

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038554**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.14

(21) Номер заявки
201791937

(22) Дата подачи заявки
2016.03.04

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) **ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ**

(31) **14/638,905**

(32) **2015.03.04**

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/US2016/020813**

(87) **WO 2016/141262 2016.09.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗЕ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ
(US)

(72) Изобретатель:
Раветч Джеффри В., Пинсетик Эндрю
(US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) RAMAKRISHNA, C. et al. Passively Administered Pooled Human Immunoglobulins Exert IL-10 Dependent Anti-Inflammatory Effects that Protect against Fatal HSV Encephalitis. PLOS Pathogens. 2011. vol. 7, no. 6, e1002071, doi: 10.1371/journal.ppat.1002071, pages 1-17; page 1, abstract, page 2, first column, first paragraph
US-B2-8470318
US-A1-20140377280
US-A1-20110020269

(57) В изобретении предложены противовоспалительные варианты IgG Fc и способы их применения в производстве лекарственного средства для повышения уровня регуляторных T-клеток (T_{reg}) у субъекта.

038554 B1

038554 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США 14/638905, поданной 4 марта 2015 г., которая является частично продолжающей заявкой для заявки на патент США 14/368701, поданной 25 июня 2014 г., которая является заявкой национальной фазы США на основе международной заявки PCT/US 2012/068718, поданной 10 декабря 2012 г., в которой испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/577361, поданной 19 декабря 2011 г. Содержание предыдущих заявок полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

В настоящем изобретении предложены варианты IgG Fc и способы их применения в производстве лекарственного средства для повышения уровня регуляторных T-клеток (T_{reg}) у субъекта.

Уровень техники

Воспалительные нарушения, включая аутоиммунные заболевания, представляют собой нарушения, связанные с патологической активацией и последующей миграцией лейкоцитов в пораженные области тела. Указанные состояния охватывают широкий спектр недугов, которые влияют на жизни миллионов людей во всем мире. Несмотря на то, что в настоящее время доступны различные способы лечения, многие из них обладают значительными побочными эффектами или малоэффективны в лечении всех симптомов. Следовательно, существует потребность в противовоспалительных агентах для лечения воспалительных нарушений и способах выявления и оценки указанных агентов.

Давно известно, что иммуноглобулин G (IgG) обладает как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью за счет взаимодействий, опосредованных его фрагментом Fc. В то время как взаимодействия Fc-Fc γ R ответственны за провоспалительные свойства иммунных комплексов и цитотоксических антител, внутривенный γ -глобулин (IVIg) и его фрагменты Fc обладают противовоспалительными свойствами и широко используются для подавления воспалительных заболеваний. Было высказано предположение, что гликозилирование IgG имеет решающее значение для регуляции цитотоксичности и воспалительного потенциала IgG. Например, была выдвинута гипотеза о том, что противовоспалительная активность IVIg является свойством фрагмента Fc и соединенного с ним гликана, которое также зависит от присутствия концевой остатка сиаловой кислоты, присоединенного посредством α 2,6-связи, это свидетельствует о том, что для иммунологической супрессии требуется конкретный полипептидный остов и структура гликана (Anthony, et al., 2008, Science 320: 373-376 and WO 2007/117505).

Однако лишь незначительная популяция IgG среди IVIg содержит гликан, заканчивающийся α 2,6-сиаловыми кислотами (sFc), и обладает противовоспалительной активностью. Как следствие этого для подавления воспаления, инициированного аутоантителами, в различных клинических ситуациях IVIg необходимо вводить в высоких дозах (1-2 г/кг), чтобы увеличить популяцию стабирированных IgG, или увеличить сиалирование IgG иным способом (заявки на патент США №№ 20080206246 и 20090004179, и Nimmerjahn et al., Annu Rev Immunol 26, 513-533 (2008)).

В настоящем изобретении предложены способы удовлетворения вышеупомянутых потребностей путем выявления противовоспалительных полипептидов, не содержащих остатков сиаловых кислот.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены варианты IgG Fc и способы их применения в производстве лекарственного средства для повышения уровня регуляторных T-клеток (T_{reg}) у субъекта.

Соответственно, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий модифицированную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, на любую величину от 75 до 100% включительно, например на 75, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) идентична области Fc IgG. Модифицированная последовательность не содержит остатков сиаловых кислот, и указанный полипептид обладает противовоспалительной активностью, превышающей активность исходного полипептида. Исходный полипептид может содержать область Fc IgG, такую как представленная ниже последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид способен связываться с DC-SIGN и связываться с hFc γ RIIA или RIIb. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения выделенный полипептид способен связываться с hFc γ RIIA или RIIb с K_D , составляющей 2×10^{-5} М или ниже (т.е. с K_D , составляющей $5,0 \times 10^4$ М⁻¹ или выше). Предпочтительно модифицированная последовательность содержит мутацию FA241. Модифицированная последовательность может быть идентична по меньшей мере на 75% (например, на любую величину от 75 до 100% включительно, например на 75, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых примерах модифицированная последовательность содержит или состоит, по существу, из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ получения полипептида, обладающего противовоспалительной активностью. Способ включает, помимо всего прочего, этапы, на которых предложен исходный полипептид, содержащий последовательность области Fc IgG, или первая нуклеиновая последовательность, кодирующая исходный полипептид; и этап модификации исходного полипептида с получением модифицированного полипептида таким образом, что модифицированный полипептид не содержит остатков сиаловых кислот и имитирует структуру сиалированной формы облас-

ти Fc IgG. Этап модификации может быть проведен путем модификации первой нуклеиновой последовательности для получения второй нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид. В настоящем изобретении также предложен полипептид, полученный способом, описанным выше.

Согласно третьему аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую описанный выше полипептид; вектор экспрессии, содержащий указанную нуклеиновую кислоту; и клетка-хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту. В настоящем изобретении также предложен способ получения полипептида. Способ включает культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, и очистку полипептида из культивируемой клетки или среды клетки.

Согласно четвертому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: (i) описанный выше полипептид или нуклеиновую кислоту, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно пятому аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения воспалительного заболевания. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества вышеописанного полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. В настоящем изобретении также предложено применение указанного полипептида или нуклеиновой кислоты в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. В настоящем изобретении также предложен выделенный полипептид, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка-хозяин, композиция или способ лечения воспалительного заболевания по существу, как показано и описано в настоящем документе.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении также предложен способ повышения уровня регуляторных Т-клеток (T_{reg}) у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту эффективного количества (i) первого выделенного полипептида, содержащего область Fc IgG, которая является сialiрированной; или (ii) второго выделенного полипептида, содержащего модифицированную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, на любую величину от 75 до 100% включительно, например на 75, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) идентична области Fc IgG, или нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, причем модифицированная последовательность содержит мутацию FA241. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект страдает от воспалительного заболевания, такого как аутоиммунное заболевание, включая аутоиммунное заболевание, опосредованное Т-клетками. Примеры опосредованного Т-клетками аутоиммунного заболевания включают рассеянный склероз и сахарный диабет I типа. Соответственно, в настоящем изобретении также предложен способ лечения опосредованного Т-клетками аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеупомянутого первого выделенного полипептида или второго выделенного полипептида или нуклеиновой кислоты.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения область IgG в первом выделенном полипептиде может быть сialiрирована на уровне, превышающем уровень сialiрирования IgG у субъекта. Модифицированная последовательность может быть сialiрирована в различной степени или может не содержать остатки сialiрированных кислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения область IgG (a) по существу, не содержит остатков сialiрированных кислот или (b) сialiрирована на уровне ниже уровня сialiрирования IgG у субъекта. Область Fc IgG может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. Модифицированная последовательность может быть идентична по меньшей мере на 75% (например, на любую величину от 75 до 100% включительно, например на 75, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. Первый или второй выделенный полипептиды способны связываться с DC-SIGN, hFcγRIIA или hFcγRIIB. Предпочтительно выделенный полипептид способен связываться с hFcγRIIA или hFcγRIIB с K_D , составляющей 2×10^{-5} М или ниже (т.е. K_A , составляющей $5,0 \times 10^4$ М⁻¹ или выше).

В настоящем изобретении также предложено применение описанного выше первого выделенного полипептида или второго выделенного полипептида в изготовлении лекарственного средства для лечения опосредованного Т-клетками аутоиммунного заболевания или для повышения уровня регуляторных Т-клеток (T_{reg}) у субъекта, нуждающегося в этом.

Подробное описание одного или более вариантов реализации настоящего изобретения представлено ниже. Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения.

Описание чертежей

На фиг. 1a, 1b, 1c и 1d представлены результаты, свидетельствующие о том, что область Fc F241A способна подавлять артрит, индуцированный сывороткой. (фиг. 1a) Схематическое изображение взаимодействия между остатками маннозы несиалирированного остова гликана (asialo-Fc) и остатком фенилаланина в положении 241 домена Cγ2. Сialiрирование (sial-Fc) блокирует указанное взаимодействие, что приводит к более высокой конформационной гибкости части Fc, обеспечивающей переход между так называемой открытой и закрытой конформациями. (фиг. 1b) hDC-SIGN⁺ макрофаги, полученные из костного мозга, активировали в течение 1 ч сialiрированной (sFc) или несиалирированной (Fc) Fc дикого типа

или F241A-Fc. Экстракты целых клеток использовали для исследования выработки ИЛ-33 методом вестерн-блоттинга. Актин использовали в качестве контроля загрузки. (фиг. 1c) Макрофаги, полученные из костного мозга (МКМ) мышей линий SIGN-R1^{-/-} или hDC-SIGN⁺, активировали с использованием несиалирированной Fc дикого типа (asialo-Fc), сиалирированной Fc дикого типа (sFc) или F241A. После интенсивной промывки клетки адоптивно переносили мышам линии C57BL/6, иммунизированным K/BxN. (фиг. 1d) hDC-SIGN⁺ МКМ активировали несиалирированным (asialo-Fc) или сталирированным (α 2,6sFc) вариантом Fc дикого типа или F241A. Клетки адоптивно переносили мышам линии C57BL/6, иммунизированным K/BxN. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *p < 0,05; **p < 0,01 согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 2a, 2b и 2c представлены результаты, свидетельствующие о том, что F241A индуцирует противовоспалительные реакции посредством связывания с рецепторами Fc II типа. (фиг. 2a) Мышам линии C57BL/6 дикого типа вводили фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), ИЛ-4ic или F241A (0,033 г/кг) и через 1 ч иммунизировали сыворотками K/BxN. Через 6 дней после обработки у мышей собирали кровь и уровни ИЛ-6 в сыворотке крови исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). (фиг. 2b) У мышей контролировали клинические оценки, отражающие степень тяжести артрита, вызванного сывороткой. (фиг. 2c) Мышей линии SIGN-R1^{-/-} и hDC-SIGN⁺ иммунизировали сывороткой K/BxN и вводили сиалирированную область Fc дикого типа (sFc) или F241A (в концентрации 0,033 г/кг в обоих случаях). Развитие заболевания контролировали ежедневно вплоть до 6-го дня после индукции заболевания.

На фиг. 3a, 3b и 3c представлены результаты, свидетельствующие о том, что sFc/F241A активирует T_{reg} клетки и вызывает их пролиферацию. (фиг. 3a) Мыши линии C57BL/6 дикого типа получали внутривенные инъекции IVIG (1 г/кг), IVIG-F(ab)[']₂ (0,66 г/кг), IVIG-Fc (0,33 г/кг) или ФСБ в качестве контроля. На 5-й день после инъекции количество T_{reg} клеток в селезенке исследовали методом проточной цитометрии. (фиг. 3b) Мышам линии C57BL/6 дикого типа, иммунизированным K/BxN, вводили IVIG (1 г/кг), обработанный нейраминидазой IVIG (NA-IVIG) (1 г/кг), несиалирированную область F241A (0,033 г/кг) или ФСБ в качестве контроля. Наблюдали клинические признаки артрита. (фиг. 3c) На 5-й день после начала лечения мышей умерщвляли и T_{reg} клетки в селезенке исследовали с помощью проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f представлены результаты, свидетельствующие о том, что IVIG-/F241A-активированные T_{reg} клетки эффективно подавляют опосредованную T-клетками аутоиммунную реакцию в мышинной модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ). (фиг. 4a) Мышей линии C57BL/6 дикого типа иммунизировали пептидом MOG₃₅₋₅₅ для индукции ЭАЭ. Начиная с пятого дня после индукции ЭАЭ мыши получали внутривенные инъекции ФСБ, IVIG (1 г/кг) или обработанного нейраминидазой IVIG (NA-IVIG) (1 г/кг) каждые 5 дней. Представлены клинические оценки ЭАЭ. (фиг. 4b, 4c) Мышей умерщвляли, и CD4⁺ эффекторные T-клетки (фиг. 4b) и T_{reg} клетки (фиг. 4c) из дренирующих лимфатических узлов исследовали методом проточной цитометрии. (фиг. 4d) ЭАЭ индуцировали у мышей линии C57BL/6 дикого типа путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅. Каждые пять дней мыши получали внутривенно несиалирированную Fc F241A (0,033 г/кг) или ФСБ. Для истощения T_{reg} клеток мышам вводили антитело для истощения T_{reg}, PC61 (400 мкг), за 3 дня до индукции ЭАЭ, а также на каждый пятый день после индукции. Представлены клинические оценки заболевания. (фиг. 4e, 4f). Клетки из дренирующих лимфатических узлов мышей с ЭАЭ выделяли и исследовали для определения процентного содержания CD4⁺ эффекторных T-клеток (фиг. 4e) и T_{reg} клеток (фиг. 4f) методом проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 5a, 5b, 5c и 5d представлены результаты, свидетельствующие о том, что рецепторы Fc II типа необходимы для IVIG-/F241A-опосредованной активации T_{reg} клеток. Во всех экспериментах ЭАЭ индуцировали путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅. Мыши получали внутривенные инъекции на 5, 10, 15 и 20 день. Представлены клинические оценки ЭАЭ. (фиг. 5a) Мышам линии C57BL/6 дикого типа и SIGN-R1^{-/-} вводили IVIG (1 г/кг) или ФСБ. (фиг. 5b) Мыши линии SIGN-R1^{-/-} получали IVIG (1 г/кг), как указано выше, или ИЛ-33 (0,5 мкг) внутривенно каждые два дня, начиная с пятого дня после индукции ЭАЭ. (фиг. 5c) Мыши линии SIGN-R1^{-/-} и SIGN-R1^{-/-} hDC-SIGN⁺ получали ФСБ или IVIG (1 г/кг). (фиг. 5d) Мыши линии SIGN-R1^{-/-} hDC-SIGN⁺ получали несиалирированную F241A (asialo-F241A) (0,033 г/кг) или контрольный ФСБ. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f и 6g представлены результаты, свидетельствующие о том, что F241A-индуцированная выработка ИЛ-33 активирует T_{reg} клетки. (фиг. 6a, 6b) Мышам линии C57BL/6 дикого типа вводили ИЛ-33 (0,5 мкг) внутривенно в течение четырех последовательных дней. На 5-й день мышей умерщвляли и процентное содержание T_{reg} клеток в селезенке исследовали методом проточной цитометрии. (фиг. 6c) Макрофаги, полученные из костного мозга, мышей линии C57BL/6 дикого типа или линии hDC-SIGN⁺ активировали с использованием ФСБ, IVIG или несиалирированной F241A. (фиг.

