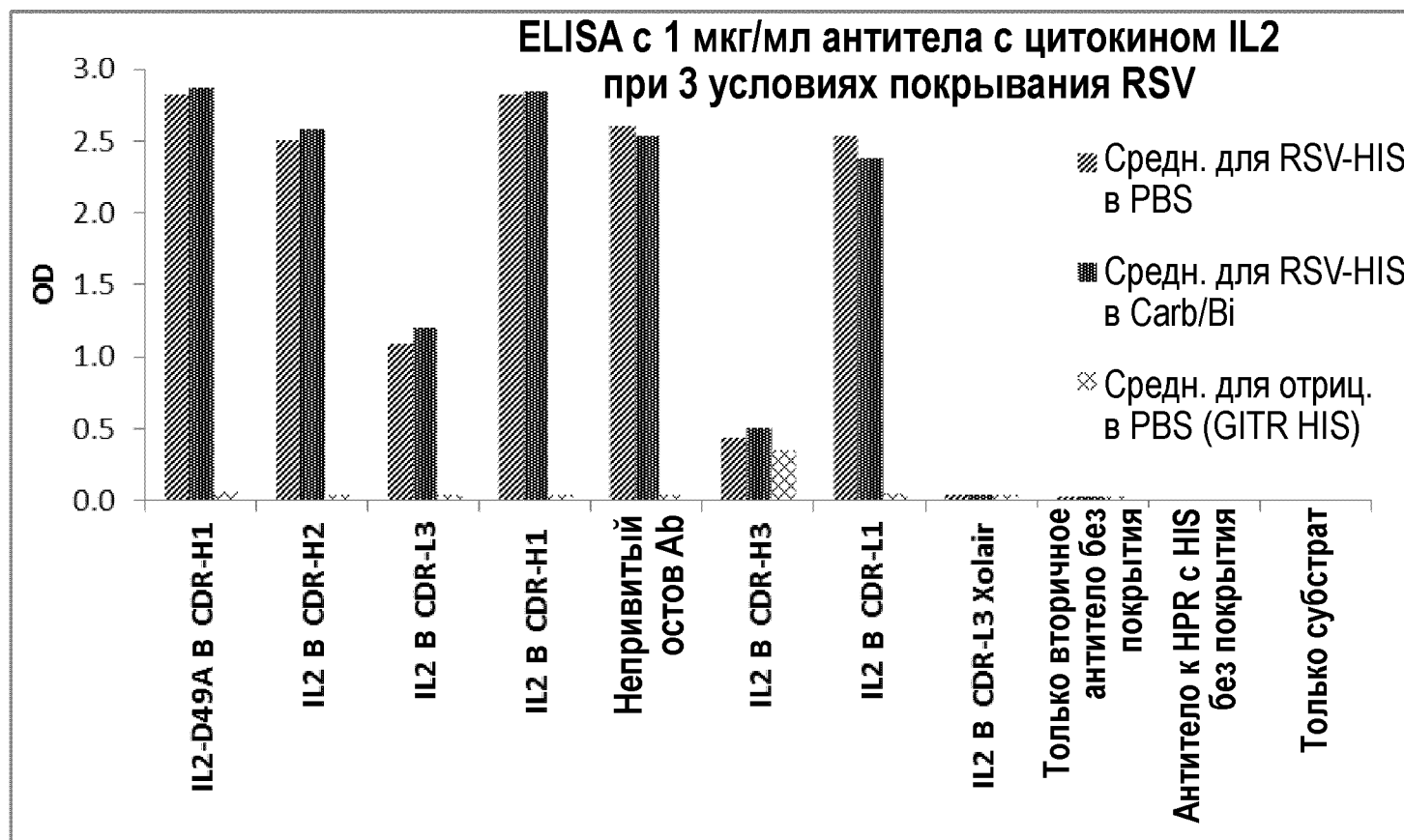
ФИГ.15В

Профили передачи сигнала с помощью IgG.IL2D49A.H1 и Proleukin® в PBMC пациентов с T1D



