

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092489** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

(51) Int. Cl. *A61K 47/60* (2017.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.20

(54) СЕЛЕКТИВНЫЙ СТИМУЛЯТОР Treg RUR_{20kD}-IL-2 И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 62/674,244

(32) 2018.05.21

(33) US

(86) PCT/US2019/033100

(87) WO 2019/226538 2019.11.28

(71) Заявитель:
НЕКТАР ТЕРАПЬЮТИКС (US)

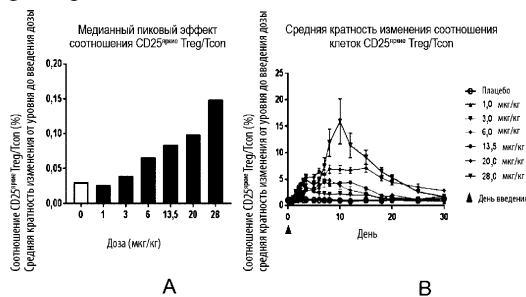
(72) Изобретатель:

Кирк Питер Бенедикт (GB),
Ланговски Джон Л, Залевский
Джонатан (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Лыу Т.Н.,
Строкова О.В. (RU)

(57) Данное изобретение предусматривает композиции селективных стимуляторов Treg, включая RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, и способы применения таких композиций, например, для лечения аутоиммунных заболеваний и/или других состояний, поддающихся лечению, которые эффективно обеспечивают селективного увеличения количества и активации регуляторных Т-клеток по сравнению с эффекторными Т-клетками.



A1

202092489

202092489

A1

СЕЛЕКТИВНЫЙ СТИМУЛЯТОР TREG RUR_{20kD}-IL-2 И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

Данная заявка относится к композициям Treg-стимуляторов агонистов рецептора интерлейкина-2 (IL-2R) пролонгированного действия, которые избирательно увеличивают количество и активацию регуляторных Т-клеток по сравнению с эффекторными Т-клетками, и к способам использования таких композиций Treg-стимуляторов в лечение аутоиммунных и воспалительных заболеваний и/или других состояний, реагирующих на терапию, стимулирующую Treg. В частности, данная заявка относится к композиции селективного стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 и родственным композициям, а также способам их получения, их составам, и способам применения RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций для лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных расстройств.

Иммунная система является основной линией защиты организма от вторжения инфекционных организмов. В нормально функционирующей иммунной системе иммунный ответ против аутоантигенов не возникает; это называется аутоотолерантностью.

Аутоиммунное заболевание возникает, когда ткани тела подвергаются атаке собственной иммунной системы организма из-за потери толерантности к аутоантигенам (Dejaco, C., *et al.*, *Immunology*. 2006; 117(3): 289-300). У субъектов, страдающих аутоиммунным заболеванием, ткани тела разрушаются антигенспецифическими цитотоксическими Т-клетками или аутоантителами, при этом сопутствующее воспаление может вызвать функциональную инвалидность и в некоторых случаях смерть. Аутоиммунные заболевания представляют собой разнородный набор заболеваний с широким спектром симптомов, которыми страдают примерно шесть процентов населения (Siatskas, C., *et al.*, *Curr Gene Ther*. 2006; 6(1): 45-58). Хотя клинические признаки аутоиммунных заболеваний сильно различаются, иммуноопосредованные механизмы связаны с генерацией адаптивного иммунного ответа на целевой антиген (Kuby, J., 1994: Autoimmunity. *Immunology*, 2nd ed., p 445-467. WH Freeman and Company, New York).

Хотя различные традиционные методы лечения, такие как кортикостероиды, циклофосфамид, азатиоприн и метотрексат, были малоэффективными у некоторых пациентов с аутоиммунным заболеванием, они не одинаково эффективны и связаны с побочными эффектами и токсичностью (Jantunen, E., *et al.*, *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25(4): 351-6).

Такие традиционные подходы не в состоянии устранить основную патологию, связанную с аутореактивным иммунитетом.

В свете последних достижений в понимании патофизиологии аутоиммунных заболеваний были разработаны и в настоящее время оцениваются потенциальные новые методы лечения, ориентированные на клеточные или молекулярные мишени. Хотя этиология аутоиммунного заболевания неизвестна, считается, что оно вызвано потенциальным взаимодействием между генетическими факторами, неправильной иммунной регуляцией, а также гормональными факторами и воздействием окружающей среды. Были предложены различные механизмы индукции аутоиммунного заболевания, включая секвестрированные антигены, молекулярную мимикрию, нарушенную экспрессию молекул ГКГС класса II, дисбаланс цитокинов, дисфункцию регуляторных путей идиотипической сети, дефекты в общих регуляторных Т-клетках и поликлональную активацию В-клеток (Kuby, 1994, *там же*). Были изучены несколько подходов к лечению аутоиммунного заболевания, включая истощение В-клеток, антицитокиновую терапию и терапию стволовыми клетками, однако эти подходы имеют недостатки в отношении эффективности, безопасности и/или нежелательных побочных эффектов. Обычные методы лечения аутоиммунного заболевания действуют путем подавления общей иммунной системы, что приводит к значительному риску инфекции и другим серьезным побочным эффектам. Таким образом, сохраняется потребность в дополнительных методах лечения для обеспечения улучшенного сочетания эффективности, безопасности и/или переносимости для лечения аутоиммунного заболевания.

Уже давно была установлена роль IL-2 в аутоиммунных ответах как провоспалительного цитокина. Однако более поздние исследования показали, что IL-2 в определенных условиях может играть защитную роль при хроническом аутоиммунном воспалении. В частности, нарушение баланса между регуляторными Т-клетками (Treg) и эффекторными Т-клетками (Teff) было идентифицировано как общая характеристика различных аутоиммунных заболеваний, причем считается, что на такой нарушенный баланс влияют гомеостатические цитокины, такие как IL-2. Введение немодифицированного IL-2 для аутоиммунной терапии требует, из-за его фармакокинетического профиля, частого приема доз - ежедневно или через день, что часто сопровождается болезненными реакциями в месте инъекции. Более того, необходимость частых инъекций часто сопровождается плохим соблюдением пациентом режима лечения из-за дискомфорта и неудобств. Длительное повторное введение IL-2 также сопровождается повышенным риском нежелательной

плейотропной и системной активности IL-2 и связанных рисков и побочных эффектов. Кроме того, из-за ограниченного терапевтического окна использование немодифицированного IL-2 для достижения иммунного гомеостаза и поддержания желаемого баланса Treg/Teff на протяжении длительных периодов времени может оказаться проблематичным, если не
5 недостижимым. Кроме того, его узкий терапевтический интервал при лечении аутоиммунных заболеваний требует введения чрезвычайно низких доз IL-2, что отрицательно влияет на его эффективность. В то время как низкие дозы IL-2 могут использоваться для стимуляции Treg с некоторой клинической пользой, побочные эффекты ограничивают дозу, а повышение Treg является умеренным и непродолжительным. Например, введение немодифицированного IL-2
10 для терапии аутоиммунного заболевания вызывает нежелательное повышение IL-5 и последующее повышение уровней эозинофилов, что может привести к воспалению. Таким образом, сохраняется потребность в средствах, которые могут избирательно модулировать передачу сигналов IL-2 таким образом, чтобы способствовать достижению ослабляющего
15 заболевание баланса активностей регуляторных Т-клеток и эффекторных Т-клеток при различных аутоиммунных заболеваниях.

Конкретные аутоиммунные заболевания имеют лежащие в основе этиопатологии, включая нарушение продукции IL-2 и/или дефициты регуляторных Т-клеток, которые рассматриваются как иммунологические механизмы, предшествующие началу заболевания. Остается потребность в альтернативных и более эффективных терапевтических композициях
20 и режимах лечения для эффективного уменьшения аутоиммунных симптомов, улучшения качества жизни и, предпочтительно, обеспечения длительной ремиссии при различных аутоиммунных заболеваниях. В данном описании рассматриваются ограниченная доступность и связанные с этим недостатки существующих в настоящее время вариантов
25 лечения хронических аутоиммунных заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано на открытии селективного стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций. Композиции селективных стимуляторов Treg RUR_{20kD}-IL-2 представляют собой смеси конъюгатов IL-2-ПЭГ с определенной степенью гетерогенности.
30 Они предназначены для подкожного введения низких доз для выборочного восстановления гомеостаза Treg с минимальным воздействием на другие иммунные клетки. Композиции селективных стимуляторов Treg RUR_{20kD}-IL-2 представляют собой смеси конъюгатов,

содержащих рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (rhIL-2, и в частности аминокислотную последовательность алдеслейкина без дополнительных аминокислотных мутаций или замен), стабильно ковалентно конъюгированных с фрагментами 20 кДа полиэтиленгликоля (ПЭГ), причем смеси содержат определенные фракции с определенными 5 степенями пегилирования на фрагмент IL-2. Композиции по данному изобретению содержат выбранные смеси конъюгатов IL-2 с ПЭГ, имеющих определенные фракции преимущественно дипегилированного и трипегилированного IL-2, и определенные меньшие фракции монопегилированного IL-2, и/или тетрапегилированного или имеющего более высокие степени пегилирования IL-2. В частности, композиции по данному изобретению 10 обеспечивают селективный стимулятор Treg RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, способы их получения, их составы и способы применения RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций для лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных расстройств. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 вызывают стойкие ответы при иммунных воспалительных расстройствах путем активации и экспансии антигенспецифических регуляторных Т-клеток. 15 Лечение аутоиммунных заболеваний подкожным введением низкой дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 может обеспечить средства для селективного восстановления гомеостаза Treg с минимальным влиянием на обычную функцию Т-клеток, тем самым обеспечивая альтернативный и/или улучшенный подход к облегчению этих расстройств.