6с). Общую РНК выделяли и использовали для количественной ОТ-РНК, чтобы измерить уровни мРНК ИЛ-33. Конститутивный ген *Gapdh* использовали для нормирования. (фиг. 6d, 6e) После обработки макрофаги, полученные из костного мозга, интенсивно промывали и адоптивно переносили мышам-реципиентам C57BL/6 дикого типа. На 5-й день после переноса мышей умерщвляли и количество T_{reg} клеток и экспрессию ST2 исследовали методом проточной цитометрии. (фиг. 6f) ЭАЭ индуцировали у мышей дикого типа C57BL/6 путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅. Каждые два дня после индукции мышам получали ИЛ-33 (0,5 мкг, в/б). Представлены клинические оценки заболевания. (фиг. 6g) Процентное содержание T_{reg} клеток из дренирующих лимфатических узлов мышей с ЭАЭ исследовали методом проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *** $p < 0,001$ согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 7a, 7b, 7c и 7d представлены результаты, свидетельствующие о том, что IVIG/F241A индуцирует активацию T_{reg} клеток путем передачи сигналов с участием ИЛ-33/ST2. (фиг. 7a, 7b) Мышам линии C57BL/6 дикого типа, иммунизированным К/ВхN, вводили ФСБ или IVIG (1 г/кг). Чтобы блокировать передачу сигналов с участием ИЛ-33 мышам вводили блокирующее антитело к ST2 (100 мкг, в/в) или антитело для контроля изотипа. Представлены клинические оценки ревматоидного артрита (РА). (фиг. 7a) На пятый день после индукции заболевания мышей умерщвляли, и T_{reg} клетки селезенки исследовали методом проточной цитометрии (фиг. 7b). (фиг. 7c) ЭАЭ индуцировали у мышей линии C57BL/6 дикого типа путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅. Мышам вводили внутривенно ФСБ или несиалированную F241A (ST2) (0,033 г/кг) четыре раза на 5, 10, 15 и 20 день. Каждая инъекция предшествовала внутривенной инъекции блокирующего антитела к ST2. Представлены клинические оценки ЭАЭ. (фиг. 7d) Мышей с ЭАЭ умерщвляли и из дренирующих лимфатических узлов выделяли клетки. Процентное содержание T_{reg} клеток и экспрессию Foxp3 и ST2 исследовали с помощью проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 8 представлены результаты, свидетельствующие о том, что F241A связывается с DC-SIGN независимо от сialiрования. Рекомбинантный DC-SIGN был иммобилизован, и аффинность связывания несиалированной (asial-F241A), сialiрованной F241A (sial-F241A) и несиалированной Fc дикого типа (asial WT Fc) измеряли методом ИФА.

На фиг. 9a, 9b и 9c представлены результаты, свидетельствующие о том, что карман E318/Lys340 имеет решающее значение для противовоспалительного действия сialiрованной Fc. (фиг. 9a) Клетки костного мозга от мышей SIGN-R1^{-/-} и hDC-SIGN⁺ были выделены и дифференцированы в условиях *in vitro* в макрофаги (МКМ). МКМ активировали Fc дикого типа или мутированным вариантом Fc в течение ночи. Экстракты целых клеток использовали для вестерн-блоттинга. Актин использовали в качестве контроля загрузки. (фиг. 9b) Мышам линии C57BL/6, иммунизированным К/ВхN, вводили различные препараты Fc. Клинические оценки заболевания контролировали на 6-й день после начала лечения. (фиг. 9c) Уровни ИЛ-6 в сыворотке крови исследовали методом ИФА через 8 дней после лечения.

На фиг. 10a, 10b и 10c представлены результаты, свидетельствующие о том, что IVIG селективно активирует пролиферацию индуцируемых T_{reg} клеток. ЭАЭ индуцировали у мышей линии C57BL/6 дикого типа путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅, эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда (CFA). Мышам вводили ФСБ или IVIG (1 г/кг)/ (a) Представлены клинические оценки ЭАЭ. В графической форме представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; ** $p < 0,01$ согласно апостериорному критерию Тьюки. (b) Типичные изображения окрашивания гематоксилином и Luxol Fast Blue спинного мозга мышей с ЭАЭ. Окрашивание гематоксилином использовали для визуализации воспаления. Потеря сигнала при окрашивании Luxol Fast Blue свидетельствует о прогрессирующей демиелинизации. (c) Клетки из дренирующих лимфатических узлов выделяли и исследовали процентное содержание T_{reg} клеток и уровень экспрессии pTreg-специфичного фактора транскрипции Helios.

На фиг. 11a и 11b представлены результаты, свидетельствующие о том, что потеря SIGN-R1 устраняет положительное действие IVIG на T_{reg} клетки. Мышам линии C57BL/6 дикого типа и SIGN-R1^{-/-} вводили внутривенно IVIG (1 г/кг) или ФСБ. Через 1 ч мышам иммунизировали сывороткой К/ВхN. (фиг. 11a) Клинические оценки артрита контролировали через 5 дней после иммунизации. (фиг. 11b) T_{reg} клетки селезенки исследовали методом проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; * $p < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента.

На фиг. 12 представлены результаты, свидетельствующие о том, что ИЛ-33 синергично участвует в дифференцировке T_{reg} клеток в условиях *in vitro*. Наивные CD4⁺ T-клетки выделяли из селезенки мышей линии C57BL/6 дикого типа. Клетки культивировали три дня в присутствии антител к CD3/CD28. Для того чтобы контролировать дифференцировку T_{reg} клеток к клеткам добавляли ФРО- β по отдельности или в комбинации с ИЛ-33 и ИЛ-23. Количество T_{reg} клеток и экспрессию ST2 исследовали методом проточной цитометрии.

На фиг. 13a, 13b и 13c представлены результаты, свидетельствующие о том, что истощение базофилов не влияет на IVIG-опосредованную стимуляцию T_{reg} клеток. Мышам линии C57BL/6 дикого типа вводили антитело к Fc ϵ RI для истощения базофилов или антитело для контроля изотипа. Мышам также

вводили IVIG (1 г/кг) или ФСБ и иммунизировали сывороткой К/ВхN. (фиг. 13a) Результаты исследования базофилов селезенки через пять дней после инъекции методом проточной цитометрии. (фиг. 13b) Клинические оценки артрита контролировали на 5-й день после индукции заболевания. (фиг. 13 c) T_{reg} клетки селезенки исследовали методом проточной цитометрии. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 14a, 14b, 14c и 14d представлены результаты, свидетельствующие о том, что IVIG преимущественно активирует iT_{reg} клетки и защищает от экспериментального колита. Мышам линии C57BL/6 Rag1^{-/-} вводили путем инъекции CD4⁺CD45RB^{high}CD25⁻ T-клетки, чтобы индуцировать колит, вызванный переносом T-клеток. Мышам вводили ФСБ или IVIG (1 г/кг) один раз в неделю, начиная через четыре недели после переноса T-клеток. Контрольные мыши Rag1^{-/-} (CTRL) не получали T-клеток. (фиг. 14a) Массу тела измеряли один раз в неделю. Потерю массы тела использовали в качестве меры степени тяжести заболевания. (фиг. 14b) Клетки из дренирующих лимфатических узлов исследовали для определения процентного содержания T_{reg} клеток и CD4⁺ эффекторных T-клеток методом проточной цитометрии. (фиг. 14c) Целые толстые кишки подвергали диссекции и измеряли. Сжатие толстой кишки отражает степень тяжести заболевания и коррелирует с потерей массы тела. (фиг. 14d) Типичное изображение толстой кишки после диссекции, как описано в с. Представлены средние значения \pm станд. ошиб. среднего; *** $p < 0,001$ согласно апостериорному критерию Тьюки.

На фиг. 15 представлена модель sFc-индуцированных противовоспалительных путей: сталированный IgG, sFc, а также сталированный аналог Fc, F241A, селективно связываются с FcR II типа, как и SIGN-R1 или DC-SIGN человека, на регуляторных макрофагах, и индуцируют выработку ИЛ-33. ИЛ-33 является основным медиатором, который индуцирует два разных противовоспалительных пути. Базофилы реагируют на ИЛ-33 путем выработки ИЛ-4, что в свою очередь индуцирует активацию ингибирующего Fc γ RIIB на эффекторных макрофагах. В результате резкое изменение порога их активации подавляет воспаление. Помимо этого ИЛ-33 также вызывает активацию и пролиферацию T_{reg} клеток, которые эффективно подавляют T_H1 и T_H17 клетки, подавляя тем самым опосредованную T-клетками аутоиммунную реакцию.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданных результатах, которые свидетельствуют о том, что несиалированные варианты Fc IgG придают противовоспалительную активность и имитируют действие 2,6-сиалированной Fc в качестве противовоспалительных медиаторов и что структурные изменения, индуцированные сиалированием, можно имитировать с помощью конкретных модификаций аминокислот в домене C_{H2}. Неожиданным фактом также явилось то, что указанные варианты и сиалированная Fc активируют T_{reg} клетки.

В настоящем документе раскрыто, что противовоспалительная активность IVIG зависит от присутствия сиаловой кислоты в остоле гликана IgG-Fc, это приводит к увеличению конформационной гибкости области C_{H2}, что сопровождается соответствующей модуляцией специфичности связывания с FcR, при этом она сдвигается от I типа ко II типу. Сиалированная IgG-Fc (sFc) увеличивает порог активации врожденных эффекторных клеток в отношении иммунных комплексов, стимулируя активацию ингибирующего рецептора Fc γ RIIB. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что структурные изменения, индуцированные сиалированием, можно имитировать с помощью конкретных модификаций аминокислот в домене C_{H2}. Например, вариант IgG-Fc с точечной мутацией в положении 241 (F-A) проявляет противовоспалительную активность даже в отсутствие сиалирования. F241A и sFc защищают мышей от артрита в модели индуцированного коллагеном артрита и в модели KBxN-индуцированного артрита, а также подавляют заболевание в мышинной модели ЭАЭ, опосредованного T-клетками, путем специфичной активации T_{reg} клеток. Защитное действие указанных противовоспалительных Fc в отношении аутоиммунных заболеваний, опосредованных антителами и T-клетками, нуждалось в FcR II типа и индукции ИЛ-33. Полученные результаты дополнительно уточняют механизм действия IVIG при аутоиммунных заболеваниях, опосредованных антителами и T-клетками, и демонстрируют, что варианты Fc, которые имитируют структурные изменения, индуцированные сиалированием, такие как F241A, могут быть использованы для лечения различных аутоиммунных нарушений. Сиалирование IgG и Fc IgG является основным иммуноглобулином сыворотки крови. Он представляет собой гликопротеин, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей и двух легких цепей, которые, в свою очередь, состоят из варибельной и константной области. IgG содержит один N-связанный гликан в положении Asn297 в домене C_{H2} на каждой из двух тяжелых цепей. Ковалентно присоединенный сложный углевод состоит из центральной части, двухантенного пентаполисахарида, содержащего N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и маннозу (ман.). Сывороточные антитела содержат центральную часть с дополнительными модификациями, которые включают присутствие фукозы, разветвленного GlcNAc, галактозы (gal) и концевых фрагментов сиаловой кислоты (sa). Было обнаружено более 40 различных гликоформ, которые ковалентно присоединены к указанному одному сайту гликозилирования (Fujii et al., J. Biol. Chem. 265, 6009, 1990). Было показано, что гликозилирование IgG имеет важное значение для связывания со всеми Fc γ R, поддерживая открытую конформацию двух тяжелых цепей (Jefferys and Lund, Immune. Lett. 82, 57 (2002), Sondermann et al., J.

Mol. Biol. 309, 737 (2001)). Как полагают, гликозилирование IgG, необходимое для связывания с FcγR, объясняет неспособность дегликозилированных антител IgG индуцировать воспалительные реакции, вызванные в условиях *in vivo*, например, антитело-опосредованную клеточную токсичность (ADCC), фагоцитоз и высвобождение медиаторов воспаления. Nimmerjahn and Ravetch, *Immunity* 24, 19 (2006). Предположение о том, что отдельные гликоформы IgG могут вносить вклад в модулирование воспалительных реакций, было подтверждено изменением аффинности связывания в отношении отдельных FcγR, которое наблюдали для антител IgG, содержащих или не содержащих фукозу, и их последующего влияния на цитотоксичность. Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277, 26733 (2002), Nimmerjahn and Ravetch, *Science* 310, 1510 (2005). Связь между аутоиммунными состояниями и специфичными профилями гликозилирования антител IgG наблюдали у пациентов с ревматоидным артритом и некоторыми видами аутоиммунного васкулита, у которых было зарегистрировано уменьшение галактозилирования и сиалирования антител IgG. Parekh et al., *Nature* 316, 452 (1985), Rademacher et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6123 (1994), Matsumoto et al., 128, 621 (2000), Holland et al., *Biochim. Biophys. Acta* December 27. Также сообщалось, что изменения в гликоформах IgG связаны со старением и иммунизацией, хотя значимость этих изменений в условиях *in vivo* не была установлена. Shikata et al., *Glycoconj. J.* 15, 683 (1998), Lastra, et al., *Autoimmunity* 28, 25 (1998).

Варианты Fc IgG.

В настоящем документе раскрыто, что некоторые варианты Fc IgG как сталированные, так и несиалированные, также неожиданно придают противовоспалительную активность. Такие варианты, включая вариант FA241, представляют собой молекулы, относящиеся к более крупному роду молекул, которые, посредством имитации структурных и биологических свойств сиалированной Fc, но не требуя сиалирования, могут быть разработаны в качестве противовоспалительных лекарственных препаратов.

Несмотря на то, что IVIG первоначально был разработан в качестве иммуноглобулиновой заместительной терапии у пациентов с гипогаммаглобулинемией, он получил широкое распространение благодаря различным видам иммуномодулирующей активности. Он представляет собой одобренный терапевтический препарат для лечения аутоиммунных нарушений, таких как иммунотромбоцитопения (ИТР), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), болезнь Кавасаки и синдром Гийена-Барре, и используется для лечения все большего числа аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Было показано, что противовоспалительная активность IVIG обусловлена присутствием специфического гликана, α2,6-сиалированной сложной двухантенной структуры, присутствующей на домене C_H2 Fc, который обнаружен в небольшом количестве препаратов гетерогенных антител в IVIG. Сиалирование гликана Fc на домене C_H2 приводит к образованию IgG, которые могут связываться с рецепторами Fc II типа, такими как SIGN-R1, DC-SIGN и CD23, причем одновременно с этим снижается аффинность их связывания с FcR I типа. Исследования с использованием мышинных моделей индуцированного сывороточной артриты, антителозависимой ИТР, нефротоксичного нефрита и аутоиммунных пузырчаток (ABD) подтвердили противовоспалительную активность сиалированной Fc, независимо от того, была ли она получена из IVIG или рекомбинантно экспрессированного IgG1. Более того, увеличение доли сталированных фрагментов Fc в IVIG или в рекомбинантном экспрессированном IgG1 приводило к повышению терапевтической эффективности этих препаратов. Механизм, с помощью которого sFc индуцирует противовоспалительный ответ, впервые был установлен в мышинных моделях артриты, это свидетельствует о том, что селективное связывание сиалированной Fc с FcR II типа приводит к выработке ИЛ-33 регуляторными макрофагами, что, в свою очередь, стимулирует секрецию ИЛ-4 базофилами. ИЛ-4 индуцировал активацию ингибирующего рецептора FcγRIIB на эффекторных макрофагах, увеличивая тем самым порог активации этих клеток и подавляя воспаление. Последующие исследования подтвердили, что лечение пациентов с использованием IVIG привело к увеличению уровней ИЛ-33 в сыворотке крови и экспрессии FcγRIIB на лимфоидных и миелоидных клетках, что согласуется с результатами, полученными на мышах.