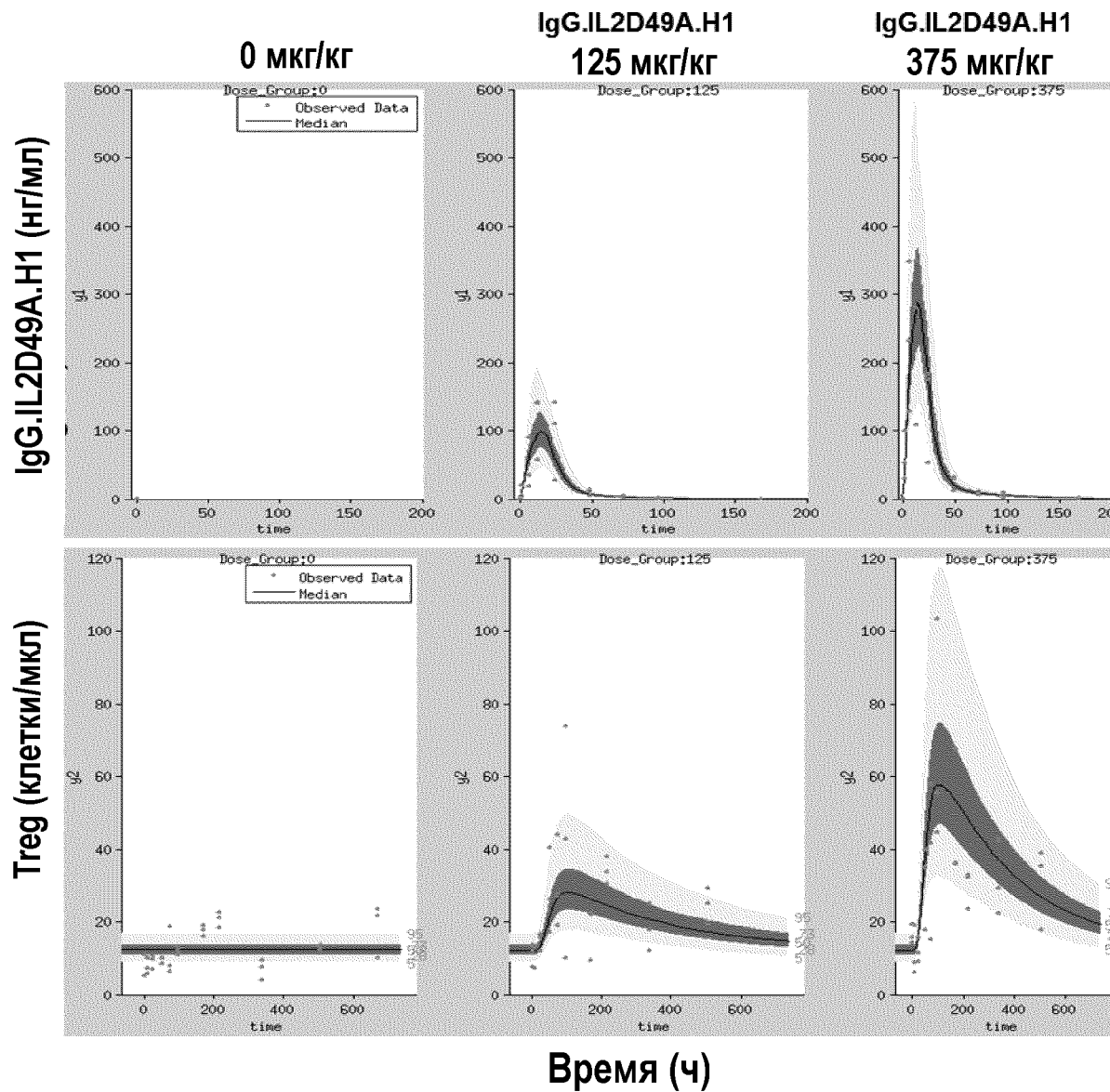
ФИГ.16

Белки на основе антитела с привитым IL2 характеризуются связыванием с RSV



ФИГ.17

Размножение Treg у яванского макака после однократной дозы IgG.IL2D49A.H1