20 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А и 1В представляют собой типичные графики ВЭЖХ с обращенной фазой, иллюстрирующие общий состав композиции RUR_{20kD}-IL-2, получение которой описано в примерах 1 и 1А. При перемещении слева направо по оси абсцисс (время элюирования, 25 минуты), очищенная композиция конъюгата содержит в основном дипегилированный и трипегилированный rIL-2.

Фиг. 2 представляет собой аминокислотную последовательность алдеслейкина (125-L-серин-2-133 интерлейкин-2, рекомбинантный негликозилированный интерлейкин-2, экспрессируемый в *E. coli*).

Фиг. 3А и 3В представляют собой графики, демонстрирующие результаты 30 фармакодинамического анализа Treg мыши в крови (**Фиг. 3А**) и селезенке (**Фиг. 3В**) после введения однократной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 мышам, как описано в Примере 2.

Фиг. 4А, 4В и 4С представляют собой графики, показывающие уровни естественных киллерных (ЕК) клеток, CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток, соответственно, в крови после введения однократной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 мышам, как описано в Примере 2.

Фиг. 5А и 5В представляют собой графики функции и активности Treg, измеренных по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD25 и Foxp3 после введения разовой дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 мышам, как описано в Примере 2.

Фиг. 6А-Д представляют собой графики Treg селезенки, выделенных у мышей, получавших носитель на 1 и 4 сутки в *in vitro* анализе супрессии Treg, как описано в Примере 3.

Фиг. 7 представляет собой график, демонстрирующий относительную супрессивную способность выделенных Treg, культивируемых с Tcon (обычные Т-клетки) в соотношении 1:2, оцениваемую в зависимости от времени, как описано в Примере 3.

Фиг. 8А и 8В демонстрируют степень отека уха у мышей, получавших композицию RUR_{20kD}-IL-2; исследования были проведены для оценки способности индукции Treg путем введения RUR_{20kD}-IL-2 подавлять воспаление, вызываемое Т-клеточным антигеном, на мышинной модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), как описано в Примере 4.

Фиг. 9А-С представляют собой графики уровней Treg (CD4, CD25, FOXP3, соответственно) в крови после введения однократной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 яванским макакам, как описано в Примере 5.

Фиг. 10А и В представляют собой графики, демонстрирующие результаты фармакодинамического анализа Treg мыши после введения либо композиции RUR_{20kD}-IL-2, либо немодифицированного IL-2 (алдеслейкина) мышам, как описано в Примере 7.

Фиг. 11 представляет собой график уровней белка в моче (г/л) с течением времени для мышей, которым вводили композицию RUR_{20kD}-IL-2 (0,3 мг/кг), при оценке на мышинной модели системной красной волчанки (СКВ), как подробно описано в Примере 8.

Фиг. 12 представляет собой график, демонстрирующий результаты фармакодинамического анализа Treg CD4+FoxP3+CD25^{ярких} в образцах периферической крови (клеток/мкл) с течением времени (суток) после однократного введения различных доз композиции RUR_{20kD}-IL-2.

Фиг. 13 представляет собой график, демонстрирующий результаты фармакодинамического анализа общего количества Treg CD4+FoxP3+CD25+ в образцах периферической крови (клеток/мкл) с течением времени (суток) после однократного введения различных доз композиции RUR_{20kD}-IL-2 людям, как описано в Примере 10.

Фиг. 14А-Д представляют собой графики популяций клеток Tcon, CD4+ (Фиг. 14А) и CD8+ Tcon-клеток (Фиг. 14В), выраженных в процентах от клеток CD3, в образцах периферической крови с течением времени (суток) после однократного введения различных доз композиции RUR_{20kD}-IL-2 людям, как описано в Примере 10. Фиг. 14С и 14Д представляют собой

5 графики, иллюстрирующие количество CD8+ Т-клеток (клеток/мкл) и Ki67+CD8+ Т-клеток (выраженных в процентах от CD8), соответственно, в образцах периферической крови с течением времени (суток) после однократного введения различных доз композиции RUR_{20kD}-IL-2 людям, как описано в Примере 10.

Фиг. 15А, 15В представляют собой графики Treg CD25яркие+/FoxP3+, подсчитанных методом проточной цитометрии. Цельную кровь брали у людей перед лечением и в различные моменты времени после лечения путем однократного введения различных доз RUR_{20kD}-IL-2, как описано в Примере 10. Фиг. 15А иллюстрирует средний пиковый эффект каждой величины дозы на количество (клеток/мкл) Treg CD25яркие+/FoxP3+, а на Фиг. 15В представлено абсолютное количество Treg CD25яркие+/FoxP3+ в зависимости от времени

15 (суток) после введения.

Фиг. 16А, 16В представляют собой графики CD4+ и CD8+ Т-клеток соответственно, подсчитанных методом проточной цитометрии. Цельную кровь брали у людей перед лечением и в различные моменты времени после лечения путем однократного введения различных доз RUR_{20kD}-IL-2, как описано в Примере 10. Результаты представлены в виде

20 доли (%) каждой клеточной популяции и кратности изменения, рассчитанной на основе значений, полученных до проведения лечения.

Фиг. 17А, 17В представляют собой графики отношений доза-ответ Treg к Tcon (Фиг. 17А) и CD25яркие+/FoxP3+ Treg и CD8+ Т-клеток (Фиг. 17В), подсчитанных с использованием проточной цитометрии. Цельную кровь брали у людей перед лечением и в различные

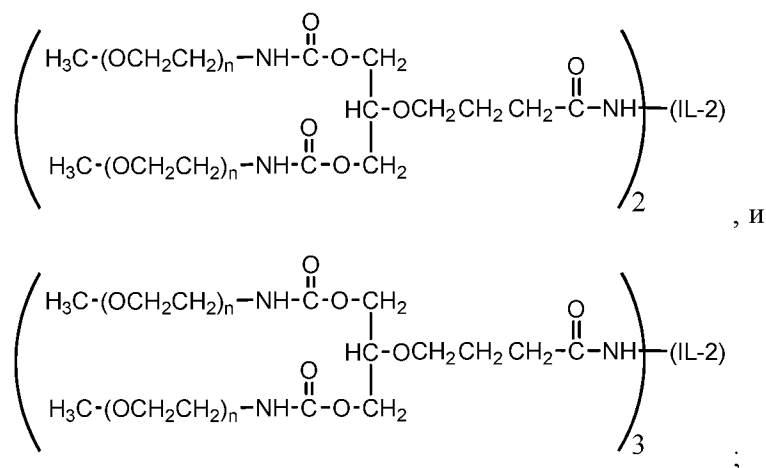
25 моменты времени после лечения путем однократного введения различных доз RUR_{20kD}-IL-2, как описано в Примере 10. Результаты представлены как доля (%) каждой популяции клеток и кратность изменения, рассчитанные на основе значений, полученных до проведения лечения. Клетки Tcon представляют собой CD8+ Т-клетки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение предусматривает композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции. Как правило,

композиции химически модифицированного конъюгата IL-2, представленные в данном документе, характеризуются наличием определенного и преобладающего числа разветвленных фрагментов полиэтиленгликоля, стабильно ковалентно связанных с IL-2 через его аминогруппы. Композиции, представленные в данном документе, включают выбранные смеси конъюгатов IL-2 с ПЭГ, содержащих определенные фракции преимущественно дипегилированного и трипегилированного IL-2, и определенные меньшие фракции монопегилированного IL-2 и/или тетрапегилированного или имеющего более высокую степень пегилирования IL-2.