В настоящем документе раскрыто, что кристаллографические и биофизические исследования на сталированных и несиалированных фрагментах Fc IgG позволили установить структурную основу противовоспалительной активности сиалированной Fc. Сиалирование сложного двухантенного гликана Fc IgG приводит к повышению конформационной гибкости области C_H2, обеспечивая тем самым формирование закрытых конформаций домена C_H2, необходимых для связывания с FcR II типа. Напротив, несиалированные структуры Fc постоянно приводят к получению открытых конформаций Fc, что согласуется с данными о специфичности их связывания с FcR типа I. Взаимодействия гликана с аминокислотными остатками домена C_H2 нарушаются при сиалировании, что обеспечивает основу для наблюдаемых конформационных изменений, обнаруженных в структуре белка, и соответствует модели, предложенной для специфичности связывания сиалированной Fc с FcR II типа. На основании этих наблюдений авторы настоящего изобретения создали ряд вариантов Fc, нацеленных на аминокислоты домена C_H2, которые взаимодействуют с гликаном, чтобы определить их влияние на связывание с FcR II типа и обусловленную этим противовоспалительную активность. В данном исследовании изучали мутированные варианты с усилением функции и потерей функции. Выявление варианта с усилением функции, который может

имитировать конформационное состояние, индуцированное сиалированием, не требуя данной специфичной модификации углевода, может упростить разработку Fc IgG с противовоспалительной активностью для терапевтического применения. Авторам настоящего изобретения удалось выявить мутацию (F241A), которая согласно прогнозу увеличивает подвижность $\alpha 1,3$ -плеча и которая имитирует противовоспалительную активность сиалированной Fc даже в отсутствие сиалирования. Авторы настоящего изобретения охарактеризовали указанный вариант в сравнении с сиалированной Fc в моделях аутоиммунного воспаления, обусловленного антителами и Т-клетками.

Несмотря на то, что механизм защитного действия IVIG в опосредованных антителом моделях воспаления был широко изучен, как кратко описано выше, недавние исследования продемонстрировали, что IVIG также может обладать защитными свойствами при классических аутоиммунных нарушениях, опосредованных Т-клетками, таких как ЭАЭ, а также в модели гиперреактивности дыхательных путей (АНР). Предполагают, что терапевтический эффект IVIG является результатом активации и пролиферации T_{reg} клеток, подавляя тем самым реакции ИФН γ -секретирующих T_H1 -клеток и ИЛ-17-секретирующих T_H17 -клеток. Соответственно, авторы настоящего изобретения стремились исследовать, является ли активация и пролиферация T_{reg} клеток результатом влияния сиалированной Fc или варианта F241A. Используя F241A, сталированный и несиалированный IVIG, авторы настоящего изобретения исследовали механизмы их иммуномодулирующего действия на активацию T_{reg} клеток и подавление аутоиммунитета, зависящего от Т-клеток. Авторы настоящего изобретения демонстрируют, что сиалирование IVIG имеет решающее значение для активации и пролиферации T_{reg} клеток и то, что варианты F241A способны эффективно подавлять опосредованное Т-клетками воспаление при ЭАЭ и в экспериментальных моделях колита. Помимо этого sFc и F241A стимулируют выработку интерлейкина-33 (ИЛ-33), который в свою очередь активирует T_{reg} клетки посредством рецептора ST2, что способствует подавлению опосредованных Т-клетками аутоиммунных реакций.

Как раскрыто в примерах ниже, авторы настоящего изобретения представляют функциональные данные, которые указывают на то, что специфичные взаимодействия между остовом Fc и гликаном Fc влияют на эффекторные свойства сиалированного IgG. Авторы настоящего изобретения подтвердили, что противовоспалительная активность сиалированной Fc строго зависит от $\alpha 2,6$ -связи стальной кислоты, поскольку только $\alpha 2,6$ -сталированная Fc, но не $\alpha 2,3$ -сталированная Fc, связывается с DC-SIGN и подавляет индуцированное аутоантителами артритное воспаление. Как различные типы присоединения сиаловой кислоты к гликану Fc влияют на структуру Fc? Авторы настоящего изобретения обнаружили, что близость остатка сахара сиаловой кислоты к белковому остову может определить способ взаимодействия сиаловой кислоты с конкретными боковыми цепями аминокислот на Fc. Действительно, данные молекулярного моделирования указывают на то, что только $\alpha 2,6$ -соединенная сиаловая кислота может поместиться в борозду, образованную Glu318 и Lys340 на границе раздела C $\gamma 2$ -C $\gamma 3$. Для того чтобы определить, играет ли указанная борозда определенную роль в противовоспалительной активности $\alpha 2,6$ -сиалированной Fc, авторы настоящего изобретения описали иммуносупрессорные функции сиалированной Fc, несущей точечную мутацию E318N. Интересно отметить, что E318N $\alpha 2,6$ -сиалированная Fc не способна инициировать противовоспалительные пути, связанные с $\alpha 2,6$ -сиалированной Fc дикого типа, такие как индукция экспрессии ИЛ-33 или защита от артритного воспаления путем адоптивного переноса стимулированных DC-SIGN⁺ МКМ мышам, иммунизированным сывороткой K/BxN. Следовательно, как и в случае $\alpha 2,3$ -связи сиаловой кислоты, авторы настоящего изобретения предполагают, что мутация E318N устраняет взаимодействие $\alpha 2,6$ -соединенной сиаловой кислоты и остова Fc, которое требуется для того, чтобы область Fc приняла "закрытую" конформацию, обладающую противовоспалительными свойствами.

Структуры Fc, как правило, располагают $\alpha 1,3$ -плечи гликана Fc в пределах внутренней полости, образованной доменами C $H2$. Занимая эту полость, $\alpha 1,3$ -плечи стабилизируют домены C $H2$ на определенном расстоянии друг от друга в "открытой" конформации, чтобы облегчить связывание с FcR I типа. Для того чтобы предложенная модель была корректной сталированные $\alpha 1,3$ -плечи должны выйти из этой полости в направлении границы раздела C $H2$ -C $H3$ так, что концевая сиаловая кислота может вступать в контакт с бороздой E318/K340. Следовательно, при перестановке сталированных $\alpha 1,3$ -плеч к границе раздела C $H2$ -C $H3$ домены C $H2$ могут сближаться, чтобы заполнить незанятую полость и образовать "закрытую" конформацию. В отличие от $\alpha 1,6$ -плеча гликана Fc, который вступает в несколько нековалентных взаимодействий с остовом Fc, $\alpha 1,3$ -плечи образуют только один известный контакт в отсутствие сиалирования - с ароматической боковой цепью F241. Однако в кристаллической структуре сиалированной Fc единственная боковая цепь аминокислотного остатка, которая вступает в контакт с гликаном Fc с существенным изменением ориентации, представляет собой кольцевую структуру F241. Авторы настоящего изобретения полагают, что наблюдаемое 90° вращение F241 устраняет гидрофобное стэкинг-взаимодействие, которое эта структура обычно образует с углеводом. Авторы настоящего изобретения полагают, что этот факт важен со структурной точки зрения, поскольку нарушение такого стабилизирующего взаимодействия должно придавать большую степень свободы, или подвижности, сиалирован-

ному 1,3-плечу гликана Fc. При наличии большей подвижности сталированные α 1,3-плечи будут чаще проникать в пространство за пределами внутренней полости для контакта с карманом E318/K340 на границе раздела C_H2-C_H3. В соответствии с предположением о решающей роли F241 в структуре α 2,6-сталированной Fc авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутация F241A, которая специфично разрушает точку контакта белок-сахар, воспроизводила противвоспалительную активность сиалированной Fc, независимо от сиалирования. α 2,6-Сиалированная область Fc и несиалированная F241A Fc связывались с DC-SIGN, индуцировали экспрессию ИЛ-33 и переносили противвоспалительную активность со стимулированными DC-SIGN⁺ МКМ мышам, иммунизированным сывороткой K/BxN, имитировали противвоспалительную активность IVIG и сиалированного IgG. Недавно были опубликованы исследования, в которых обсуждается важная роль сиалирования Fc для модуляции иммунного ответа. Данные, полученные авторами настоящего изобретения, а также данные нескольких других групп подтвердили противвоспалительную роль сиалированной Fc в нескольких моделях воспаления, опосредованного антителами. Эти расхождения, вероятно, являются результатом нелинейного дозирования IVIG в селективных моделях и, следовательно, не отражают физиологически значимые условия, при которых используется IVIG.

Авторы настоящего изобретения выявили, что сиалированная Fc, а также варианты, такие как F241A, специфично стимулировали пролиферацию iT_{reg} клеток и были способны подавлять иммунные ответы, опосредованные T-клетками, в модели ЭАЭ и экспериментального колита путем селективного связывания с рецепторами Fc II типа, SIGN-R1 или его ортологом у человека DC-SIGN. Помимо того авторы настоящего изобретения выявили ИЛ-33 в качестве важного медиатора этого пути. ИЛ-33, индуцированный в ответ на связывание FcR II типа с IVIG, сиалированной Fc или F241A, действует плеiotропно, как кратко описано на фиг. 15. Он может выступать посредником секреции ИЛ-4 базофилами, чтобы поляризовать макрофаги к фенотипу M2 и индуцировать экспрессию ингибирующего FcγRIIB, путь, который доминирует при аутоиммунном воспалении, опосредованном антителами, или он может действовать непосредственно на T_{reg} клетки, чтобы вызвать их активацию и пролиферацию. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что T_{reg} клетки могут активироваться при терапевтическом воздействии сиалированной Fc, которое строго зависит от передачи сигналов с участием ИЛ-33/ST2. Авторы настоящего изобретения не могут исключить возможность того, что ИЛ-33-зависимая активация T_{reg} клеток в основном косвенно опосредована дендритными клетками, как описано ранее Matta и сотрудниками. Однако авторы настоящего изобретения не обнаружили какого-либо прямого взаимодействия IVIG с любой субпопуляцией T-клеток, как эффекторными T-клетками, так и T_{reg} клетками, в отличие от недавно предложенной модели, также не были обнаружены какие-либо доказательства в поддержку того, что IVIG обеспечивает "Tregitopes". В частности, авторы настоящего изобретения смогли детектировать активацию и пролиферацию T_{reg} клеток в экспериментах, в которых IVIG- или F241A-обработанные hDC-SIGN⁺ макрофаги, полученные из костного мозга, переносили наивным реципиентам. Поскольку активированные МКМ отвечали на это лечение выработкой ИЛ-33, данные подтверждают вывод о том, что этот цитокин является доминирующим посредником в пути, который ведет к активации и пролиферации T_{reg} клеток.

Предыдущие исследования установили связь между ИЛ-33 и улучшением интенсивности воспаления, опосредованного T-клетками, в различных мышинных моделях, которые всегда сопровождалась обогащением T_{reg} клеток. Также было показано, что уровни ИЛ-33 в сыворотке крови были сильно повышены при введении IVIG пациентам с аутоиммунными заболеваниями, что делает его мощным индуктором различных противвоспалительных реакций. При использовании антител для блокирования ST2, что предотвращало передачу сигналов с участием ИЛ-33, авторы настоящего изобретения наблюдали, что это лечение значительно снижало защитный эффект IVIG/F241A в модели артрита, индуцированного сывороткой, а также в модели ЭАЭ.

Становится все более очевидным, что область Fc антител является не только "константным" доменом, но также имеет различные структуры и функции. В настоящем изобретении раскрыты новые представления о том, что конформационное разнообразие фрагмента Fc служит в качестве общей стратегии антител для изменения специфичности в отношении рецепторов, чтобы вызвать различные иммунологические исходы. Динамика Fc IgG тщательно контролируется взаимодействиями белок-гликан, которые, в свою очередь, регулируются составом сахаров гликана Fc. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что модель повышенной подвижности гликана Fc объясняет биофизические и функциональные свойства, связанные с противвоспалительной активностью сиалированного IgG. На основании этих структурных и механистических наблюдений авторы настоящего изобретения разработали замену сиалированного IgG, например, F241A, которая обеспечивает большую эффективность и однородность, чем IVIG и может быть использована для клинических исследований воспалительных заболеваний, опосредованных аутоантителами и T-клетками.

Полипептиды и нуклеиновые кислоты.

Полипептиды.

В настоящем изобретении предложены выделенные полипептиды, содержащие последовательности

вариантов области Fc IgG человека, которая не содержит полисахаридной цепи с концевой сиаловой кислотой, соединенной с фрагментом галактозы через α 2,6-связь с вышеупомянутым Asn297. Указанные несиалированные варианты Fc IgG могут быть получены из природного антитела или путем экспрессии в клеточной линии.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область Fc содержит одну или более замен в аминокислотной последовательности IgG1 человека. Типичные области Fc IgG1 включают, но не ограничиваются ими,

Fc из hIgG1 (начиная с аминокислоты 210 согласно системе нумерации по Кабат):

KVDRKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1; F241 и
F243 подчеркнуты)

Fc из hIgG1 FA241:

KVDRKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVALFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2)

Fc из hIgG1 FA243:

KVDRKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLAPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

В настоящей заявке термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для описания расположения аминокислотных остатков в полимере. Пептид, полипептид или белок может состоять из 20 стандартных природных аминокислот в дополнение к редким аминокислотам и синтетическим аналогам аминокислот. Они могут представлять собой любую цепь аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования). Пептид, полипептид или белок "согласно настоящему изобретению" включает рекомбинантные или синтетические варианты, содержащие специфичные домены или части, которые связываются с DC-SIGN, FcγRIIA и FcγRIIB. Термин также охватывает полипептиды, которые содержат дополнительный аминоконцевой метионин (который можно использовать для экспрессии в прокариотических клетках).

"Выделенный" полипептид или белок означает полипептид или белок, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он связан в природных условиях. Полипептид/белок может составлять по меньшей мере 10% (т.е. любой процент от 10 до 100%, например 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 и 99%) в расчете на сухую массу очищенного препарата. Степень чистоты может быть измерена с помощью любого подходящего стандартного метода, например с помощью колонной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле или ВЭЖХ. Выделенный полипептид/белок, описанный в настоящем изобретении, может быть очищен из природного источника, получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК или химическими методами. Функциональный эквивалент Fc IgG относится к полипептидному производному Fc IgG, например белку, содержащему одну или более точечных мутаций, вставок, делеций, усечений, гибриднему белку или их комбинации. Он сохраняет, по существу, активность Fc IgG, т.е. способность связываться с соответствующим рецептором и инициировать соответствующий клеточный ответ. Выделенный полипептид может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В целом, функциональный эквивалент по меньшей мере на 75% (например, на любую величину от 75 до 100% включительно, например на 75, 80, 85, 90, 95 и 99%) идентичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного в соответствии с Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск нуклеотидов BLAST может быть выполнен с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова=12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последова-

тельностей, гомологичных молекулам белков согласно настоящему изобретению. Если между двумя последовательностями существуют пробелы, может быть использована Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Аминокислотный состав полипептида, описанного в настоящем документе, может изменяться без нарушения способности полипептида связываться с соответствующим рецептором и инициировать соответствующий клеточный ответ. Например, он может содержать одну или более консервативных замен аминокислот. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, при которой остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, предсказанный остаток заменимой аминокислоты, например, в SEQ ID NO: 2, предпочтительно заменяют другим остатком аминокислоты из того же семейства боковых цепей. Согласно другому варианту реализации мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части последовательностей, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутированные варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения их способности связываться с соответствующим рецептором и инициировать соответствующий клеточный ответ, чтобы идентифицировать мутированные варианты, которые сохраняют активность, как описано ниже в примерах.