Фармакокинетика

Уровни Treg

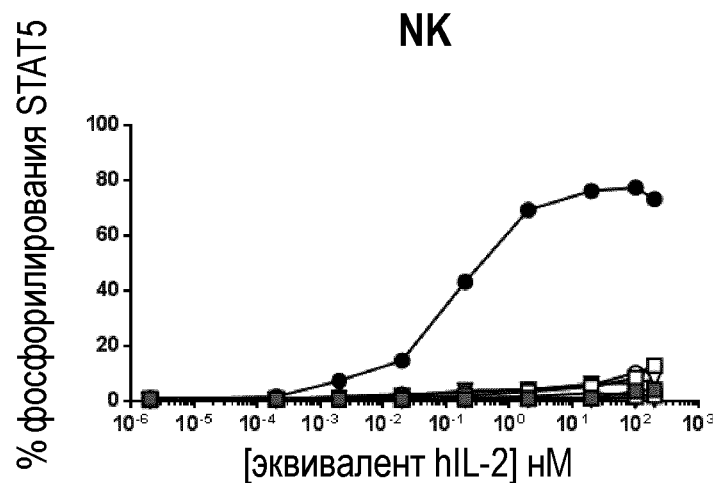
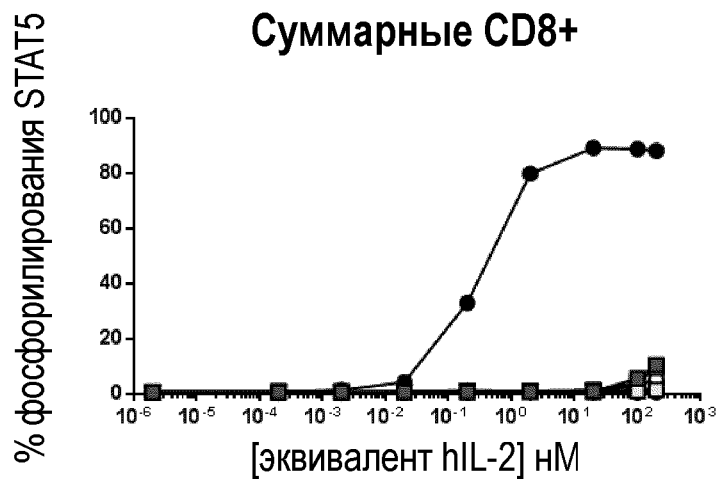
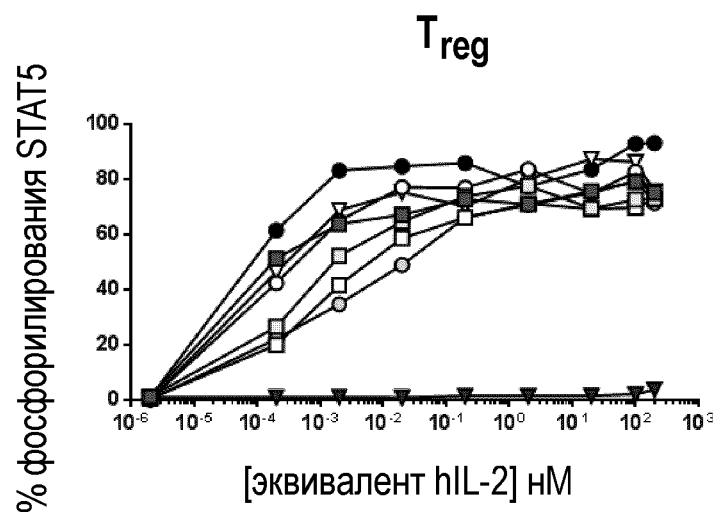
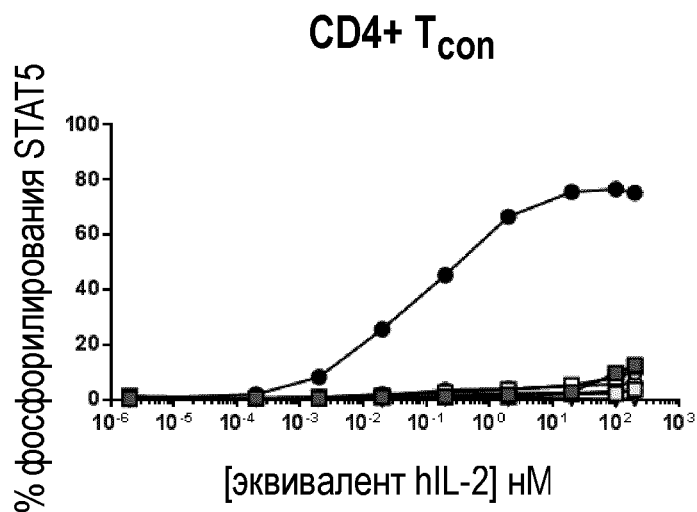
19/22