В одном аспекте данное изобретение предусматривает композицию, содержащую пегилированные конъюгаты IL-2, имеющие структуру:



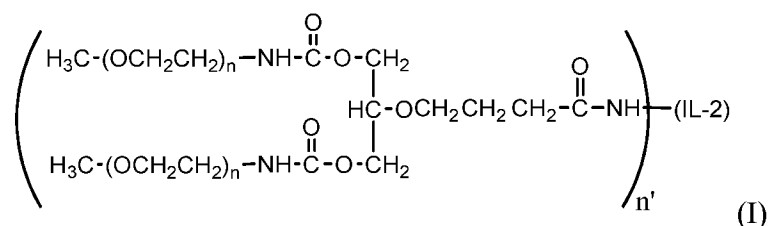
где:

IL-2 представляет собой интерлейкин-2;

n независимо в каждом случае обозначает целое число от примерно 3 до примерно 4000.

В конкретном варианте реализации указанной композиции IL-2 представляет собой алдеслейкин. В конкретном варианте реализации указанных композиций номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. В другом конкретном варианте реализации указанных композиций, пегилированные (PEGylated) конъюгаты IL-2 композиции имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к лизину 31.

В одном аспекте, данный документ предусматривает композиции, содержащие конъюгаты формулы:



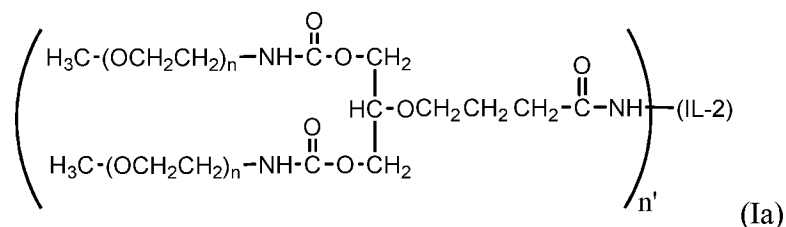
где IL-2 представляет собой интерлейкин-2, n обозначает целое число от примерно 3 до примерно 4000, и n' равно 2 и 3.

Полимерная часть соединения формулы (I) также называется 1,3-

5 бис(метоксиполи(этиленгликоль) MB10000-карбамоил)-2-пропанокси)-4-бутаноилом (до карбонильной группы включительно, которая ковалентно присоединена к азоту аминогруппы фрагмента IL-2). Смешанные композиции в соответствии с формулой (I) обычно называются в данном документе RUR-IL2 и охватывают некоторый диапазон размеров ПЭГ.

Иллюстративные диапазоны n включают, например, в дополнение к от примерно 3 до
10 примерно 4000, значения из примерно 5-2000, или из примерно 10-1000, или из примерно 10-750, или из примерно 10-500, или из примерно 10-400, или из примерно 10-300, или из примерно 10-250, или из примерно 20-250. В некоторых вариантах реализации n составляет, в среднем, около 226.

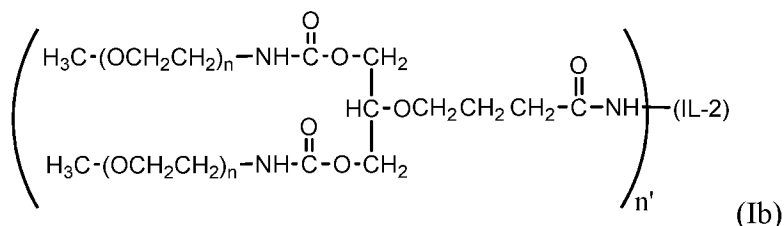
В другом аспекте, данный документ предусматривает композиции формулы:



где IL-2 представляет собой интерлейкин-2, n обозначает целое число от примерно 3 до примерно 4000, и n' равно 1, 2 и 3.

В некоторых вариантах реализации композиция селективного стимулятора Treg формулы I содержит IL-2R, стабильно ковалентно связанный с разветвленными фрагментами
20 полиэтиленгликоля, причем количество разветвленных фрагментов ПЭГ на фрагмент IL-2 (степень пегилирования) представляет собой распределение преимущественно 2- и 3-меров (ди- и трипегилированных) в смеси с небольшими фракциями, включающими 1-меры (монопегилированные) и 4-меры (тетрапегилированные). Таким образом, в некоторых вариантах реализации малые фракции в композициях согласно формуле I будут включать
25 конъюгаты, в которых n' равно 1, 4, 5 или выше, но не более 11.

Например, в одном из вариантов реализации композиция селективного стимулятора Treg описывается следующей структурой:



где IL-2 представляет собой один из аминокислотных остатков IL-2, а «NH», указанный в структуре (Ib), представляет собой аминогруппу указанного остатка IL-2; при этом «n» обозначает целое число от примерно 3 до примерно 4000; и n' равно 2 и 3.

В некоторых вариантах реализации в данном документе предусматриваются композиции селективных стимуляторов Treg, обозначаемые как RUR_{20kD}-IL-2, и родственные композиции. Эти композиции содержат конъюгаты IL-2 с индивидуальными ковалентно присоединенными ПЭГ, имеющими номинальную общую молекулярную массу около 20 кДа, как описано в данном документе. Предпочтительно, фрагмент IL-2 представляет собой алдеслейкин. Эти композиции дополнительно содержат выбранные смеси конъюгатов IL-2 с ПЭГ, содержащие определенные фракции преимущественно дипегилированного и трипегилированного IL-2, и определенные меньшие фракции монопегилированного IL-2 и/или тетрапегилированного или имеющего более высокую степень пегилирования IL-2. Конкретные препараты композиций RUR_{20kD}-IL-2 описаны ниже и в данной заявке. В используемом в данном документе значении, композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы А, композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы В, композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы С, композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы D и/или композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы Е представляют собой определенные варианты реализации селективного стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций, и в этих вариантах реализации фрагмент IL-2 представляет собой алдеслейкин (как описано в данном документе). Такие композиции необязательно содержат их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте реализации в данном документе предусматривается композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы А, причем указанная композиция содержит, на молярной основе, примерно 5 % мол. или менее монопегилированных конъюгатов IL-2 и от примерно 28 % мол. до примерно 60 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2 и от примерно 24 % мол. до примерно 65 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и примерно 12 % мол. или менее

конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. Предпочтительно, композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы А содержит в общей сложности 80 % мол. или более ди- и трипегилированных конъюгатов IL-2.

- 5 В одном варианте реализации в данном документе предусматривается композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы В, причем композиция содержит, на молярной основе, от примерно 2,5 до примерно 4,5 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 35 до примерно 50 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 38 до примерно 46 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 3 до примерно 10 % мол.
- 10 конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. Предпочтительно, композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы В содержит, в общей сложности, дипегилированные и трипегилированные конъюгаты IL-2 в количестве от примерно 80 до примерно 95 % мол.
- 15 В одном из вариантов реализации в данном документе предусматривается композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы С, причем композиция содержит, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол.
- 20 конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. Предпочтительно, композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы С содержит, в общей сложности, дипегилированные и трипегилированные конъюгаты IL-2 в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.
- 25 В одном варианте реализации в данном документе предусматривается композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы D, причем композиция содержит, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол.
- 30 конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом указанная композиция содержит смесь монопегилированных конъюгатов IL-2, которые имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к одному из лизинов K7, или K8, или K31, или K75, и при этом номинальная

средняя молекулярная масса каждого фрагмента разветвленного полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. Предпочтительно, композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы D содержит, в общей сложности, дипегилированные и трипегилированные конъюгаты IL-2 в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.

- 5 В одном из вариантов реализации в данном документе предусматривается композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы E, причем композиция содержит, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол.
- 10 конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом указанная композиция содержит конъюгаты монопегилированного IL-2, которые имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к лизину K7, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого фрагмента разветвленного полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. Предпочтительно, композиция RUR_{20kD}-IL-2 формулы E содержит, в общей сложности,
- 15 дипегилированные и трипегилированные конъюгаты IL-2 в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.

- В используемом в данном документе значении, «RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции» может относиться к одной или нескольким композициям, соответствующим любому из RUR_{20kD}-IL-2 формулы A, и/или RUR_{20kD}-IL-2 формулы B, и/или RUR_{20kD}-IL-2
- 20 формулы C, и/или RUR_{20kD}-IL-2 формулы D, и/или RUR_{20kD}-IL-2 формулы E, и/или фармацевтически приемлемым солям этих композиций. Препараты Примера 1 и/или Примера 1A являются неограничивающими примерами «RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций» по данному изобретению.