Полипептид, описанный в настоящем изобретении, может быть получен в виде рекомбинантного полипептида. Для получения рекомбинантного полипептида кодирующая его нуклеиновая кислота (например, FA241, SEQ ID NO: 2) может быть связана с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей партнер для гибридизации, например глутатион-S-трансферазу (GST), эпитопную метку 6x-His или белок гена 3 M13. Полученная гибридная нуклеиновая кислота экспрессирует в подходящих клетках-хозяевах гибридный белок, который может быть выделен способами, известными в данной области техники. Выделенный гибридный белок может быть подвергнут дополнительной обработке, например ферментативному расщеплению, чтобы удалить партнер для гибридизации и получить рекомбинантный полипептид согласно настоящему изобретению.

Нуклеиновые кислоты.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид или белок, описанный выше. Нуклеиновая кислота относится к молекуле ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекуле РНК (например, мРНК) или аналогу ДНК либо РНК. Аналог ДНК или РНК может быть синтезирован из аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК. Термин "выделенная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, структура которой не идентична структуре любой природной нуклеиновой кислоты или структуре любого фрагмента в природной геномной нуклеиновой кислоте. В этой связи термин включает, например, (а) ДНК, которая содержит последовательность части природной молекулы геномной ДНК, но не фланкирована обеими кодирующими последовательностями, которые фланкируют данную часть молекулы в геноме организма, в котором она встречается в природных условиях; (б) нуклеиновую кислоту, встроенную в вектор или в геномную ДНК прокариотического или эукариотического организма так, что полученная молекула не идентична любому природному вектору или геномной ДНК; (с) отдельную молекулу, такую как кДНК, геномный фрагмент, фрагмент, полученный с помощью полимеразной цепной реакции (ПНР), или фрагмент рестрикции; и (д) рекомбинантную нуклеотидную последовательность, которая является частью гибридного гена, т.е. гена, кодирующего гибридный белок. Нуклеиновая кислота, описанная выше, может быть использована для экспрессии гибридного белка согласно настоящему изобретению. Для этой цели нуклеиновая кислота может быть функционально присоединена к подходящим регуляторным последовательностям, чтобы получить вектор экспрессии.

Вектор относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, к которой она была присоединена. Вектор может быть способен к автономной репликации или интеграции в ДНК хозяина. Примеры вектора включают плазмиду, космиду или вирусный вектор. Вектор содержит нуклеиновую кислоту в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Предпочтительно вектор содержит одну или более регуляторных последовательностей, функционально соединенных с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую экспрессируют.

"Регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы для контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Регуляторные последовательности включа-

ют последовательности, которые контролируют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности, а также тканеспецифичные регуляторные и/или индуцируемые последовательности. Дизайн вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, уровня экспрессии желаемого белка или РНК и т.п. Вектор экспрессии может быть введен в клетки-хозяева для получения полипептида согласно настоящему изобретению. Промотор определяют как последовательность ДНК, которая направляет РНК-полимеразу для связывания с ДНК и инициирует синтез РНК. Сильным промотором является промотор, который инициирует мРНК с высокой периодичностью.

Любой полинуклеотид, упомянутый выше, или биологически эквивалентный полинуклеотид, доступный специалисту в данной области техники для одной и той же предполагаемой цели, может быть вставлен в соответствующий вектор экспрессии и соединен с другими молекулами ДНК с образованием "рекомбинантных молекул ДНК", экспрессирующих указанный рецептор. Подходящие векторы могут состоять из ДНК или РНК; для большинства целей клонирования предпочтительными являются ДНК-векторы. Типичные векторы включают плазмиды, модифицированные вирусы, бактериофаг и космиды, искусственные хромосомы дрожжей и другие формы эписомальной или интегрированной ДНК. Выбор соответствующего вектора для конкретной цели применения находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

Различные векторы экспрессии у млекопитающих могут быть использованы для экспрессии вышеуказанных Fc IgG в клетках млекопитающих. Как было отмечено выше, векторы экспрессии могут представлять собой ДНК-последовательности, которые необходимы для транскрипции клонированной ДНК и трансляции их мРНК у соответствующего хозяина. Подходящие векторы могут быть использованы для экспрессии эукариотических ДНК в различных хозяевах, таких как бактерии, сине-зеленые водоросли, клетки растений, клетки насекомых и клетки животных. Разработанные для конкретных целей векторы позволяют перемещать ДНК между хозяевами, такими как бактерии-дрожжи или бактерии-клетки животных. Целесообразно сконструированный вектор экспрессии должен содержать: точку начала репликации для автономной репликации в клетках-хозяевах, селективные маркеры, ограниченное число подходящих сайтов ферментов рестрикции, способность к синтезу большого числа копий и активные промоторы. Векторы экспрессии могут включать, но не ограничиваются ими, векторы для клонирования, модифицированные векторы для клонирования, разработанные для конкретной цели плазмиды или вирусы. Коммерчески доступные векторы экспрессии у млекопитающих, которые можно применять в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими,

pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 и pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460) и IZD35 (ATCC 37565).

В объем настоящего изобретения также включена клетка-хозяин, которая содержит описанную выше нуклеиновую кислоту. Примеры включают клетки *E.coli*, клетки насекомых (например, при использовании векторов экспрессии на основе бакуловирусов), клетки дрожжей или клетки млекопитающих. См., например, Goeddel, (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. Для того чтобы получить полипептид согласно настоящему изобретению клетку-хозяин можно культивировать в среде в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению, с последующей очисткой указанного полипептида из культуры клеток или из культуральной среды. Согласно другому варианту реализации нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может быть транскрибирована и транслирована в условиях *in vitro*, например, с использованием регуляторных последовательностей промотора T7 и T7-полимеразы.

Все природные Fc IgG, генетически модифицированные Fc IgG и химически синтезированные Fc IgG можно применять для реализации настоящего изобретения, раскрытого в настоящем документе. Fc IgG, полученная с помощью технологии рекомбинантной ДНК, может содержать аминокислотную последовательность, которая идентична таковой [FA241] SEQ ID NO: 2 или функционально эквивалентную ей последовательность. Термин "Fc IgG" также включает химически модифицированные варианты. Примеры химически модифицированной Fc IgG включают Fc IgG, подвергнутые конформационному изменению, добавлению или удалению сахарной цепи, и Fc IgG, к которым присоединено такое соединение, как полиэтиленгликоль.

Эффективность полипептида/белка, полученного описанным выше способом, можно проверить с использованием животной модели, такой как трансгенная мышь, как описано ниже. Любое статистически значимое увеличение экспрессии ИЛ-33 базофилами или экспрессии рецептора FcγRIIB на эффекторных макрофагах в условиях *in vivo* указывает на то, что полипептид/белок является кандидатом для

лечения расстройств, упомянутых ниже. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения описанные выше количественные способы исследований могут быть основаны на измерении связывания с белком DC-SIGN или клетками DC-SIGN⁽⁺⁾. В данной области техники известны различные методики, доступные специалисту в данной области техники, которые являются подходящими для измерения способности соединения связываться с DC-SIGN или клетками DC-SIGN⁽⁺⁾ и установления корреляции с изменениями экспрессии гена, регулируемого путем передачи сигналов с участием DC-SIGN, например, ИЛ-33. Специалист в данной области техники сможет комбинировать и сравнивать различные исследовательские инструменты без проведения излишних экспериментов. После очистки и исследования с помощью стандартных способов или в соответствии с количественными способами исследований и способами, описанными в приведенных ниже примерах, несиалированные варианты Fc IgG могут быть включены в состав фармацевтической композиции для лечения воспалительных заболеваний.

В настоящей заявке термин "антитело" используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител до тех пор, пока они проявляют желаемую биологическую активность.

В настоящей заявке "фрагменты антител" могут включать часть интактного антитела, обычно включая антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или область Fc антитела, которая сохраняет способность связываться с FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты антител предпочтительно сохраняют по меньшей мере часть шарнирной области и необязательно область C_H1 тяжелой цепи IgG. Более предпочтительно фрагменты антител сохраняют всю константную область тяжелой цепи IgG и содержат легкую цепь IgG.

В настоящей заявке термин "фрагмент Fc" или "Fc-область" используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. "Область Fc" может представлять собой нативную последовательность области Fc или вариант области Fc. Несмотря на то, что границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как участок аминокислотной последовательности от остатка аминокислоты в положении Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца.

"Нативная последовательность области Fc" содержит аминокислотную последовательность, идентичную природной аминокислотной последовательности области Fc. Специалист в данной области техники поймет, что "вариант области Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области Fc по меньшей мере одной "модификацией аминокислоты". Предпочтительно вариант области Fc содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты по сравнению с нативной последовательностью области Fc или областью Fc исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти замен аминокислот, предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти замен аминокислот в нативной последовательности области Fc или области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc согласно настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 75 или 80% гомологичен нативной последовательности области Fc и/или области Fc исходного полипептида, более предпочтительно степень гомологии составляет по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99%.

Термины "рецептор Fc" или "FcR" используются для описания рецептора, который связывается с областью Fc антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения FcR представляет собой нативную последовательность FcR человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения FcR, включая FcR человека, связывается с антителом IgG (γ -рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга указанных рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор в Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); FcR рассматриваются в работах Ravetch and Kinet, *Annu Rev Immunol*, 9, 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4, 25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab Clin Med*, 126, 330-41 (1995), Nimmerjahn and Ravetch 2006, *Ravetch Fc Receptors in Fundamental Immunology*, ed William Paul 5th Ed., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки).

Термин "нативный" или "исходный" относится к немодифицированному полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность Fc. Исходный полипептид может содержать нативную последовательность Fc или область Fc с ранее существовавшими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, удаления и/или замены).

Композиции.

В область настоящего изобретения включена композиция, которая содержит подходящий носитель и один или более агентов, описанных выше, таких как несиалированные варианты Fc IgG. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, или косметическую композицию, которая содержит косметически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает указанную композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения в условиях *in vivo* или *ex vivo*. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" подразумевает, что после введения или нанесения указанного носителя субъекту он не вызывает нежелательных физиологических эффектов. Носитель в фармацевтической композиции также должен быть "приемлемым", исходя из его совместимости с активным ингредиентом, и может быть способен стабилизировать его. Один или более солибилизирующих агентов можно применять в качестве фармацевтических носителей для доставки активного соединения. Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают, но не ограничиваются ими, биосовместимые носители, адьюванты, добавки и разбавители для получения композиции, которую можно применять в качестве лекарственной формы. Примеры других носителей включают коллоидный оксид кремния, стеарат магния, целлюлозу и лаурилсульфат натрия.

Описанная выше композиция в любой из описанных выше форм может быть использована для лечения расстройств, характеризующихся воспалением. Эффективное количество относится к количеству активного вещества/агента, которое требуется для достижения терапевтического эффекта у субъекта, которого лечат. Эффективные дозы будут варьироваться, как общепризнано специалистами в данной области техники, в зависимости от типов заболеваний, которые лечат, пути введения, использования вспомогательных веществ, а также возможности совместного использования с другими способами терапевтического воздействия.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить парентерально, перорально, назально, ректально, местно или буккально. В настоящей заявке термин "парентеральный" относится к подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, внутриартериальной, внутрисиновиальной, интратеральной, интратекальной, внутриочаговой или внутричерепной инъекции, а также любым подходящим методикам инфузии.

Стерильная композиция для инъекций может представлять собой раствор или суспензию в нетоксичном разбавителе или растворителе, подходящем для парентерального введения. Подходящие растворы включают, но не ограничиваются ими, 1,3-бутандиол, маннит, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Помимо этого в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют нелетучие масла (например, синтетические моно- или диглицериды). Жирные кислоты, включая, но не ограничиваясь ими, олеиновую кислоту и ее глицеридные производные, а также природные фармацевтически приемлемые масла, включая, но не ограничиваясь ими, оливковое масло или касторовое масло, его полиоксиэтилированные варианты, можно применять при получении инъекционных препаратов. Подходящие масляные растворы или суспензии также могут содержать разбавитель на основе длинноцепочечного спирта или диспергирующий агент, включая, но не ограничиваясь ими, карбоксиметилцеллюлозу или аналогичные диспергирующие агенты. Другие часто используемые поверхностно-активные вещества, включая, но не ограничиваясь ими, Tween® или SPAN или другие аналогичные эмульгирующие агенты или усилители биодоступности, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также могут быть использованы для изготовления композиции.

Композиция для перорального введения может представлять собой любую лекарственную форму, подходящую для перорального введения, включая капсулы, таблетки, эмульсии и водные суспензии, дисперсии и растворы. В случае таблеток часто используемые носители включают, но не ограничиваются ими, лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, добавляют смазывающие агенты, включая, но не ограничиваясь им, стеарат магния. Подходящие разбавители для перорального введения в форме капсул включают, но не ограничиваются ими, лактозу и высушенный кукурузный крахмал. При пероральном введении водных суспензий или эмульсий активный ингредиент может быть ресуспендирован или растворен в масляной фазе в комбинации с эмульгирующими или суспендирующими агентами. При необходимости могут быть добавлены некоторые подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтические композиции для местного применения в соответствии с описанным изобретением могут быть изготовлены в виде растворов, мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Согласно другому варианту реализации составы для местного введения могут быть изготовлены в виде пластырей или повязок, пропитанных активным ингредиентом(ми), которые необязательно могут содержать одно или более вспомогательных веществ или разбавителей. В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения составы для местного применения включают материал, который будет усиливать поглощение или проникновение активного агента(ов) через кожу или другие пораженные области. Композицию для местного введения можно применять для лечения воспалительных заболеваний кожи, включая, но не ограничиваясь ими, экзему, акне, розовые

угри, псориаз, контактный дерматит и реакции на отравление плющом.

Композиция для местного введения содержит безопасное и эффективное количество дерматологически приемлемого носителя, подходящего для нанесения на кожу. "Косметически приемлемая" или "дерматологически приемлемая" композиция или компонент относится к композиции или компоненту, подходящим для использования в контакте с кожей человека без чрезмерной токсичности, несовместимости, нестабильности, аллергической реакции и т.п. Носитель обеспечивает доставку активного агента и дополнительного компонента в кожу в соответствующей концентрации. Следовательно, носитель может действовать как разбавитель, диспергирующий агент, растворитель или т.п. для обеспечения нанесения и равномерного распределения активных веществ на выбранной области в соответствующей концентрации. Носитель может быть твердым, полутвердым или жидким. Носитель может быть представлен в форме лосьона, крема или геля, в частности, в такой форме, которая имеет достаточную густоту или предел текучести, чтобы предотвратить осаждение активных материалов. Носитель может быть инертным или обладать дерматологической пользой. Носитель также должен быть физически и химически совместим с активными компонентами, описанными в настоящем документе, и не должен чрезмерно нарушать стабильность, эффективность или другие преимущества использования, связанные с композицией. Композиция для местного применения может представлять собой косметический или дерматологический продукт в форме, известной в данной области техники для местного или трансдермального применения, включая растворы, аэрозоли, кремы, гели, пластыри, мази, лосьоны или пены.

Способы лечения.