ФИГ.18

Увеличивающиеся концентрации сшивающего антитела к IgG человека не влияют на избирательные виды активности GFTX3b_IL-2-H1-D49A

In vitro анализ передачи сигнала при сшивании

- GFTX3b_IL-2-H1-D49A
- 0.5x
- 1x
- 5x
- 10x
- ▽ 2.5x
- Proleukin
- ▽ IgG

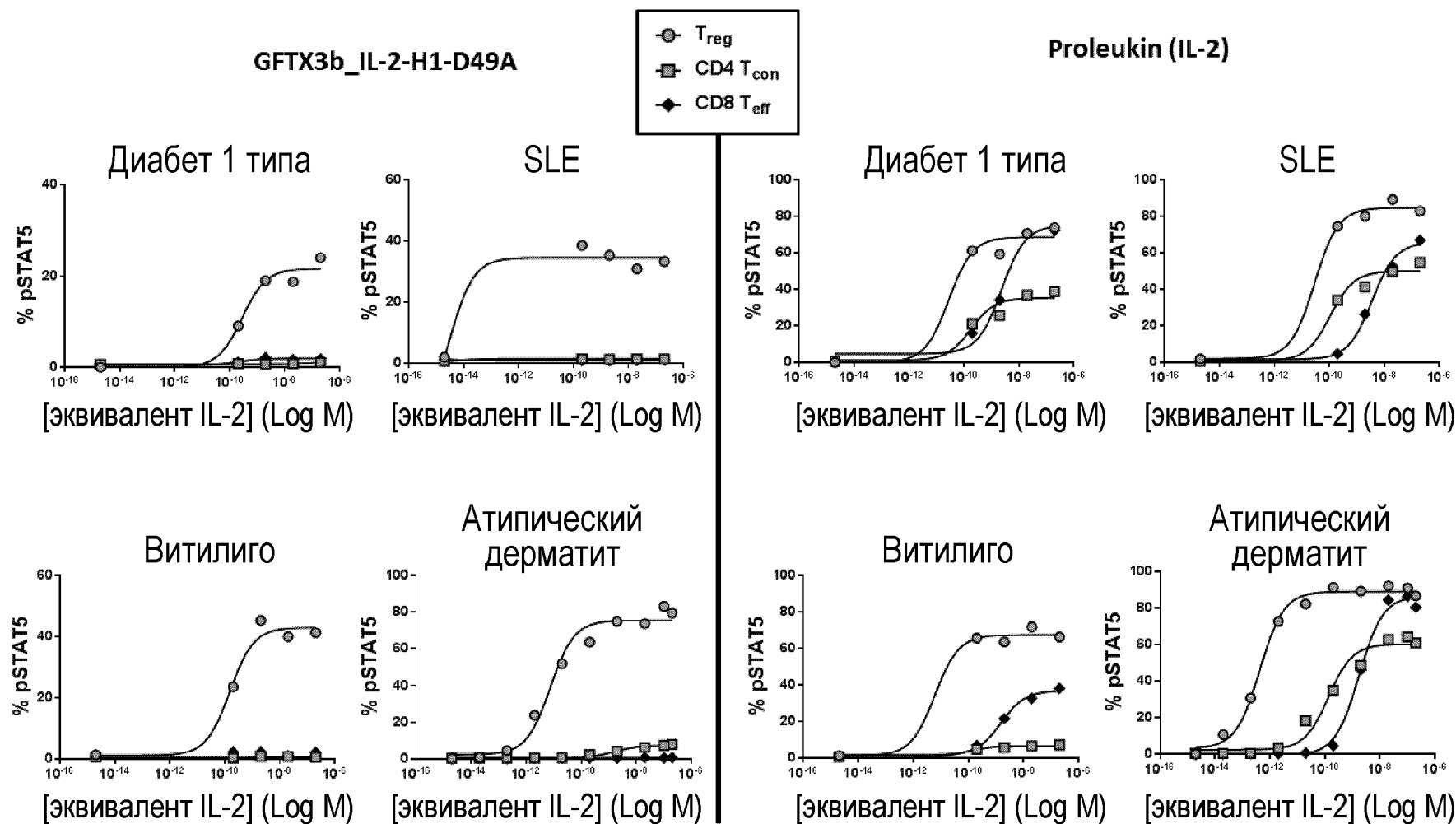


20122

ФИГ.19

Избирательность передачи сигнала сохранена в PBMC различных пациентов с аутоиммунными нарушениями при применении GFTX3b_IL-2-H1-D49A

In vitro анализ передачи сигнала на основе pSTAT5

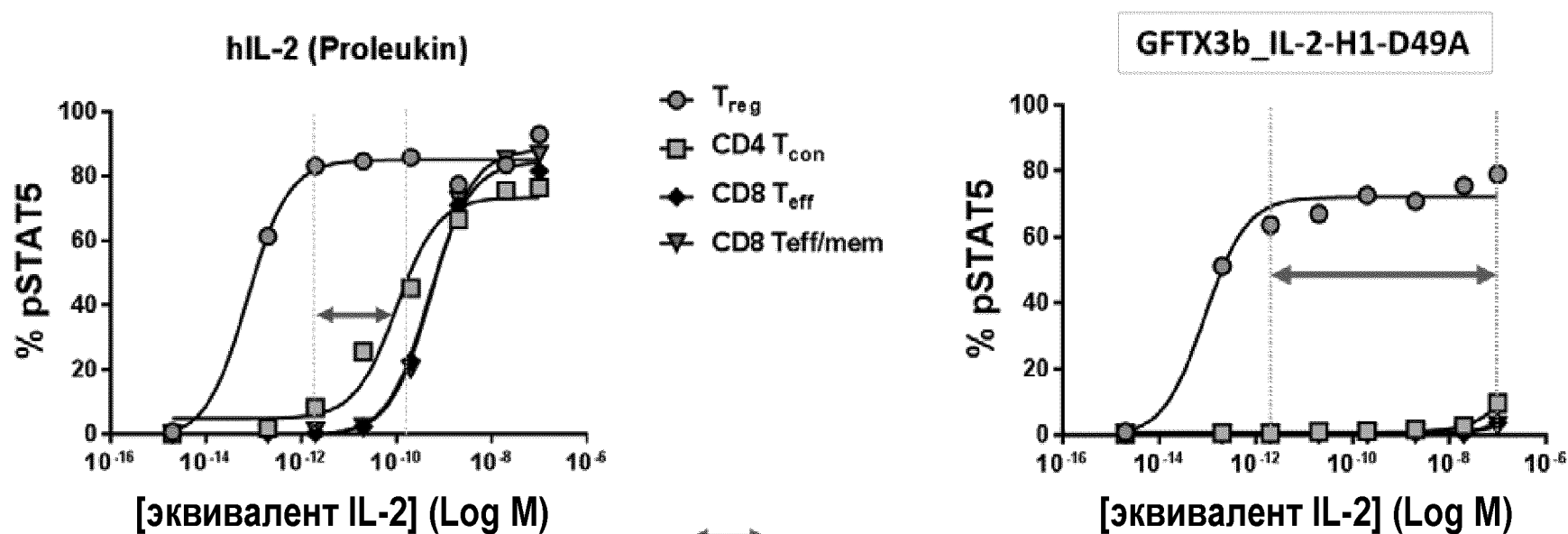


21/22

ФИГ.20

GFTX3b_IL-2-H1-D49A имеет более высокую избирательность, чем Proleukin, в отношении передачи сигнала в Treg по сравнению с эффекторными Т-клетками в PBMC человека

In vitro анализ передачи сигнала на основе pSTAT5



Специфичность GFTX3b_IL-2-H1-D49A по сравнению с Proleukin в передаче сигнала в Treg относительно эффекторных Т-клеток

Регуляторные Т-клетки отн. CD4 эффекторных Т-клеток	5000 раз
Регуляторные Т-клетки отн. CD8 эффекторных Т-клеток	500 раз
Регуляторные Т-клетки отн. CD8 Teff/mem	500 раз