25 **Дополнительные варианты реализации представленных в данном документе композиций селективных стимуляторов Treg:**

- Предусматриваемые в данном документе композиции могут содержать конъюгаты, в которых n равно 2, например, дипегилированные конъюгаты, где два разветвленных полимера полиэтиленгликоля, каждый из которых имеет 1,3-
- 30 бис(метоксиполи(этиленгликоль)_{10kDa}-карбамоил)-2-пропанокси)-4-бутаноильную структуру, приведенную выше, присоединены в одинаковых относительных положениях для практически всех дипегилированных конъюгатов IL-2 в композиции. Альтернативно,

дипегилированный конъюгат может включать смесь дипегилированных конъюгатов, например, смесь дипегилированных конъюгатов, в которых присоединение разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля происходит в двух сайтах на IL-2, причем конкретные сайты связывания неодинаковы для всех дипегилированных конъюгатов IL-2, содержащихся в композиции. Таким образом, такие дипегилированные композиции являются гомогенными с точки зрения степени пегилирования, в частности, количества присоединенных разветвленных фрагментов ПЭГ (например, 2-меров), но гетерогенны по положениям присоединения ПЭГ к молекуле IL-2, и в этом случае представляют собой изомеры положения присоединения ПЭГ.

Композиции также могут содержать отдельные конъюгаты, в которых n равно 3, например, трипегилированный конъюгат, причем три разветвленных фрагмента полиэтиленгликоля присоединены в одних и тех же относительных положениях практически для всех конъюгатов IL-2 в композиции. Альтернативно, трипегилированный конъюгат может включать смесь трипегилированных конъюгатов, например, смесь трипегилированных конъюгатов, в которых сайт присоединения фрагмента разветвленного полиэтиленгликоля находится в разных сайтах IL-2 для конъюгатов, содержащихся в композиции. Таким образом, такие трипегилированные композиции являются гомогенными с точки зрения степени пегилирования, в частности, количества присоединенных разветвленных фрагментов ПЭГ, но гетерогенны по положениям присоединения ПЭГ к молекуле IL-2, и в этом случае представляют собой изомеры положения присоединения ПЭГ.

Композиции также могут содержать отдельные конъюгаты, в которых n равно 1, например, монопегилированный конъюгат, причем один разветвленный фрагмент полиэтиленгликоля присоединен в одном и том же относительном положении практически для всех конъюгатов IL-2 в композиции. Альтернативно, монопегилированный конъюгат может включать смесь монопегилированных конъюгатов, например, смесь монопегилированных конъюгатов, в которых сайт присоединения фрагмента разветвленного полиэтиленгликоля находится в разных сайтах IL-2 для конъюгатов, содержащихся в композиции. Таким образом, такие монопегилированные композиции являются гомогенными с точки зрения степени пегилирования, в частности, количества присоединенных разветвленных фрагментов ПЭГ, но гетерогенны по положениям присоединения ПЭГ к молекуле IL-2, и в этом случае представляют собой изомеры положения присоединения ПЭГ.

Определенные положения присоединения ПЭГ к молекуле IL-2 являются более распространенными в описанных в данном документе композициях. Например, лизины K7, или K8, или K31, или K75, обычно являются пегилированными сайтами. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции могут содержать конъюгаты, в которых лизины K7, или K8, или K31, или K75 являются пегилированными сайтами. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции могут содержать монопегилированные конъюгаты, в которых лизины K7, или K8, или K31, или K75 являются пегилированными сайтами. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции могут содержать монопегилированные конъюгаты, в которых лизин K7 представляет собой пегилированный сайт. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции могут содержать монопегилированные конъюгаты, в которых лизин K31 представляет собой пегилированный сайт.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более примерно 20 % мол., предпочтительно, не более примерно 15 % мол. конъюгатов, взятых в общей сложности, охватываемых формулой (I), где n' обозначает целое число, выбранное из 1, 4, 5, или целое число больше 5, причем молярный процент определяют на основе общего количества конъюгатов ПЭГ-IL-2. В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. конъюгатов, взятых в общем, охватываемых формулой (I), где n' обозначает целое число, выбранное из 1, 4, 5, или целое число больше 5, причем молярный процент определяют на основе общего количества конъюгатов ПЭГ-IL-2. В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. мономеров, предпочтительно, не более примерно 7 % мол. мономеров, или не более примерно 5 % мол. мономеров (т.е. в соответствии со структурой (I), где n равно 1). В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. тетрамеров, предпочтительно, не более примерно 7 % мол. тетрамеров, или не более примерно 5 % мол. тетрамеров (т.е. в соответствии со структурой (I), где n равно 4). В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. мономеров и не более примерно 10 % мол. тетрамеров. Альтернативно, композиция содержит не более примерно 7 % мол. мономеров и не более примерно 7 % мол. тетрамеров, или может содержать не более примерно 5 % мол. мономеров и не более примерно 5 % мол. тетрамеров.

В некоторых вариантах реализации, касательно пегилированного IL-2 в композиции, композиция будет в целом удовлетворять одной или несколькими из следующих

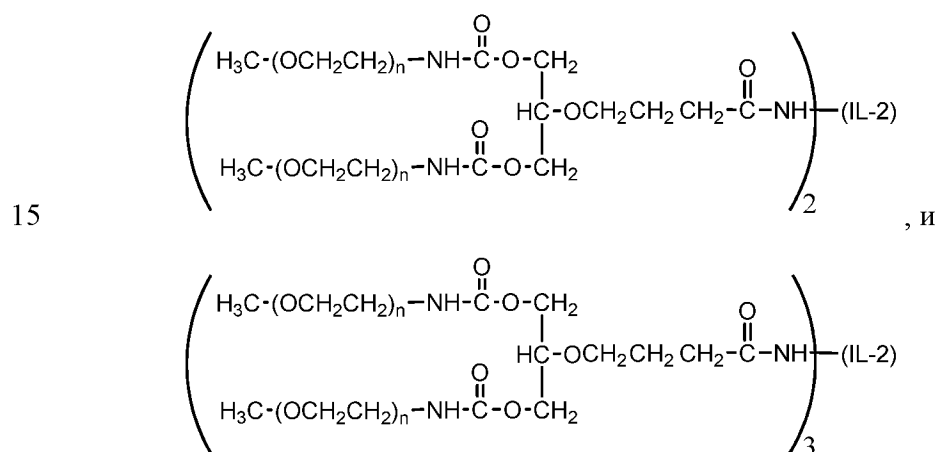
характеристик: по меньшей мере, около 80% конъюгатов в композиции будут представлять собой смесь дипегилированных и трипегилированных конъюгатов, некоторые из которых содержат 2, а некоторые - 3 разветвленных полимера, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; по меньшей мере около 85% конъюгатов в композиции будут представлять собой смесь дипегилированных и трипегилированных конъюгатов, некоторые из которых имеют 2, а некоторые - 3 разветвленных полимера, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; по меньшей мере около 90% конъюгатов в композиции будут представлять собой смесь дипегилированных и трипегилированных конъюгатов, некоторые из которых имеют 2, а некоторые - 3 разветвленных полимера, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; и, по меньшей мере, около 95% конъюгатов в композиции будут представлять собой смесь дипегилированных и трипегилированных конъюгатов, некоторые из которых содержат 2, а некоторые - 3 разветвленных полимера, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; не более чем примерно 20% конъюгатов в композиции будут иметь число, выбранное из 1, или 4 или более, разветвленных полимеров, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; не более чем примерно 15% конъюгатов в композиции будут иметь число, выбранное из 1, или 4 или более, разветвленных полимеров, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; не более чем примерно 10% конъюгатов в композиции будут иметь число, выбранное из 1, 4 или более, разветвленных полимеров, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2; не более чем примерно 7% конъюгатов в композиции будут иметь число, выбранное из 1, или 4 или более, разветвленных полимеров, имеющих структуру, представленную формулой (I) выше, присоединенных к фрагменту ПЛ-2.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более чем примерно 20 % мол., предпочтительно, не более примерно 15 % мол. соединений, взятых в общем, охватываемых формулой (I), где n' обозначает целое число, выбранное из 1, 4, 5, или целое число больше 5, причем молярный процент определяют на основе общего количества конъюгатов ПЭГ-ПЛ-2. В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. конъюгатов, взятых в общем, охватываемых формулой (I), где n' обозначает целое число, выбранное из 1, 4, 5, или целое число больше 5, причем молярный

процент определяют на основе общего количества конъюгатов ПЭГ-IL-2. В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. мономеров, предпочтительно, не более примерно 7 % мол. мономеров, или не более примерно 5 % мол. мономеров (т.е. в соответствии со структурой (I), где n равно 1). В

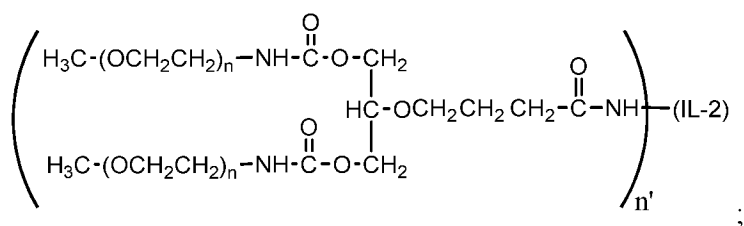
- 5 некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. тетрамеров, предпочтительно, не более примерно 7 % мол. тетрамеров, или не более примерно 5 % мол. тетрамеров (т.е. в соответствии со структурой (I), где n равно 4). В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 10 % мол. мономеров и не более примерно 10 % мол. тетрамеров. Альтернативно,
- 10 композиция содержит не более примерно 7 % мол. мономеров и не более примерно 7 % мол. тетрамеров, или может содержать не более примерно 5 % мол. мономеров и не более примерно 5 % мол. тетрамеров.

В некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит приблизительно эквимольные количества



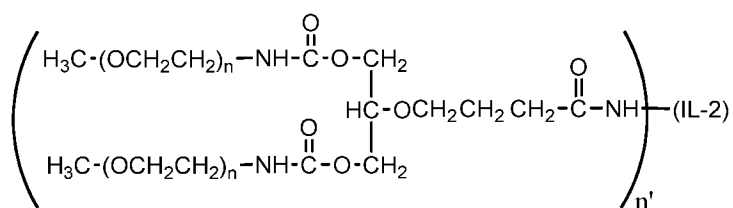
- Например, иллюстративные композиции могут содержать любое одно или несколько из следующих приблизительных соотношений дипегилированных материалов к трипегилированным: 1,4:1; 1,3:1; 1,2:1; 1,1:1; 1:1; 1:1,1; 1:1,2; 1:1,3; или 1:1,4. Среднее число
- 20 фрагментов ПЭГ на IL-2 для таких композиций выбирают, например, из 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; и 3. В некоторых вариантах реализации среднее число фрагментов ПЭГ на IL-2 составляет около 2,5.

- Например, в некоторых вариантах реализации композиции содержат не более примерно 20 мольных процентов (% мол.) конъюгатов IL-2, взятых в общем, охватываемых
- 25 формулой



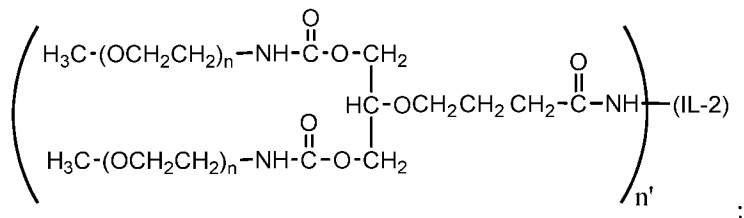
где n' выбирают из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

Кроме того, в некоторых дополнительных вариантах реализации композиции содержат не более примерно 15 мольных процентов (% мол.) конъюгатов IL-2, которые, 5 взятые в общем, охватываются формулой



и имеют n' , выбранный из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

Кроме того, в еще некоторых дополнительных вариантах реализации композиции содержат не более примерно 10 мольных процентов (% мол.) конъюгатов IL-2, которые, 10 взятые в общем, охватываются формулой



и имеют n' , выбранный n из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

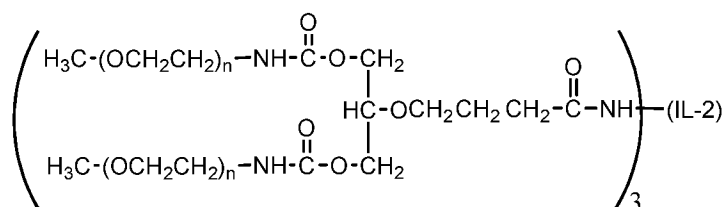
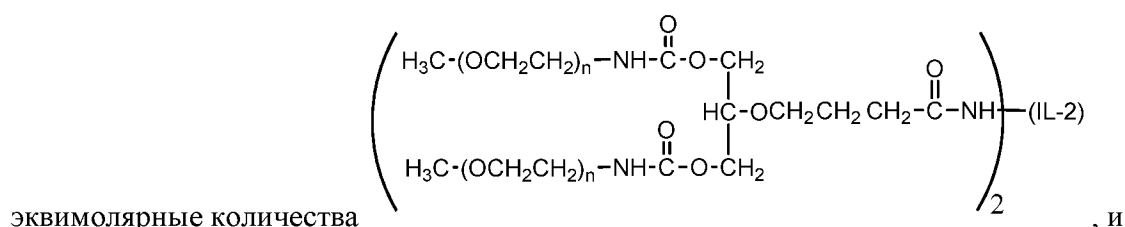
В некоторых дополнительных вариантах реализации вышеизложенного, композиция содержит не более примерно 10 % мол. конъюгатов IL-2 и имеет n' , равный 1. Еще в 15 некоторых других вариантах реализации композиция содержит не более примерно 7 % мол. конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 1.

В еще некоторых дополнительных вариантах реализации композиции содержат не более примерно 5 % мол. конъюгатов IL-2, при n' , равном 1. Еще в некоторых 20 альтернативных вариантах реализации композиция содержит менее примерно 5 % мол. конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 1.

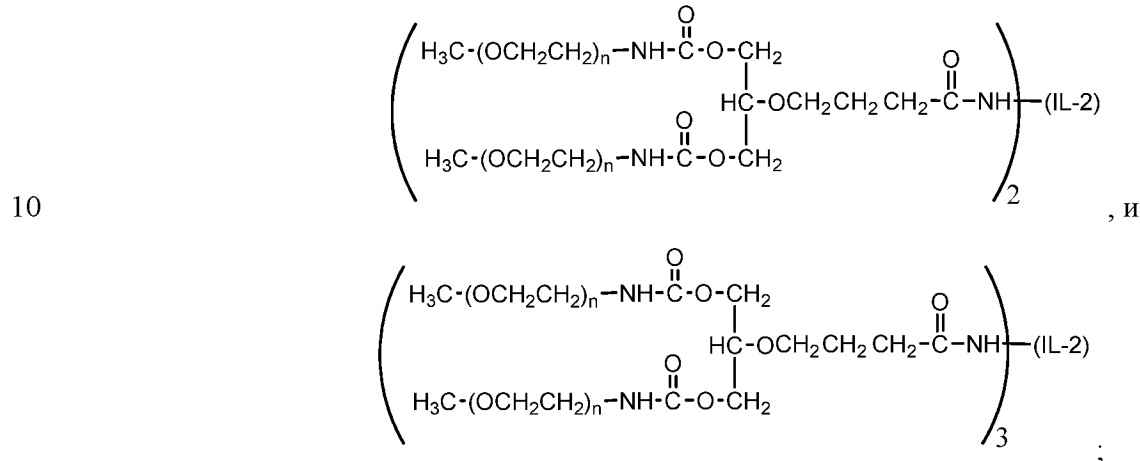
В некоторых дополнительных вариантах реализации, связанных с любым одним или несколькими из вышеперечисленных, композиция содержит не более чем примерно 10 %

мол. конъюгатов ПЛ-2, имеющих n' , равный 4. Или, в некоторых других вариантах реализации, композиция содержит не более примерно 7 % мол. конъюгатов ПЛ-2, имеющих n' , равный 4. Еще в некоторых дополнительных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 5 % мол. конъюгатов ПЛ-2, имеющих n' , равный 4.

5 Также в данном документе предусматривается композиция, содержащая приблизительно



В еще дополнительных вариантах реализации, в данном документе предусматривается композиция, содержащая конъюгаты ПЛ-2 формулы



где молярное соотношение ди-ПЭГ/три-ПЭГ конъюгатов выбирают из группы, состоящей из 1,4:1; 1,3:1; 1,2:1; 1,1:1; 1:1; 1:1,1; 1:1,2; 1:1,3; и 1:1,4.

15 В еще некоторых дополнительных вариантах реализации композиция имеет среднее число разветвленных фрагментов полиэтиленгликоля (имеющих структуру, изображенную выше) на остаток ПЛ-2, выбранное из группы, состоящей из 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; и 3. В конкретном варианте реализации среднее количество разветвленных фрагментов полиэтиленгликоля (имеющих структуру, изображенную выше) на фрагмент ПЛ-2

составляет около 2,5. В некоторых вариантах реализации, связанных с одним или несколькими из вышеизложенных, значение n находится в диапазоне 5-2000. В некоторых других вариантах реализации значение n находится в диапазоне 10-1000. Еще в некоторых дополнительных вариантах реализации значение n находится в диапазоне 10-750. В некоторых вариантах реализации значение n находится в диапазоне 10-500 или 20-250.

Значение n в вариантах реализации, представленных в данном документе, может варьироваться независимо в каждом случае. В одном или нескольких вариантах реализации, описанных в данном документе, значения n в каждой ветви полиэтиленгликоля разветвленного полимера по существу одинаковы. В некоторых дополнительных вариантах реализации значение n в каждой из полимерных ветвей, содержащих разветвленный полимер, находится в диапазоне от примерно 170 до 285. В еще некоторых дополнительных вариантах реализации значение n в каждой из полимерных ветвей, содержащих разветвленный полимер, находится в диапазоне от примерно 204 до примерно 250. В одном или нескольких конкретных вариантах реализации значение n в каждой из полимерных ветвей, содержащих разветвленный полимер, составляет около 226.