В описанном изобретении предложены способы лечения воспалительного расстройства у субъекта. Термин "воспалительное расстройство" относится к расстройству, которое характеризуется патологическим или нежелательным воспалением, такому как аутоиммунное заболевание. Аутоиммунные заболевания представляют собой расстройства, характеризующиеся длительной активацией иммунных клеток в условиях, в которых они не являются активными в норме. Примеры включают псориаз, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит), ревматоидный артрит, псориатический артрит, рассеянный склероз, волчанку, сахарный диабет типа I, первичный билиарный цирроз печени и трансплантацию.

Другие примеры воспалительных расстройств, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, включают астму, инфаркт миокарда, инсульт, воспалительные дерматозы (например, дерматит, экзему, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивницу, некротизирующий васкулит, кожный васкулит, вызванный гиперчувствительностью васкулит, эозинофильный миозит, полимиозит, дерматомиозит и эозинофильный фасциит), острый респираторный дистресс-синдром, молниеносный гепатит, заболевания, связанные с гиперчувствительностью легких (например, аллергический пневмонит, эозинофильную пневмонию, гиперчувствительность замедленного типа, интерстициальную болезнь легких (ИБЛ), идиопатический легочный фиброз и ИБЛ, связанную с ревматоидным артритом) и аллергический ринит. Дополнительные примеры также включают миастению, юношеский диабет, гломерулонефрит, аутоиммунный тиреоидит, анкилозирующий спондилит, системный склероз, острые и хронические воспалительные заболевания (например, системную анафилаксию или реакции гиперчувствительности, аллергические реакции на лекарственные препараты, аллергические реакции на укусы насекомых, отторжение аллотрансплантата и реакцию "трансплантат против хозяина") и синдром Шегрена.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, опосредованного Т-клетками. В настоящей заявке термин "заболевание, опосредованное Т-клетками" относится к любому воспалительному заболеванию, которое характеризуется патологически низким уровнем регуляторных Т-клеток (T_{reg} клеток) или патологически активированными эффекторными Т-клетками. Примеры такого заболевания включают, но не ограничиваются ими, рассеянный склероз, сахарный диабет типа I, миастению, ревматоидный артрит (РА), системную красную волчанку (СКВ) и псориаз (см, например, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2012, p832).

Термин "субъект" относится к человеку и животному, отличному от человека. Примеры животного, отличного от человека, включают всех позвоночных, например млекопитающих, таких как млекопитающие, отличные от человека, приматов, отличных от человека (в частности, высших приматов), собаку, грызуна (например, мышь или крысу), морскую свинку, кошку и кролика, и животных, не относящихся к млекопитающим, таких как птицы, амфибии, рептилии и т.д. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъектом является человек. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъектом является экспериментальное животное, не относящееся к человеку, или животное, которое можно применять в качестве модели заболевания.

Субъект, который нуждается в лечении воспалительного расстройства, может быть выявлен с помощью стандартных методик диагностирования расстройства. Субъект необязательно может быть обследован для определения уровня или процентного содержания одного или более цитокинов или клеток в исследуемом образце, полученном от субъекта способами, известными в данной области техники. Если уровень или процентное содержание соответствует пороговому значению или ниже его (пороговое зна-

чение может быть получено с использованием образца от нормального субъекта), то субъект потенциально подходит для лечения, описанного в настоящем документе. Для подтверждения ингибирования или лечения можно оценить и/или проверить уровень или процентное содержание одного или более из вышеупомянутых цитокинов или клеток у субъекта после лечения.

"Лечащий" или "лечение" относится к введению соединения или агента субъекту, который страдает от расстройства, чтобы вылечить, уменьшить, облегчить, излечить, задержать начало развития, предотвратить или улучшить течение расстройства, симптома расстройства, болезненного состояния, вторичного по отношению к расстройству, или предрасположенности к расстройству.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения или агента, которое способно обеспечивать результат, желаемый с медицинской точки зрения, у субъекта, которого лечат. Способ лечения можно осуществлять в условиях *in vivo* или *ex vivo*, по отдельности или в комбинации с другими лекарственными препаратами или способами лечения. Терапевтически эффективное количество может быть введено с помощью одного или более введений, нанесений или дозировок и не предназначено для ограничения конкретного состава или пути введения.

Агент можно вводить в условиях *in vivo* или *ex vivo*, по отдельности или в комбинации с другими лекарственными препаратами или способом лечения, например, комбинированной терапией. В настоящей заявке термин "совместное введение" или "совместно введенный" относится к введению субъекту по меньшей мере двух агентов или способов лечения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения совместное введение двух или более агентов/способов лечения является одновременным. Согласно другим вариантам реализации первый агент/способ лечения вводят перед введением второго агента/способа лечения. Специалисты в данной области техники поймут, что составы и/или пути введения различных используемых агентов/способов лечения могут различаться.

При использовании подхода в условиях *in vivo* соединение или агент вводят субъекту. Как правило, соединение или агент суспендируют в фармацевтически приемлемом носителе (таком как, например, но не ограничиваясь им, физиологический солевой раствор) и вводят перорально или путем внутривенной инфузии, или впрыскивают или имплантируют подкожно, внутримышечно, интратекально, внутривентриально, ректально, вагинально, интраназально, внутрижелудочно, интратрахеально или интраплеврально.

Дозировка зависит от выбора пути введения; характера препарата; характера заболевания пациента; размера, массы, площади поверхности, возраста и пола субъекта; введения сопутствующих препаратов; и решения лечащего врача. Приемлемые дозировки находятся в диапазоне 0,01-100 мг/кг. Изменения необходимой дозировки можно ожидать с учетом различных доступных соединений/агентов и различной эффективности различных путей введения. Например, как ожидается, пероральное введение требует более высоких дозировок, чем введение путем инъекции. Изменения уровней дозировки могут быть скорректированы с использованием стандартных эмпирических процедур для оптимизации, которые хорошо известны в данной области техники. Инкапсуляция соединения в подходящем носителе для доставки (например, в полимерных микрочастицах или имплантируемых устройствах) может повысить эффективность доставки, в частности для пероральной доставки.

Примеры

Пример 1. Общие методы и материалы.

В этом примере описаны общие методы и материалы, используемые в примерах 2-8 ниже.

Мыши.

Мышей линии C57BL/6, SIGN-R1^{-/-} и SIGN-R1^{-/-} hDC-SIGN⁺, в возрасте 6-10 недель, в подобранных по полу и возрасту группах, использовали для всех экспериментов в соответствии с федеральными законами и институциональными руководящими принципами, утвержденными университетом Рокфеллера. Мышей линии SIGN-R1^{-/-} скрещивали с мышами линии CD11c-hDC-SIGN⁺, чтобы получить мышей линии SIGN-R1^{-/-}hDC-SIGN⁺. Мыши, трансгенные по рецептору KRN T-клеток, были получены на основании ядра C57BL/6 и скрещены с мышами линии NOD, чтобы получить мышей линии K/BxN (Korganow et al. *Immunity* 1999, 10(4): 451-461). K/BxN сыворотку получали путем сбора образцов крови у мышей K/BxN. Сыворотку отделяли от крови, объединяли и замораживали в аликвотах для дальнейшего использования. Для того чтобы вызвать артрит, индуцированный сывороткой, по 200 мкл объединенной сыворотки K/BxN вводили внутривентриально. Степень тяжести артрита оценивали с помощью клинического обследования лап. Суммирование индексов для всех четырех лап отражает степень тяжести заболевания. 0 - нет влияния, 1 - отек одного сустава, 2 - отек более чем одного сустава и 3 - тяжелый отек всей лапы. Во всех экспериментах использовали группы из 4-5 мышей, средние значения и стандартные ошибки среднего значения (станд. ошиб. среднего) представлены на графиках.

Реагенты и способы лечения.

IVIg (Октагам, Octapharma) и F241A (Merck) использовали в концентрациях, указанных в подписи к каждой фигуре. Препараты IVIG-Fc и IVIG-F(ab')₂ получали с помощью расщепления IVIG папаином в течение 2 ч при температуре 37°C. Десилирование IVIG и F241A проводили путем обработки нейраминидазой. 100 мг препарата антитела инкубировали с 700 Ед. нейраминидазы (NEB) в течение 20 ч при температуре 37°C. Антитела очищали с помощью аффинной очистки на белке G и подвергали диализу

против ФСБ перед инъекцией. Содержание сиаловой кислоты во всех препаратах антител проверяли с помощью блоттинга лектина из *Sambucus nigra* (SNA) с использованием SNA-биотина (Vector Laboratories). Все препараты IVIG и F241A вводили внутривенно (в/в).

Базофилы истощали путем ежедневных внутрибрюшинных инъекций 10 мкг антитела к FcεRI (MAR-1, eBioscience) или IgG хомяка для контроля изотипа (Sigma) в течение последовательных 4 дней.

T_{reg} клетки истощали путем внутрибрюшинного введения 400 мкг антитела к CD25 (Setiady et al., Eur. J. Immunol. 2010, 40(3): 780-786) (PC61, BioXcell) за 3 дня до индукции ЭАЭ, а также через один день после каждой инъекции IVIG/F241A до конца эксперимента.

Рецептор ИЛ-33, ST2, блокировали путем внутривенных инъекций 100 мкг антитела к T1/ST2 (DJ8, MD Biosciences) на 0-й день, а также каждый пятый день после индукции ЭАЭ.

Для лечения цитокинами мыши однократно получали внутривенную инъекцию 2,5 мкг ИЛ-4_{ic} (Peprotech) или 0,5 мкг ИЛ-33 в/б в течение 4 дней подряд или каждые два дня в экспериментах с индукцией ЭАЭ.

Концентрацию ИЛ-6 в сыворотке крови измеряли с помощью количественного исследования захвата цитокинов в условиях *in vivo* (см. Finkelman et al., Curr Protoc Immunol 2003, Chapter 6: Unit 6.28). ИЛ-33 в супернатантах культур клеток детектировали и измеряли с помощью ИФА, соответственно, в соответствии с инструкциями изготовителя (eBioscience).

Проточная цитометрия.

Для того чтобы исследовать лимфоциты и клетки костного мозга, суспензии отдельных клеток получали из селезенки, лимфатических узлов и костного мозга. После лизиса эритроцитов клетки окрашивали соответствующими антителами и исследовали с использованием FACSCalibur (BD Biosciences). Антитела, используемые для окрашивания мышинных клеток, включали антитело к CD4 (GK1.5), антитело к Foxp3 (FJK-16s), антитело к ИФН γ ; (XMG1.2) от eBiosciences, антитело к CD25 (PC61), антитело к ИЛ-17A (TC11-18H10.1), антитело к CD209 (9E9A8), антитело к Helios (22F6), антитело к CD11c (N418), антитело к F4/80 (BM8) от BioLegend и антитело к T1/ST2 (MD Biosciences).

Дифференцировка макрофагов, полученных из костного мозга, и их перенос.

Клетки костного мозга выделяли из бедренных и большеберцовых костей, культивировали в 10-см планшетах в среде DMEM с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки, 2% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen), 1% L-глутамин 200 мМ (Invitrogen), 0,1% β -меркаптоэтанола и М-КСФ (40 нг/мл, Peprotech) в течение 5-7 дней при 37°C. Проточную цитометрию использовали для исследования макрофагов, полученных из костного мозга (МКМ), в клеточных культурах (>90% CD11b⁺ F4/80⁺ клеток). Клетки выделяли из планшетов, промывали, высевали в свежие культуральные планшеты и затем активировали ФСБ, IVIG (15 мг/мл) или F241A (80 мкг/мл) в течение 3 ч при температуре 37°C. Клетки затем интенсивно промывали и 1×10⁶ макрофагов вводили внутривенно мышам-реципиентам. Через час после переноса мышей иммунизировали сывороткой К/ВхN.

Количественная ПЦР в режиме реального времени.

Общую РНК выделяли из макрофагов, полученных из костного мозга, с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) и подвергали обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen). Количественную ПНП проводили для измерения уровней мРНК ИЛ-33 с использованием термостабируемого ДНК-амплификатора C1000 Touch™ (BioRad) с наборами праймеров для ИЛ-33 (5'-TCACTGCAGGAAAGTACAGCA-3' (прямой, SEQ ID NO: 4) и 5'-AGTAGCACCTGGTCTTGCTC-3' (обратный, SEQ ID NO: 5)) и GAPDH (5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3' (прямой, SEQ ID NO: 6) и 5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (обратный, SEQ ID NO: 7)). Уровни экспрессии генов рассчитывали путем нормирования к уровням мРНК GAPDH.

Дифференцировка T_{reg} клеток в условиях *in vitro*.

Суспензии отдельных клеток получали из селезенки и лимфатических узлов наивных мышей линии C57BL/6 дикого типа. Наивные CD4⁺ Т-клетки выделяли с помощью магнитной сепарации клеток (Miltenyi Biotec) и культивировали в течение 3 дней в среде RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen), 1% L-глутамин 200 мМ (Invitrogen) и 0,1% β -меркаптоэтанола, антитела к CD3 (17A2, eBioscience) и антитела к CD28 (37.51, eBioscience) в 24-луночных культуральных планшетах, которые были покрыты антителом к IgG хомяка (MP Bio). Для дифференцировки T_{reg} клеток добавляли ФРО- β (2,5 нг/мл, Peprotech). ИЛ-33 (1 нг/мл, BioLegend) или ИЛ-23 (20 нг/мл, Peprotech) добавляли к культурам клеток, как указано на подписи к фигуре. На 3-й день клетки выделяли и T_{reg} клетки (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) исследовали методом проточной цитометрии.

Колит, индуцированный переносом Т-клеток.

Для того чтобы вызвать колит, индуцированный переносом Т-клеток, 5×10⁵ наивных CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻ Т-клеток от мышей линии C57BL/6 дикого типа отсортировывали и инъецировали мышам-реципиентам C57BL/6 Rag1^{-/-}. Потерю массы тела измеряли два раза в неделю и использовали в качестве меры для оценки степени тяжести заболевания.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.

Мышей линии C57BL/6, SIGN-R1^{-/-} или SIGN-R1^{-/-}hDC-SIGN⁺, в возрасте 6-8 недель, иммунизировали путем подкожного введения 200 мкл эмульсии, содержащей 200 мкг пептида MOG35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, AnaSpec, SEQ ID NO: 8), эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (Difco Laboratories). На 0 и 2 день мыши получали внутривнутрибрюшинно 200 мкг коклюшного токсина (List Biological). Развитие заболевания контролировали ежедневно в соответствии со следующими критериями: 0 - нет клинических признаков; 0,5 - частично обездвиженный хвост; 1 - парализованный хвост; 2 - потеря координированного движения; парез задних конечностей; 2,5 - парализована одна задняя конечность; 3 - парализованы обе задние конечности; 3,5 - задние конечности парализованы и выгнута спина; 4 - сильно выгнута спина и слабость передних конечностей; 4,5 - передние конечности парализованы; 5 - агония (Stromnes et al., Nat Protoc 2006, 1(4): 1810-1819).

Пример 2. F241A имитирует сталированную Fc IgG и защищает от воспаления, индуцированного аутоантителами.

Кристаллические структуры несиалированных и сталированных молекул IgG имеют различную ориентацию тяжелых цепей. В то время как несиалированный IgG (G0F-форма) остается в открытой конформации и обеспечивает структуру, способную взаимодействовать с рецепторами Fc I типа, сталированный IgG (G2FS2-форма) является более гибким, что обеспечивает альтернативные конформации (открытую и закрытую) (Ahmed et al., J. Mol. Biol. 2014, 426(18): 3166-3179), это позволяет ему связываться с рецепторами Fc II типа (Sondermann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110(24): 9868-9872). Как показано на фиг. 1a, ароматические боковые цепи F241 в несиалированной структуре Fc расположены стопками по отношению друг к другу (фиг. 1a, левая панель). В этой ориентации боковые цепи фенилаланина вступают в гидрофобное взаимодействие с остатками сахара в α 1,3-плече гликана Fc. Удивительным фактом является то, что ароматическое кольцо F241 в сialiрованной структуре Fc способно к вращению почти на 90° по сравнению с ароматическим кольцом F241 в несиалированной структуре Fc (фиг. 1a, правая панель). Это свидетельствует о том, что при сialiровании взаимодействие между F241 и α 1,3-плечом гликана Fc может быть нарушено, что потенциально вносит вклад в наблюдаемые изменения структуры и функции антител.

Следовательно, чтобы имитировать такое разрушение при взаимодействии белок-гликан, авторы настоящего изобретения ввели точечную мутацию в остаток F241, заменив его аланином (F241A), и определили, как указанная мутация изменила активность сialiрованной и несиалированной Fc. Авторы настоящего изобретения получили α 2,6-сialiрованные Fc F241A путем экспрессии рекомбинантного белка в клетках 293, стабильно гиперэкспрессирующих гликозилтрансферазы ST6GalI и β 4GalT1. Для сравнения фракцию сialiрованного препарата F241A Fc затем обрабатывали нейраминидазой для удаления сиаловой кислоты с получением несиалированной F241A Fc. Авторы настоящего изобретения подтвердили сialiрование обоих препаратов F241A Fc с помощью блоттинга лектина. Затем авторы настоящего изобретения подтвердили, что сialiрованная F241A Fc сохраняла DC-SIGN-связывающую активность при исследовании методом ИФА, о чем свидетельствовала повышенная аффинность связывания с рецептором, по сравнению с несиалированной Fc дикого типа (фиг. 8). Однако обработка F241A Fc нейраминидазой не устраняла связывание с DC-SIGN, это указывает на то, что мутация F241A придает способность связываться с DC-SIGN, независимо от присутствия сиаловой кислоты.

Для того чтобы определить, приводит ли мутация F241A к функциональному связыванию с DC-SIGN и передаче сигналов, авторы настоящего изобретения исследовали способность F241A и sFc индуцировать экспрессию ИЛ-33 в полученных из костного мозга макрофагах (МКМ), экспрессирующих DC-SIGN. Только sFc индуцирует экспрессию ИЛ-33 в указанных клетках, в то время как сialiрованная и несиалированная F241A Fc индуцировала экспрессию ИЛ-33 в МКМ DC-SIGN-зависимым образом (фиг. 1b). Помимо этого hDC-SIGN⁺ МКМ, стимулированные несиалированной F241A Fc, а также sFc, подавляли отек подушечек лап при переносе мышам, иммунизированным артритогенной сывороткой K/BxN DC-SIGN-зависимым способом (фиг. 1c). Помимо этого защитное действие было достигнуто только при использовании сialiрованной Fc дикого типа, тогда как мутированный вариант F241A Fc обеспечивал защиту мышам даже в несиалированной форме (фиг. 1d). Следовательно, мутация F241A имитирует несколько функций Fc в количественных исследованиях, разработанных для измерения активности сialiрованной Fc.

Для дальнейшего определения активности F241A в качестве противовоспалительной молекулы авторы настоящего изобретения иммунизировали мышам линии C57BL/6 дикого типа сывороткой K/BxN и вводили им ФСБ, ИЛ-4ic или несиалированную F241A (0,033 г/кг). Уровни ИЛ-6 в сыворотке крови были значительно снижены у мышам, которые получали ИЛ-4ic или F241A (фиг. 2a). В соответствии с этим наблюдением мышам, получавшим ИЛ-4ic и F241A, имели уменьшенные клинические проявления артрита (фиг. 2b), это свидетельствует о том, что область F241A Fc подходит для подавления воспаления, аналогично IVIG и sFc (Kaneko et al., Science 2006, 313(5787): 670-673, и Anthony et al., Science 2008, 320(5874): 373-376).

Для того чтобы подтвердить, что подавление в результате действия F241A зависит от FcR II типа,

авторы настоящего изобретения использовали мышей-реципиентов SIGN-R1^{-/-} или SIGN-R1^{-/-}hDC-SIGN⁺. Мыши получали сиалированную Fc дикого типа или несиалированную F241A, обработанную нейраминидазой (обе в концентрации 0,033 г/кг), и были иммунизированы сывороткой K/BxN. Оба препарата подавляли артритное воспаление; однако защитное действие наблюдали только у мышей, которые экспрессируют ВАС трансген, DC-SIGN человека (hDC-SIGN⁺) (фиг. 2с), это свидетельствует о том, что присутствие рецептора Fc II типа - SIGN-R1 или его ортолога у человека, DC-SIGN, соответственно, требуется для иммуномодулирующего эффекта, индуцированного сиалированной Fc и F241A.

Сиаловая кислота может быть присоединена к предпоследнему остатку галактозы сложного двух-антенного гликана Fc в любой из конформаций α 2,3, α 2,6 или α 2,8. Авторы настоящего изобретения ранее сообщили, что только α 2,6-соединенные гликоформы сиаловой кислоты являются биологически активными (Anthony et al., Science 2008, 320(5874): 373-376). Предыдущие данные моделирования при структурном анализе различных сиалированных форм Fc (Sondermann et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 2013, 110(24): 9868-9872) позволили спрогнозировать, что карман Glu318/Lys340 на границе раздела C γ 2-C γ 3 был необходим для биологической активности α 2,6-сиалированной Fc и мог специфичным образом вместить в себя указанную гликоформу, в то время как проникновение в этот карман α 2,3-соединенной сиаловой кислоты будет стерически ингибироваться. Для того чтобы проверить это предположение, авторы настоящего изобретения ввели точечную мутацию E318N в Fc IgG1 и сравнивали свойства α 2,6-сиалированной формы Fc с α 2,6-сиалированной Fc дикого типа. Несмотря на то, что степень сиалирования мутированного варианта была сопоставима с таковой для дикого типа, только сиалированная Fc дикого типа стимулировала экспрессию ИЛ-33 в hDC-SIGN⁺ МКМ (фиг. 9а). Мыши, получавшие МКМ, стимулированные α 2,6-сиалированной Fc дикого типа, но не α 2,6-сиалированной E318N Fc, имели уменьшенные клинические проявления заболевания (фиг. 9б), а также более низкие уровни ИЛ-6 (фиг. 3с). В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что остатки F241 и E318 вносят вклад в противовоспалительную активность α 2,6-сиалированной Fc.

Пример 3. Сиалированная Fc/F241A активизирует T_{рег} клетки.

Результаты недавних исследований с участием пациентов и на животных моделях указывают на то, что введение IVIG может привести к пролиферации T_{рег} клеток (Ephrem et al., Blood 2008, 111(2): 715-722, и Ваугу J. et al., Rheumatol, vol. 39: Canada, 2012, pp. 450-451), эффективно подавляя аутоиммунные реакции, зависящие от Т-клеток, за счет увеличения количества и подавляющей активности T_{рег} клеток (Kessel et al., J. Immunol. 2007, 179(8): 5571-5575). Чтобы определить, какой компонент препарата IVIG может определять обнаруженный эффект, авторы настоящего изобретения использовали препараты IVIG (1 г/кг), F(ab')₂ (0,66 г/кг) или Fc (0,33 г/кг) и вводили их внутривенно в эквивалентных концентрациях мышам линии C57BL/6 дикого типа. Через четыре дня после инъекции авторы настоящего изобретения исследовали процентное содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{рег} клеток селезенки методом проточной цитометрии. По сравнению с мышами, получавшими ФСБ, введение интактного IVIG или его фрагмента Fc привело к двукратному увеличению пролиферации T_{рег} клеток и было устранено с помощью IVIG-F(ab')₂ (фиг. 3а).

Далее авторы настоящего изобретения определили роль сиалирования Fc в пролиферации T_{рег} клеток при текущей воспалительной реакции. K/BxN-иммунизированным мышам линии C57BL/6 вводили ФСБ, IVIG (1 г/кг), обработанный нейраминидазой несиалированный IVIG (NA-IVIG) (1 г/кг) или F241A (0,033 г/кг) и оценивали прогрессирование заболевания и пролиферацию T_{рег} клеток. Как было обнаружено ранее (Schwab et al., Eur. J. Immunol. 2014, 44(5): 1444-1453, и Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113), клинические оценки степени тяжести артрита выявили, что IVIG и F241A, но не несиалированный IVIG, защищали мышей от артрита (фиг. 3б). Пролиферацию T_{рег} клеток наблюдали у мышей, получавших IVIG и F241A, но не у мышей, получавших несиалированный IVIG (фиг. 3с), это свидетельствует о том, что сиалированная Fc и F241A селективно активируют пролиферацию подкласса T_{рег} клеток соответственно.

Пример 4. IVIG/F241A-активированные T_{рег} клетки подавляют CD4⁺ Т-клеточные реакции.

Для того чтобы оценить, может ли пролиферация T_{рег} клеток в ответ на IVIG/F241A подавлять CD4⁺ Т-клеточные реакции, авторы настоящего изобретения индуцировали ЭАЭ у мышей линии C57BL/6 дикого типа путем иммунизации пептидом MOG₃₅₋₅₅, эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда. Через пять дней после индукции мыши получали ФСБ, IVIG или NA-IVIG (оба в концентрации 1 г/кг), чтобы установить различие между эффектами, специфично инициированными сиалированным IgG. Клинические оценки ЭАЭ у мышей, которые получали IVIG, были значительно снижены по сравнению с мышами, получавшими ФСБ (фиг. 4а). Однако защитное действие было подавлено при введении несиалированного IVIG (NA-IVIG). Для того чтобы определить потенциальную механистическую основу указанного эффекта, авторы настоящего изобретения охарактеризовали клетки из дренирующих лимфатических узлов обработанных животных и исследовали процентное содержание эффекторных CD4⁺ Т-клеток. Все субпопуляции эффекторных CD4⁺ Т-клеток, T_H1 (ИФН- γ ⁺), T_H17 (ИЛ-17А⁺) и ИФН- γ ⁺ ИЛ-17А⁺ CD4⁺ Т-клетки, присутствовали в аналогичном процентном содержании (фиг. 4б); однако процентное содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{рег} клеток было значительно повышено у мышей, которые получали IVIG, по

сравнению с группами, получавшими ФСБ или NA-IVIG (фиг. 4с).

Для того чтобы оценить, может ли активация и пролиферация T_{reg} клеток специфично обуславливать защиту от заболевания, авторы настоящего изобретения исследовали защитный потенциал F241A в качестве суррогата IVIG у необработанных мышей и мышей с истощенной популяцией T_{reg} клеток. T_{reg} клетки истощали путем введения антитела к CD25 (PC61). Мыши, получавшие F241A (0,033 г/кг), были защищены, по сравнению с мышами, получавшими ФСБ (фиг. 4d), это свидетельствовало о том, что защитное действие F241A от Т-клеточных ответов было сопоставимо с таковым IVIG. Однако у мышей с истощенной популяцией T_{reg} клеток защитное действие было существенно снижено. Результаты исследования методом проточной цитометрии выявили, что ни лечение F241A, ни лечение PC61 существенно не влияет на эффекторные $CD4^+$ Т-клетки (фиг. 4е), тогда как уровни T_{reg} клеток снижались в результате лечения PC61 (фиг. 4f). Следовательно, истощение T_{reg} клеток коррелирует с потерей защиты от ЭАЭ, наблюдаемой у F241A-обработанных животных. Для того чтобы установить различие между природными (nT_{reg}) и индуцируемыми T_{reg} (iT_{reg}) клетками, авторы настоящего изобретения исследовали T_{reg} клетки у IVIG- и ФСБ-обработанных мышей с ЭАЭ для оценки экспрессии $nTreg$ -специфического фактора транскрипции Helios (Thornton et al., J. Immunol. 2010, 184(7): 3433-3441). Пролиферация T_{reg} клеток не коррелировала с увеличением экспрессии Helios (фиг. 10с), это свидетельствует о том, что IVIG (1 г/кг), который определенно защищал мышей от ЭАЭ (фиг. 10а и b), специфично индуцирует $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Helios⁻ индуцируемые T_{reg} ($iTreg$) клетки.

В совокупности полученные результаты указывают на то, что стабилизированный IVIG, а также F241A приводят к активации и пролиферации T_{reg} клеток, что вызывает подавление реакций эффекторных $CD4^+$ Т-клеток и клинического заболевания при ЭАЭ.

Пример 5. Рецепторы Fc II типа необходимы для sFc-опосредованной защиты от ЭАЭ.

Потребность в присутствии рецепторов Fc II типа SIGN-R1 и hDC-SIGN для sFc-индуцированного подавления воспаления интенсивно изучали применительно к заболеваниям, опосредованным аутоантителами, и стимуляции выработки ИЛ-33 (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113). В этой связи авторы настоящего изобретения исследовали зависимость sFc-опосредованной стимуляции T_{reg} клеток от присутствия рецептора Fc II типа, SIGN-R1. ЭАЭ индуцировали у мышей линии C57BL/6 дикого типа или мышей линии SIGN-R1^{-/-}, и затем мышам вводили IVIG (1 г/кг) или ФСБ в качестве контроля. Несмотря на то, что IVIG защищал мышей дикого типа от ЭАЭ, защитный эффект был значительно снижен у мышей с подавленным геном SIGN-R1 (фиг. 5а). Это согласуется с наблюдениями, что у мышей линии SIGN-R1^{-/-} IVIG (1 г/кг) не защищает от К/ВхN-индуцированного артрита (фиг. 11а) или индуцированной активации T_{reg} клеток (фиг. 11b). Напротив, если уровни ИЛ-33 восстанавливали путем введения экзогенного ИЛ-33, мыши линии SIGN-R1^{-/-} были частично защищены от ЭАЭ (фиг. 5b), что было связано с увеличением числа T_{reg} клеток (данные не приведены). Аналогичным образом, экспрессия трансгена hDC-SIGN дополняет потерю SIGN-R1 (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113) и приводит к снижению клинических оценок ЭАЭ у мышей, получавших IVIG (1 г/кг) и F241A (0,033 г/кг) (фиг. 5с и d).

Пример 6. ИЛ-33 является важнейшим медиатором sFc-индуцированной активации T_{reg} клеток.

Активация FcγRIIB на эффекторных макрофагах под действием сialiрированной Fc существенно зависит от выработки и секреции алармина ИЛ-33 (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113). Более того, недавно полученные результаты указывают на то, что ИЛ-33 сам по себе оказывает положительное влияние на стимуляцию и активацию T_{reg} клеток (Turnquist et al., J. Immunol. 2011, 187(9): 4598-4610, и Matta et al., J. Immunol. 2014, 193(8): 4010-4020) и способствует тем самым подавлению воспаления в мышинной модели экспериментального колита (Schiering et al., Nature 2014, 513(7519): 564-568). Чтобы исследовать возможность того, что sFc-индуцированная выработка ИЛ-33 также может способствовать стимуляции T_{reg} клеток, авторы настоящего изобретения наблюдали наивные $CD4^+$ Т-клетки, которые выделяли у мышей линии C57BL/6 дикого типа, и культивировали в течение трех дней в присутствии антитела к CD3, антитела к CD28 и ФРО-β, чтобы специфично индуцировать дифференцировку T_{reg} клеток. Клетки оставляли необработанными или обрабатывали комбинацией ИЛ-33 и ИЛ-23. Результаты исследования процентного содержания $CD4^+Foxp3^+$ T_{reg} клеток в культурах методом проточной цитометрии выявили, что добавление ИЛ-33 оказывало синергическое действие на дифференцировку T_{reg} клеток, а также на экспрессию Foxp3 (фиг. 12), как ранее сообщалось Schiering et al. (Schiering et al., Nature 2014, 513(7519): 564-568). Помимо этого ИЛ-33 индуцировал активацию рецептора ИЛ-33, ST2, на T_{reg} клетках. Добавление ИЛ-23 к культуре T_{reg} клеток препятствовало действию ИЛ-33 (фиг. 12), это согласуется с тем фактом, что ИЛ-23 является отрицательным регулятором ST2 (Schiering et al., Nature 2014, 513(7519): 564-568, и Izcue et al., Immunity 2008, 28(4): 559-570).