В одном или нескольких вариантах реализации, относящихся к любому одному или нескольким аспектам или вариантам реализации, представленным в данном документе, номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 250 дальтон до примерно 90000 дальтон. В некоторых других вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 1000 дальтон до примерно 60000 дальтон. В еще дополнительных вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 5000 дальтон до примерно 60000 дальтон. В некоторых других вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 10000 дальтон до примерно 55000 дальтон.

В некоторых дополнительных вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 15000 дальтон до примерно 25000 дальтон. В еще одном или нескольких дополнительных вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 18000

дальтон до примерно 22000 дальтон. В еще некоторых дополнительных вариантах реализации номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.

5 Дополнительные иллюстративные композиции включают композиции в соответствии с приведенными выше формулами, в которых общая полимерная часть молекулы имеет номинальную среднюю молекулярную массу в диапазоне от примерно 250 дальтон до примерно 90000 дальтон. Дополнительные подходящие диапазоны для полимерной части молекулы включают номинальные средние молекулярные массы в диапазоне, выбранном из от примерно 1000 дальтон до примерно 60000 дальтон, в диапазоне от примерно 5000
10 дальтон до примерно 60000 дальтон, в диапазоне от примерно 10000 дальтон до примерно 55000 дальтон, в диапазоне от примерно 15000 дальтон до примерно 50000 дальтон, и в диапазоне от примерно 20000 дальтон до примерно 50000 дальтон.

Дополнительные иллюстративные средневзвешенные молекулярные массы полимерной части полиэтиленгликоля включают примерно 200 дальтон, примерно 300
15 дальтон, примерно 400 дальтон, примерно 500 дальтон, примерно 600 дальтон, примерно 700 дальтон, примерно 750 дальтон, примерно 800 дальтон, примерно 900 дальтон, примерно 1000 дальтон, примерно 1500 дальтон, примерно 2000 дальтон, примерно 2200 дальтон, примерно 2500 дальтон, примерно 3000 дальтон, примерно 4000 дальтон, примерно 4400 дальтон, примерно 4500 дальтон, примерно 5000 дальтон, примерно 5500 дальтон, примерно
20 6000 дальтон, примерно 7000 дальтон, примерно 7500 дальтон, примерно 8000 дальтон, примерно 9000 дальтон, примерно 10000 дальтон, примерно 11000 дальтон, примерно 12000 дальтон, примерно 13000 дальтон, примерно 14000 дальтон, примерно 15000 дальтон, примерно 20000 дальтон, примерно 22500 дальтон, примерно 25000 дальтон, примерно 30000 дальтон, примерно 35000 дальтон, примерно 40000 дальтон, примерно 45000 дальтон,
25 примерно 50000 дальтон, примерно 55000 дальтон, примерно 60000 дальтон, примерно 65000 дальтон, примерно 70000 дальтон и примерно 75000 дальтон. В некоторых предпочтительных вариантах реализации средневзвешенная молекулярная масса разветвленного полимера полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. В некоторых конкретных вариантах реализации, в которых каждый разветвленный фрагмент ПЭГ имеет номинальную
30 молекулярную массу примерно 20000 дальтон, результирующий диапазон молекулярной массы композиции составляет примерно от 55 до 75 кДа при определении для композиции в целом.

Дополнительные варианты композиций селективных стимуляторов Treg, предусматриваемых в данном документе, содержат их фармацевтически приемлемые соли. Как описано выше, композиции конъюгата IL-2 могут иметь форму фармацевтически приемлемой соли. Обычно такие соли образуются в результате реакции с фармацевтически приемлемой кислотой или эквивалентом кислоты. Термин «фармацевтически приемлемая соль» в этом отношении касается в общем относительно нетоксичных солей присоединения неорганических и органических кислот. Эти соли могут быть получены *in situ* в процессе производства носителя для введения или лекарственной формы, или путем проведения отдельной реакции композиции интерлейкина-2 длительного действия, как описано в данном документе, с пригодной органической или неорганической кислотой и выделения образующейся при этом соли. Типичные соли включают бромистоводородные, хлористоводородные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, нитратные, ацетатные, валератные, олеатные, пальмитатные, стеаратные, лауратные, бензоатные, лактатные, фосфатные, тозилатные, цитратные, малеатные, фумаратные, сукцинатные, тартратные, нафилатные, мезилатные, глюкогептонатные, лактобионатные и лаурилсульфонатные и тому подобные соли. (см., например, Berge et al. (1977) «*Pharmaceutical Salts*», *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Таким образом, описанные соли могут быть производными неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п.; или могут быть приготовлены из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, оксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая (salicyclic), сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоная, метансульфоная, этандисульфоновая, щавелевая, изотионовая и т.п. Используемый в данном документе термин «композиция» или «композиции», включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, описанные в данном документе, включают любую и/или все фармацевтически приемлемые соли пегилированных конъюгатов IL-2. Это описание применяется независимо от того, добавлен ли термин «или его фармацевтически приемлемая соль» к описанию композиции или нет.

Варианты способов применения

В отличие от немодифицированного IL-2, композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, описанные в

данном документе, направлены на лежащую в основе патологию, связанную с аутореактивным иммунитетом, а также на специфические для мишени механизмы выработки полезных функций Т-клеток, и обеспечивают значительные улучшения по сравнению с введением немодифицированного IL-2. Для устранения недостатков существующих методов

5 лечения аутоиммунных заболеваний, композиции по данному изобретению обеспечивают длительное воздействие при введении и обладают уникальным фармакологическим профилем. Композиции по данному изобретению обеспечивают избирательную экспансию и активируют эндогенные Treg *in vivo* при ограниченной экспансии обычных Т-клеток и/или естественных клеток-киллеров и, таким образом, обеспечивают лучший подход к лечению

10 аутоиммунных заболеваний.

В частности, было обнаружено, что композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, имеющие определенное и преобладающее количество разветвленных фрагментов полиэтиленгликоля, стабильно ковалентно связанных с IL-2 через его

15 аминокислотные группы, являются особенно эффективными при введении в низких дозах. Композиции по данному изобретению эффективно связывают и активируют рецептор IL-2 с целью преимущественного увеличения популяции клеток и иммуносупрессивной функции регуляторных Т-клеток (Treg), при минимальном стимулирующем воздействии на эффекторные Т-клетки (Teff). Продолжительное воздействие композиций по данному

20 изобретению (в общем обозначаемых в данном документе как RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, или в других случаях как композиции RUR-IL-2) в исследованиях на грызунах, приматах, не являющихся человеком, и клинических исследованиях на людях, эффективно обеспечивало величину, продолжительность и специфичность ответов Treg по сравнению с Teff, которые не могут быть достигнуты с эквивалентными дозами немодифицированного IL-

25 2.

Введение однократной низкой возрастающей подкожной дозы композиции селективного стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 (как описано в подтверждающих примерах) людям не приводило к ограничивающей дозу токсичности, серьезным побочным эффектам или клинически значимым отклонениям. Предварительный фармакокинетический анализ

30 показал, что композиция достигала максимальных концентраций примерно через 4-6 дней после введения дозы у большинства субъектов, с небольшими изменениями концентраций на протяжении примерно до 2 недель после введения дозы, после чего концентрации снижались

с периодом полувыведения примерно 8-9 суток. Предварительная фармакодинамическая оценка показала, что введение композиции стимулятора Treg, селективного агониста рецептора IL-2 длительного действия, приводит к дозозависимому увеличению циркулирующих CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg, т.е. наблюдалось устойчивое увеличение абсолютного количества циркулирующих CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg, уровни которых возвращаются к базовому уровню только через примерно 20-25 дней после введения. Было отмечено среднее увеличение количества CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg в несколько раз (с величиной, зависящей от дозы) по сравнению с уровнем до введения дозы. Также наблюдалось увеличение общей популяции CD4+FoxP3+CD25⁺ Treg, хотя величина изменения была меньше, чем наблюдаемая для CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg. Для самых низких доз не наблюдалось изменений в количестве Treg у субъектов, получавших лечение, по сравнению с субъектами, получавшими плацебо. Первичный эффект был замечен на Treg, поскольку не наблюдалось никаких изменений в процентном соотношении или численности популяций Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺) по сравнению с композицией RUR_{20kD}-IL-2 при любой дозе. Таким образом, композиции и способы по данному изобретению неожиданно эффективно повышают супрессивную способность Treg в биоанализах *in vivo/ex vivo* (даже по сравнению с альтернативными химически модифицированными соединениями IL-2) и в исследованиях на людях, как будет описано в следующих разделах, наряду с другими характеристиками.

Композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, полезны (среди прочего) для лечения аутоиммунных заболеваний и расстройств. Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить введением композиции RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, как описано в данном документе, включают системные состояния, такие как системная красная волчанка (СКВ), неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, ревматоидный артрит, атопический дерматит, системный склероз, анкилозирующий спондилит, болезнь «трансплантат против хозяина» и полимиозит; или органоспецифические аутоиммунные заболевания, включая диабет I типа, болезнь Аддисона, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, синдром Шегрена, витилиго, злокачественную анемию, гломерулонефрит, тяжёлую псевдопаралитическую миастению, синдром Гудпасчера, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру и фиброз легких.

В некоторых вариантах реализации состояние, которое лечат, представляет собой системную красную волчанку (СКВ). Системная красная волчанка (СКВ) - это аутоиммунное воспалительное заболевание, которое поражает в основном женщин среднего возраста.

Характеристики СКВ включают, например, кожные высыпания, боли в суставах,

5 рецидивирующий плеврит и заболевание почек. Прогрессирующий гомеостатический дисбаланс Treg по отношению к T_{con} является общей особенностью многих аутоиммунных заболеваний, включая СКВ. Взятые вместе, терапевтическая гипотеза, связывающая гомеостаз Treg с патологией СКВ, активность низких доз IL-2 у пациентов с СКВ и превосходная способность к индукции Treg у RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций, 10 описанных в данном документе, по сравнению с IL-2, обеспечивают достаточную поддержку использования RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций по данному изобретению при лечении СКВ и других аутоиммунных заболеваний и состояний. В одном или нескольких дополнительных вариантах реализации, в данном документе предусматривается способ лечения состояния путем введения композиции, связанной с RUR- 15 IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, как описано в данном документе, причем состояние выбирают из группы, состоящей, например, из аллергии, БТПХ, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, ревматоидного артрита, диабета 1 типа, рассеянного склероза и псориаза.

В еще некоторых других вариантах реализации композиции, связанные с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, эффективны при введении в терапевтически эффективной дозе субъекту для 20 преимущественной экспансии и активации регуляторных Т-клеток по сравнению с обычными Т-клетками и естественными клетками-киллерами.

В другом аспекте в данном документе предлагается способ увеличения соотношения регуляторных Т-клеток к эффекторным Т-клеткам у субъекта путем введения субъекту терапевтически эффективной дозы композиции, связанной с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, как 25 описано в данном документе.

В некоторых вариантах реализации, относящихся к вышеизложенному способу, регуляторные Т-клетки выбирают из клеток Foxp3⁺ и CD25⁺. В одном или нескольких вариантах реализации, относящихся к предшествующему варианту или способу, эффекторные Т-клетки выбирают из клеток CD4⁺ и CD8⁺.

30 В некоторых дополнительных вариантах реализации, относящихся к способу или родственным вариантам реализации, приведенным выше, кратность повышения регуляторных Т-клеток по сравнению с базовым уровнем достигает значения, равного по

меньшей мере примерно 2, или по меньшей мере примерно 4, или даже по меньшей мере примерно 6, при оценке на *in vivo* мышинной модели.

В некоторых вариантах реализации способа увеличение количества регуляторных Т-клеток поддерживается выше базового уровня в течение по меньшей мере 3 суток после введения. В некоторых дополнительных вариантах реализации увеличение количества регуляторных Т-клеток поддерживается выше базовых уровней в течение по меньшей мере 5 суток после введения. Предпочтительно, увеличение количества регуляторных Т-клеток поддерживается выше базового уровня в течение по меньшей мере 7 суток.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции селективного стимулятора Treg, включая варианты композиции, связанные с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, как описано выше или в других разделах данного документа.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, выбранной из группы, состоящей из: RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы В, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы D и RUR_{20kD}-IL-2 Формулы Е.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, выбранной из группы, состоящей из: RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы В и RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы В.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С.

Еще один дополнительный аспект данного документа предусматривает применение в терапии композиции, выбранной из группы, состоящей из: RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы В, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы D и RUR_{20kD}-IL-2 Формулы Е.

5 В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается применение в терапии композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается применение в терапии композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы Б.

10 В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается применение в терапии композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается применение в терапии композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы D.

В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается применение в терапии композиции RUR_{20kD}-IL-2 Формулы Е.

15 В еще одном дополнительном аспекте в данном документе предусматривается использование композиции селективного стимулятора Treg, выбранной из группы, состоящей из: RUR_{20kD}-IL-2 Формулы А, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы В, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы С, RUR_{20kD}-IL-2 Формулы D и RUR_{20kD}-IL-2 Формулы Е, для производства лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания.

20 В более конкретном варианте реализации лечение системной красной волчанки (СКВ) включает подкожное введение состава, содержащего терапевтически эффективное количество композиций, связанных с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2. См., например, результаты, описанные в Примере 8, которые иллюстрируют действие Treg, индуцируемых композицией RUR_{20kD}-IL-2, на контроль физиологического иммунного ответа и прогрессирование

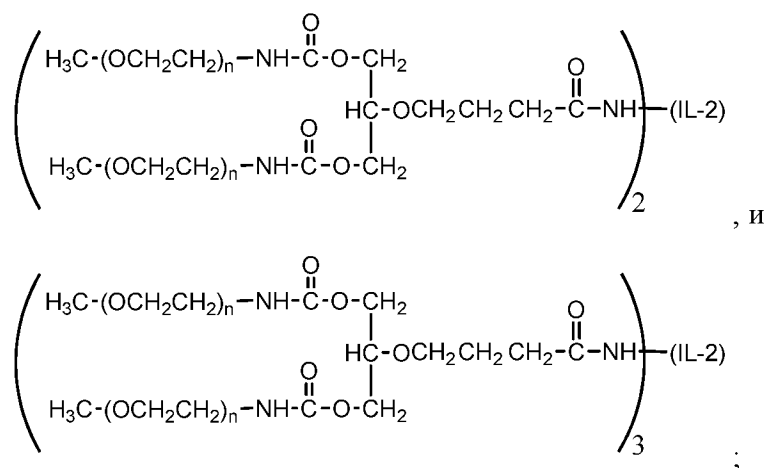
25 заболевания в репрезентативной животной модели СКВ. Как описано в нем, композиция RUR_{20kD}-IL-2 эффективно подавляла биомаркер поражения почек (одна из характеристик пациентов, страдающих СКВ), почти до тех же уровней, которые наблюдались у нормальных мышей.

В вариантах реализации, которые относятся к способу лечения, как описано в данном

30 документе, такие варианты реализации также являются дополнительными вариантами реализации для использования при таком лечении или, альтернативно, для использования в производстве лекарственного средства для использования в таком лечении. Данное

изобретение дополнительно предусматривает композицию согласно любому из вариантов реализации композиции, включая ее состав, как описано в данном документе, для использования в терапии. Данное изобретение дополнительно предусматривает композицию согласно любому из вариантов реализации композиции, включая ее состав, как описано в данном документе, для применения при лечении аутоиммунного заболевания.

В одном аспекте данное изобретение предусматривает композицию, содержащую пегилированные конъюгаты IL-2, имеющие структуру:



где:

IL-2 представляет собой интерлейкин-2;

n независимо в каждом случае обозначает целое число от примерно 3 до примерно 4000;

для использования в терапии. В конкретном варианте реализации указанной

композиции для применения в терапии, IL-2 представляет собой алдеслейкин. В конкретном варианте реализации указанных композиций для использования в терапии, номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон. В другом конкретном варианте реализации указанных композиций для применения в терапии конъюгаты пегилированного IL-2 композиции содержат фрагмент ПЭГ, присоединенный к лизину 31. В конкретном варианте реализации указанных композиций для использования в терапии, терапия предназначена для использования при аутоиммунных заболеваниях.

Термины

При описании и в формулировках определенных заявляемых признаков данного изобретения будет использоваться следующая терминология в соответствии с

5 определениями, описанными ниже, если не указано иное.

Термин «селективный», используемый и описываемый в данном документе, относится к иммунологическому ответу *in vivo*, который воплощает характеристики индуцированных иммунных клеток или иммунологические сигнальные ответы в некоторых отношениях, но не в других. В частности, «селективный» в отношении индукции и/или активации Treg

10 относится к иммунному ответу, представляющему увеличение количества клеток Treg (с высоким показателем CD25 и общего, по данным проточной цитометрии), и/или повышение состояния активации Treg, на что указывает один или несколько маркеров активации, таких как ICOS, Ki67 или Stat5, и/или активация относится к последующим индуцированным иммуносупрессивным ответам, и/или индуцированным реакциям иммунологической

15 толерантности при отсутствии некоторых других иммунных ответов. В этом контексте «селективная индукция Treg» относится к описанному иммунному ответу Treg, при отсутствии, в то же время, значительных и/или клинически выраженных эффекторных Т-клеток и связанных иммунологических реакций активации. Значимые и/или клинически выраженные эффекторные Т-клетки и связанные с ними иммунологические реакции

20 активации включают, например, пролиферацию CD4-положительных эффекторных Т-клеток и/или CD8-положительных эффекторных Т-клеток, и/или маркеры активации, такие как ICOS или Ki67, или другие хорошо известные эффекторные иммунные ответы. Другие сигналы эффекторного иммунного ответа могут включать повышение определенных

25 провоспалительных цитокинов, таких как известные как «цитокиновый синдром» и/или таких как IL-5, INF_{гамма}, IL-6, IFN_{альфа}, IL-17, IL-22, IL-19. Селективная стимуляция Treg также может отражаться на среднем соотношении Treg:Tcon. Предпочтительно, среднее соотношение Treg:Tcon, достигаемое в ответ на композиции, связанные с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, описанные в данном документе, составляет по меньшей мере 5,

предпочтительно, 7, и более предпочтительно, 10 или больше.