Далее авторы настоящего изобретения определили, влияет ли введение ИЛ-33 на T_{reg} клетки в условиях *in vivo*. ИЛ-33 (0,5 мкг) вводили мышам линии C57BL/6 дикого типа ежедневно в течение четырех дней подряд. На пятый день селезенки исследовали для определения количества T_{reg} клеток. Введение ИЛ-33 привело к значительному увеличению количества T_{reg} клеток по сравнению с ФСБ-обработанными контрольными мышами (фиг. 6а и b). hDC-SIGN⁺ МКМ активировали с использованием ФСБ, IVIG или несialiрированной F241A, и экспрессию ИЛ-33 измеряли с помощью количественной ОТ-

ПЦР, полученные результаты выявили, что IVIG и F241A определенно индуцировали экспрессию ИЛ-33 DC-SIGN-зависимым образом (фиг. 6с). После обработки МКМ переносили мышам линии C57BL/6 дикого типа. Через пять дней после переноса клеток только мыши, которые получали IVIG- или F241A-стимулированные hDC-SIGN⁺ МКМ, имели значительно более высокие уровни T_{reg} клеток (фиг. 6d и e). Этот фенотип коррелирует с повышенной экспрессией рецепторов ИЛ-33, ST2, на указанных клетках (фиг. 6d). Помимо этого лечение ЭАЭ с использованием ИЛ-33 привело к значительному ослаблению симптомов ЭАЭ, которое коррелировало с увеличением количества T_{reg} клеток в дренирующих лимфатических узлах (фиг. 6f и g).

Поскольку было продемонстрировано, что активация FcγRIIB на эффекторных макрофагах требует присутствия базофилов (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113), авторы настоящего изобретения также исследовали, участвуют ли базофилы в sFc-опосредованном пути активации T_{reg} клеток. Мыши получали ФСБ или IVIG (1 г/кг) и были иммунизированы сывороткой K/VxN. Мыши также получали антитело к FcεRI для истощения базофилов или антитело для контроля изотипа (Sokol et al., Nat. Immunol. 2008, 9(3): 310-318). Хотя авторы настоящего изобретения ранее показали (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113), что истощение базофилов (фиг. 13a) нарушало защитное действие IVIG в модели артрита, индуцированного K/VxN (фиг. 13b), способность IVIG вызывать пролиферацию T_{reg} клеток не была затронута (фиг. 13с). Это указывает на то, что ИЛ-33 необходим для активации T_{reg} клеток; однако базофилы не принимают участия в этом пути.

Пример 7. sFc/F241A активирует индуцируемые T_{reg} клетки с помощью оси ИЛ-33/ST2.

Для дальнейшего изучения механизма пролиферации и активации T_{reg} клеток в ответ на sFc и связывание с FcR II типа, авторы настоящего изобретения сосредоточили усилия на выяснении роли рецептора ИЛ-33, ST2. Как недавно сообщалось, результаты, полученные у K/VxN-иммунизированных мышей, которым вводили ФСБ или IVIG (1 г/кг) по отдельности или в комбинации с блокирующим антителом к ST2, выявили, что блокирование рецепторов ИЛ-33 снижает защитный эффект IVIG в модели артрита, индуцированного переносом сыворотки (Anthony et al., Nature 2011, 475(7354): 110-113) (фиг. 7a). Исследование количества T_{reg} клеток методом проточной цитометрии у указанных мышей выявило, что ингибирование передачи сигналов с участием ИЛ-33 также устраняло пролиферацию T_{reg} клеток (фиг. 7b). Аналогичные результаты наблюдали в модели ЭАЭ, в которой терапевтическое действие F241A (0,033 г/кг) было значительно уменьшено путем блокирования рецептора ИЛ-33 (фиг. 7с) с сопутствующим уменьшением пролиферации T_{reg} клеток (фиг. 7d).

Наконец, чтобы установить общность наблюдений о влиянии sFc на заболевания, опосредованные T-клетками, авторы настоящего изобретения использовали экспериментальную модель колита мышей и обрабатывали мышей еженедельно с использованием IVIG (1 г/кг) или ФСБ в качестве контроля, начиная через четыре недели после переноса T-клеток и до конца эксперимента. Потерю массы тела использовали в качестве меры степени тяжести заболевания, при этом было установлено, что введение IVIG обладало защитным действием (фиг. 14a, с и d), и также сопровождалось значительным обогащением T_{reg} клеток (фиг. 14b), в то время как уровень эффекторных CD4⁺ T-клеток был сопоставим с таковым для групп, получавших ФСБ и IVIG. На основании того факта, что для индукции острого колита адаптивно переносили только CD4⁺CD25⁻ T-клетки, T_{reg} клетки мышей, пролиферация которых была вызвана IVIG, возникли из периферических CD4⁺ T-клеток и, следовательно, представляют собой iT_{reg} клетки.

Приведенные примеры и описание предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения следует рассматривать в качестве иллюстративных и не ограничивающих объем настоящего изобретения, определенный в формуле изобретения. Все публикации, процитированные в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Следует понимать, что многочисленные варианты и комбинации признаков, изложенные выше, могут быть использованы без отступления от объема настоящего изобретения, изложенного в формуле изобретения. Такие варианты не рассматриваются как отступления от объема настоящего изобретения, и подразумевается, что все такие варианты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение выделенного полипептида, содержащего модифицированную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична SEQ ID NO: 1, причем указанная модифицированная последовательность содержит мутацию F на A в положении, соответствующем F32 последовательности SEQ ID NO: 1 ("мутацию FA241"), или соответствующую консервативную замену, в производстве лекарственного средства для повышения уровня регуляторных T-клеток (T_{reg}) у субъекта.
2. Применение по п.1, отличающееся тем, что субъект страдает воспалительным заболеванием.
3. Применение по п.2, отличающееся тем, что указанное воспалительное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.
4. Применение по п.3, отличающееся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой опосредованное T-клетками аутоиммунное заболевание.
5. Применение по п.4, отличающееся тем, что указанное опосредованное T-клетками аутоиммунное

заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза и сахарного диабета типа I.

6. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанный выделенный полипептид способен связываться с DC-SIGN, hFcγRIIA или hFcγRIIB, и при этом указанный выделенный полипептид способен связываться с hFcγRIIA или hFcγRIIB с K_D , составляющей 2×10^{-5} М или ниже (т.е. K_A , составляющей $5,0 \times 10^4$ М⁻¹ или выше).

7. Применение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность (а) по существу не содержит сиалирования или (б) сиалирована на уровне ниже уровня сиалирования IgG у субъекта.

8. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

9. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 75% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

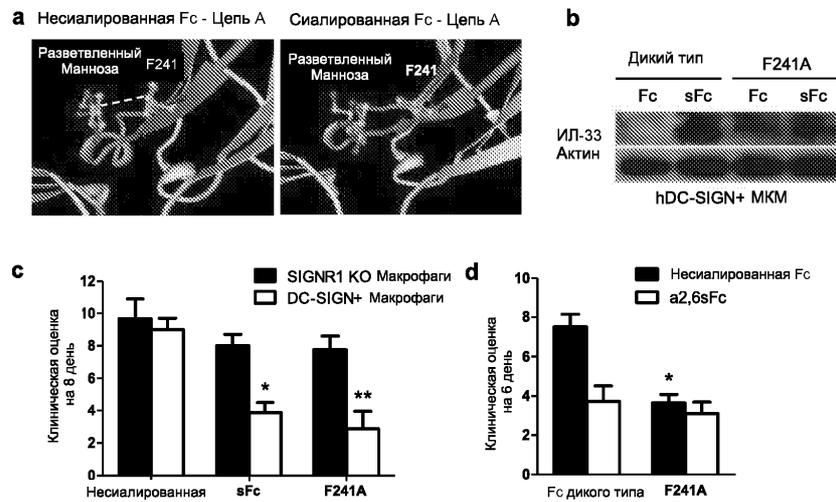
10. Применение выделенного полипептида, содержащего модифицированную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична SEQ ID NO: 1, причем модифицированная последовательность содержит мутацию F на A в положении, соответствующем F32 последовательности SEQ ID NO: 1 ("мутацию FA241"), или соответствующую консервативную замену, в производстве лекарственного средства для лечения опосредованного Т-клетками аутоиммунного заболевания у субъекта.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что указанный выделенный полипептид способен связываться с DC-SIGN, hFcγRIIA или hFcγRIIB, и при этом указанный выделенный полипептид способен связываться с hFcγRIIA или hFcγRIIB с K_D , составляющей 2×10^{-5} М или ниже (т.е. K_A , составляющей $5,0 \times 10^4$ М⁻¹ или выше).

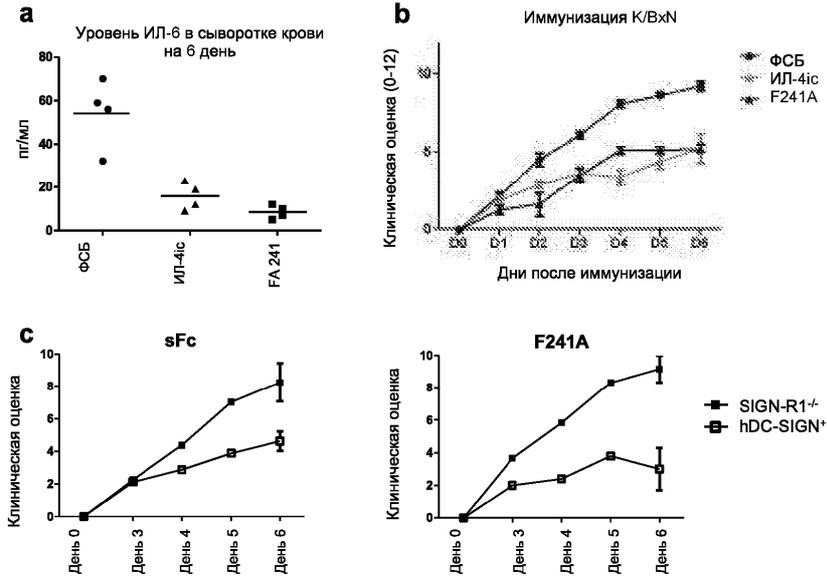
12. Применение по любому из пп.10, 11, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность (а) по существу не содержит сиалирования или (б) сиалирована на уровне ниже уровня сиалирования IgG у субъекта.

13. Применение по любому из пп.10-12, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

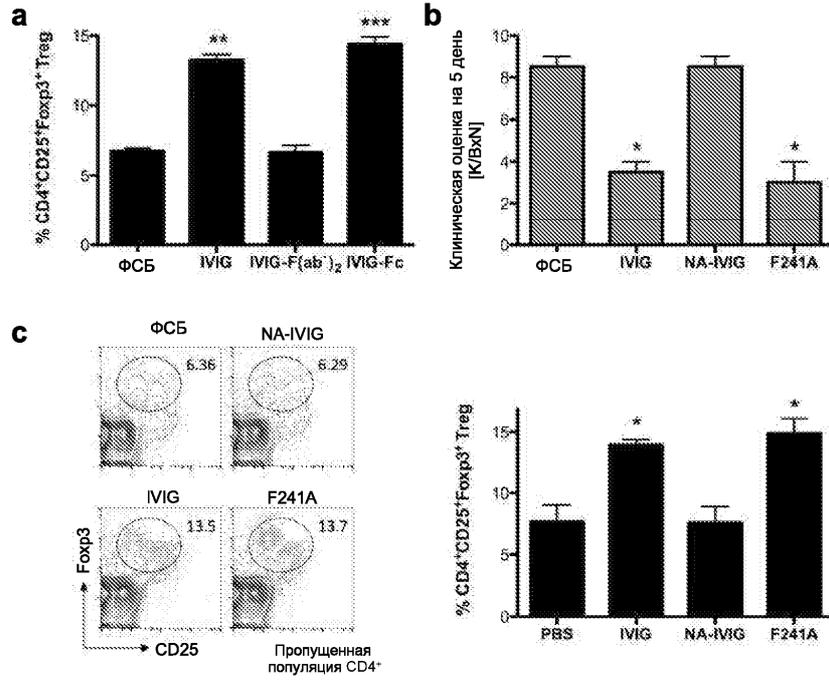
14. Применение по любому из пп.10-12, отличающееся тем, что указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 75% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.



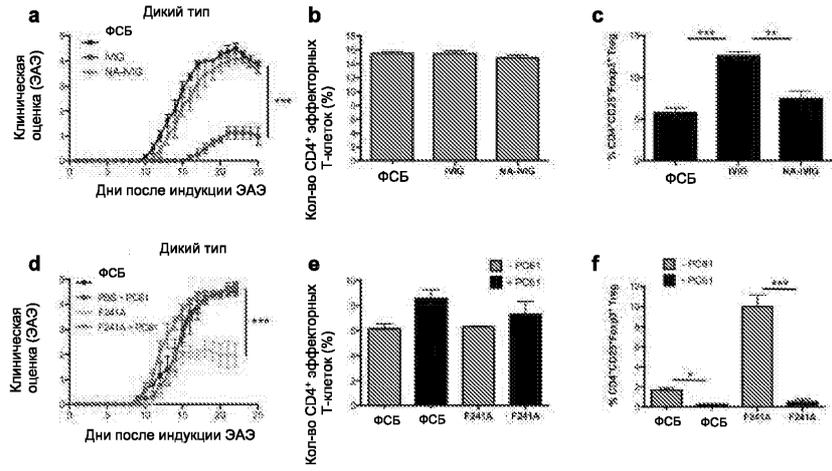
Фиг. 1a, b, c и d



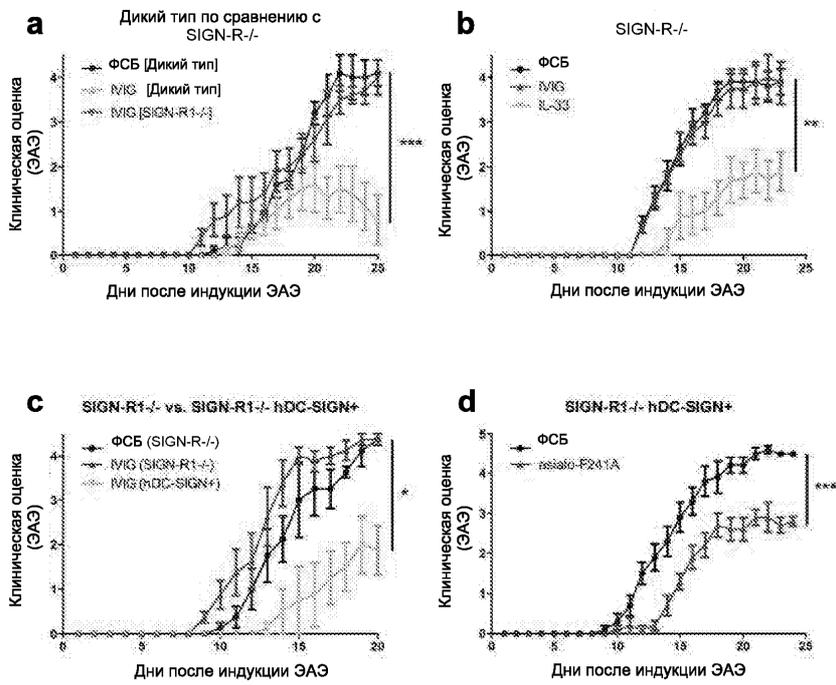
Фиг. 2а, б и с



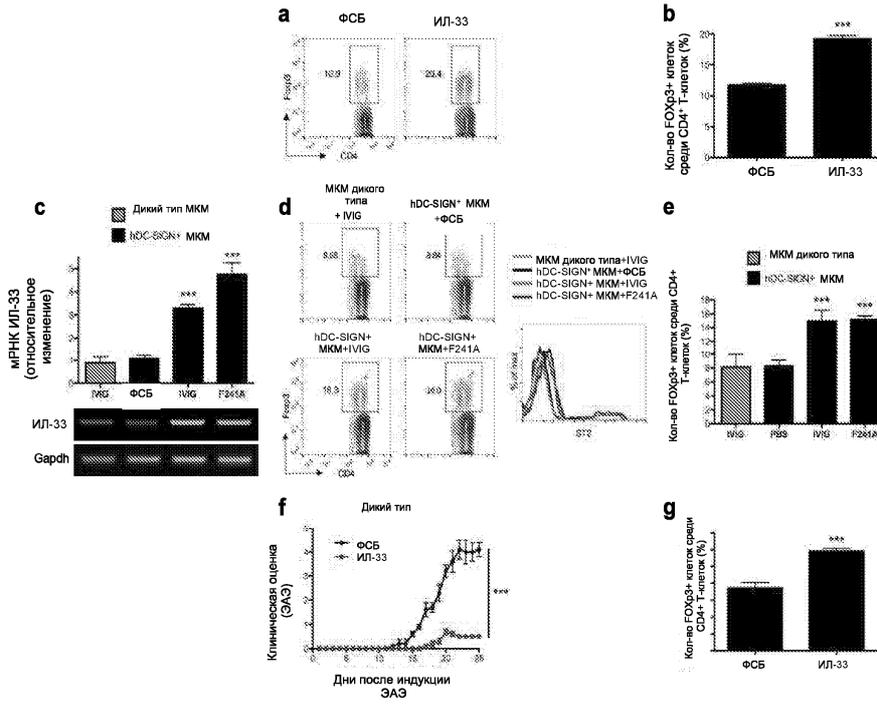
Фиг. 3а, б и с



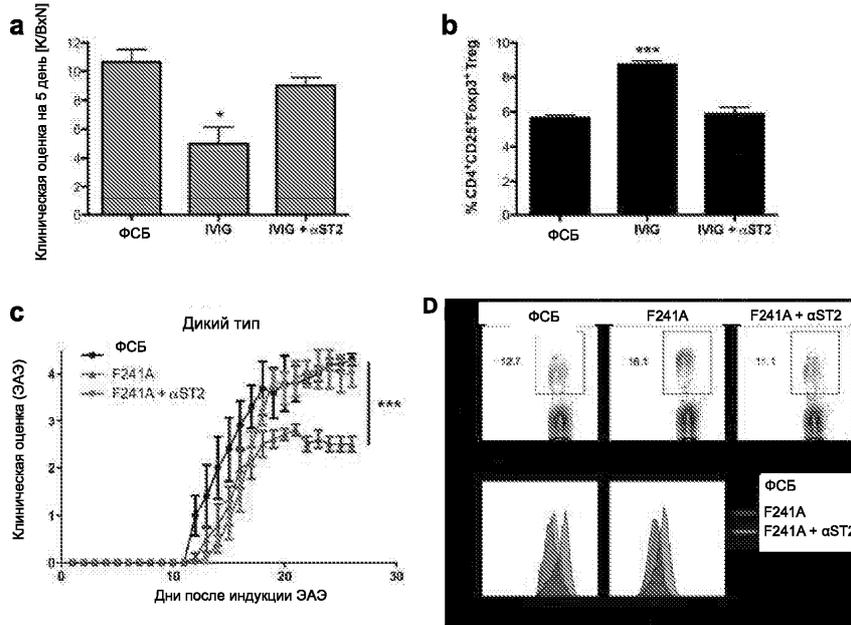
Фиг. 4а, b, c, d, e и f



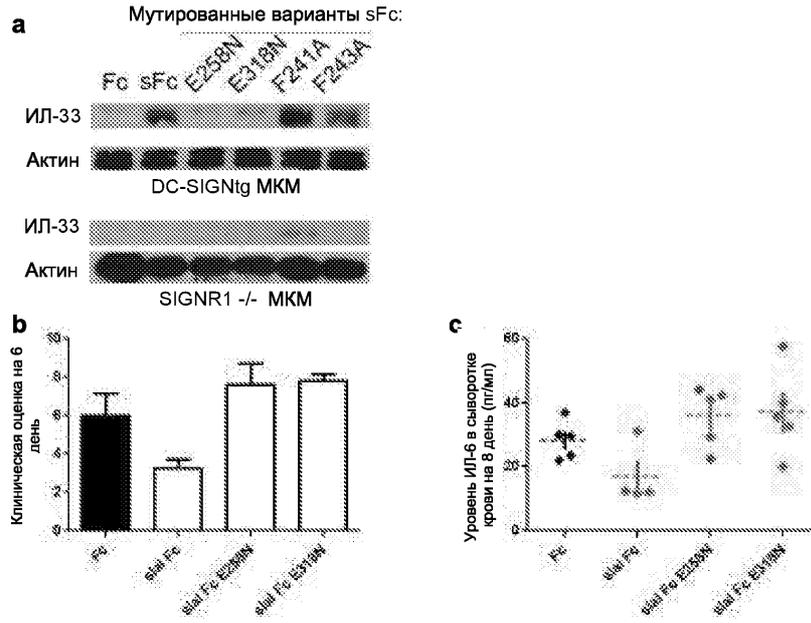
Фиг. 5а, b, c и d



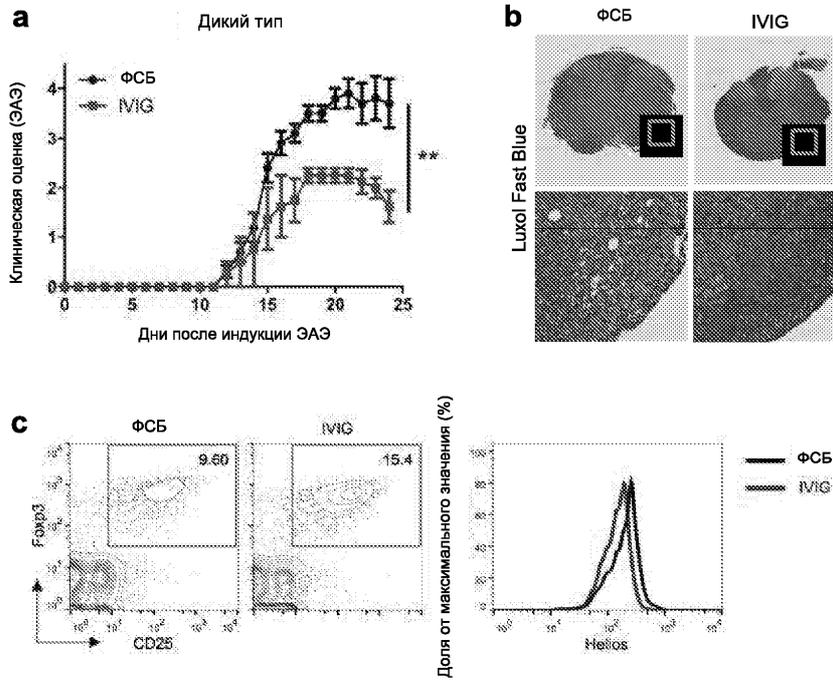
Фиг. 6а, b, c, d, e, f и g



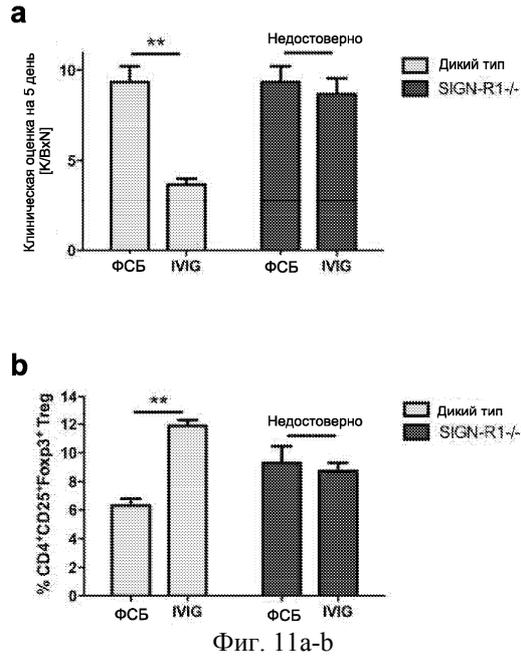
Фиг. 7а, b, c и d



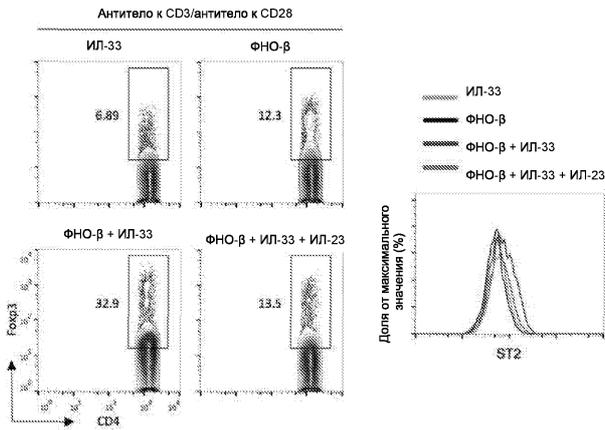
Фиг. 9а, б и с



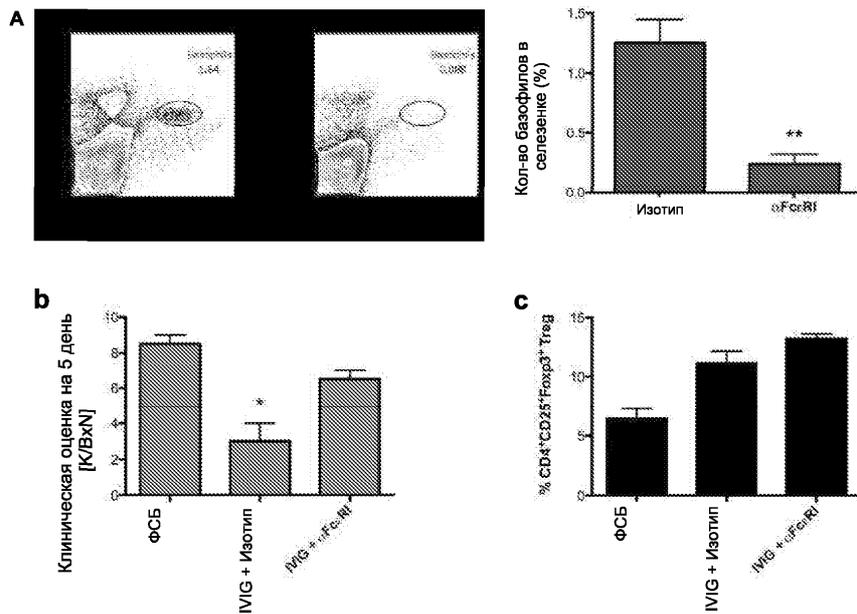
Фиг. 10а, б и с



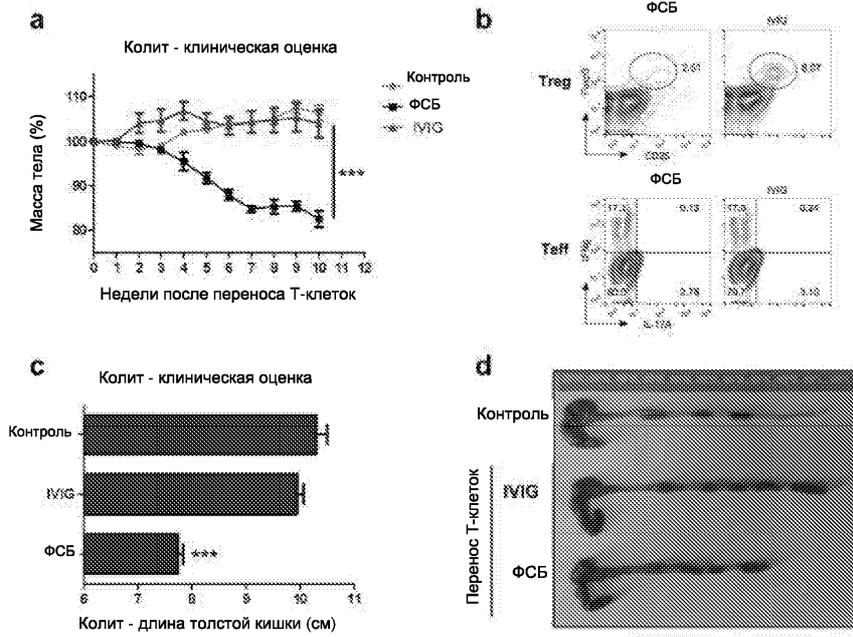
Фиг. 11а-б



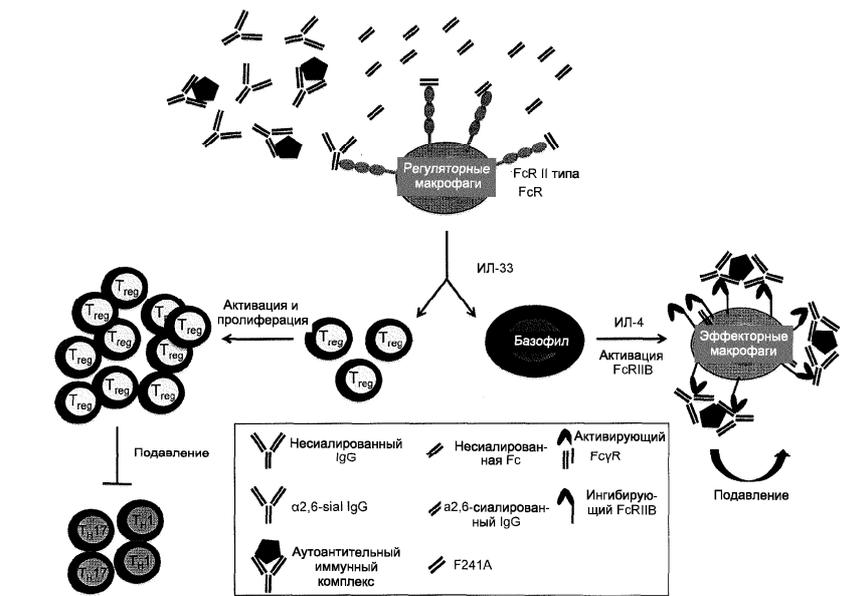
Фиг. 12



Фиг. 13а, б и с



Фиг. 14a, b, c и d



Фиг. 15