30 Термин «степень пегилирования» в контексте данного описания относится к числу стабильных заместителей ПЭГ, ковалентно связанных с аминокислотной (аминокислотами) отдельного полипептида алдеслейкина.

Используемый в данном документе термин «примерно» означает удовлетворительную близость к указанному числовому значению, такую как плюс или минус 10% от указанного числового значения. Предпочтительно, «примерно» или «приблизительно» в контексте данного описания означает нахождение в пределах плюс или минус 5% от заданного количества.

Используемый в данном документе термин «n' равно 2 и 3» относится к смесям конъюгатов IL-2, причем указанные смеси содержат дипегилированные и трипегилированные конъюгаты, как описано в данном документе.

Термин «регуляторные Т-клетки» или «Tregs» относятся к Т-клеткам, таким как фенотипы CD4⁺FoxP3⁺CD25^{яркие} (см., например, Jeffrey A. Bluestone and Qizhi Tang, Treg cells—the next frontier of cell therapy, Science, 12 October 2018 • Vol. 362 Issue 6411, p.154-155).

Термин «T_{con}» или «обычные Т-клетки» относится к Т-лимфоцитам, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор αβ (TCR), а также корецептор CD4 или CD8 и выполняют хорошо изученные эффекторные функции адаптивного иммунитета, такие как функции Т-хелперных клеток и эффекторные функции цитотоксических Т-клеток. Например, T_{con} может относиться к CD4⁺CD25⁻ наивным обычным Т-клеткам. «Эффекторные Т-клетки (Teff)» относятся к эффекторным клеточным фенотипам CD4⁺ и CD8⁺, таким как хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки и другие, как известно квалифицированному специалисту. «ЕК-клетки», также известные как «естественные киллерные клетки», «К-клетки» или «клетки-киллеры», представляют собой тип лимфоцитов (лейкоцитов) и компонент врожденной иммунной системы. ЕК-клетки играют важную роль в отторжении хозяином опухолей и инфицированных вирусом клеток.

«Промежуточный продукт IL-2» относится к полипептиду IL-2, в частности, к алдеслейкину. «RUR_{20kD}-IL-2» относится к конъюгатам IL-2 с ПЭГ, в которых часть IL-2 представляет собой алдеслейкин, как описано в данном документе, и часть ПЭГ имеет значение, описанное в данном документе. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 может также в общем обозначаться с помощью химического названия (1,3-бис(метоксиполи(этиленгликоль)_{10kDa}-карбамоил)-2-пропанокси)-4-бутанамид)интерлейкин-2), с указанием на то, что данное название не описывает композицию в полной мере. В данном контексте алдеслейкин относится к 125-L-серин-2-133 интерлейкину-2, рекомбинантному негликозилированному интерлейкину-2, экспрессируемому в *E. coli*. Аминокислотная последовательность алдеслейкина представлена на Фиг. 2. Алдеслейкин, экспрессируемый в других системах-

хозяевах, известных специалисту в данной области, также подпадает под значение термина, используемого в данном документе.

Используемый в данном документе термин «IL-2» относится к фрагменту, обладающему активностью человеческого IL-2. Термин «фрагмент IL-2» относится к
5 фрагменту IL-2 до присоединения к фрагменту разветвленного полиэтиленгликоля, а также к фрагменту IL-2 после ковалентного присоединения. Следует понимать, что когда исходный фрагмент IL-2 присоединен к полимеру полиэтиленгликоля, такому как разветвленный полимер полиэтиленгликоля, представленный в данном документе, фрагмент IL-2 слегка
10 изменяется из-за присутствия одной или нескольких ковалентных связей, ассоциированных со связыванием с фрагментами полиэтиленгликоля. Такая слегка измененная форма фрагмента IL-2, присоединенного к другой молекуле, называется в данном документе «остатком» фрагмента IL-2. Термин «остаток» в контексте остатка IL-2 означает часть молекулы IL-2, которая остается после ковалентного присоединения к полимеру, такому как
15 полиэтиленгликоль, по одному или нескольким сайтам ковалентного присоединения, как изображено на формулах в данном документе. Обычно сайт присоединения представляет собой одну из 11 аминокислот лизина в IL-2.

Следует понимать, что когда немодифицированный IL-2 присоединяется к полимеру, такому как полиэтиленгликоль, IL-2 слегка изменяется из-за присутствия одной или
20 нескольких ковалентных связей, ассоциированных со связыванием с полимером (полимерами). Такая слегка измененная форма IL-2, присоединенная к другой молекуле, такой как разветвленный фрагмент ПЭГ, может в некоторых случаях упоминаться как «остаток» IL-2, или может быть просто обозначена как «IL-2» и т.п., с пониманием того, что IL-2, содержащийся в таком полимерном конъюгате, слегка изменен из-за присутствия одной
25 или нескольких ковалентных связей, каждая из которых связывает разветвленный фрагмент ПЭГ с IL-2. Термин «конъюгаты IL-2 с более высокой степенью пегилирования» относится к тетра-ПЭГ конъюгатам или пента-ПЭГ конъюгатам, или конъюгатам, содержащим до 11 фрагментов ПЭГ. Предпочтительно, «конъюгаты IL-2 с более высокой степенью пегилирования» относятся к тетра-ПЭГ конъюгатам или пента-ПЭГ конъюгатам.

Например, белки, имеющие аминокислотную последовательность, соответствующую
30 любой из SEQ ID NO: 1-4, описанных в международной патентной публикации № WO 2012/065086, являются типичными примерами белков IL-2, как и любые белки или полипептиды, по существу гомологичные им. Термин по существу гомологичный означает,

что конкретная рассматриваемая последовательность, например, мутантная последовательность, отличается от референсной последовательности одной или несколькими заменами, делециями или добавлениями, суммарный эффект которых не приводит к неблагоприятному функциональному несходству между референсной и рассматриваемой последовательностями. Для целей данного описания последовательности, имеющие более 95 процентов гомологии, эквивалентную биологическую активность (хотя и не обязательно эквивалентную силу биологической активности) и эквивалентные характеристики экспрессии, считаются по существу гомологичными. В целях определения гомологии, усечение зрелой последовательности не должно приниматься во внимание. Используемый в данном документе термин «IL-2» включает такие белки, специально модифицированные, например, путем сайт-направленного мутагенеза или случайным образом путем мутаций. Эти термины также включают аналоги, имеющие от 1 до 6 дополнительных сайтов гликозилирования, аналоги, содержащие по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту на карбоксиконцевом конце белка, в которых дополнительная аминокислота (дополнительные аминокислоты) включает по меньшей мере один сайт гликозилирования, и аналоги, содержащие аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере один сайт гликозилирования. Термин включает как природные, так и полученные рекомбинантными методами фрагменты. Кроме того, IL-2 может происходить из источников, связанных с человеком, животных и растительных источников. Одним из примеров IL-2 является рекомбинантный IL-2 человека, называемый алдеслейкином (см. Фиг. 2). Ссылка на агонист IL-2R пролонгированного действия, описанный в данном документе, охватывает его фармацевтически приемлемые солевые формы.

Композиции, связанные с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, описанные в данном документе, являются в одном отношении агентами длительного действия. Длительное действие, по отношению к композициям, связанным с RUR-IL-2 или RUR_{20kD}-IL-2, предусматриваемым в данном документе, относится к такой композиции, которая имеет период полувыведения из циркуляции в плазме крови, превышающий аналогичный показатель для такого же агониста IL-2R (например, алдеслейкина или другой подходящей последовательности интерлейкина-2), не подвергнутого модификации. Например, агонист сравнения не модифицируют путем ковалентного присоединения к одному или нескольким водорастворимым полимерным фрагментам, таким как фрагменты полиэтиленгликоля, и сравнение проводят при введении

белка в количестве, эквивалентном дозе агониста IL-2R, тому же субъекту, и оценивают с использованием того же фармакокинетического анализа.

Термин «ПЭГ» или «полиэтиленгликоль», используемый в данном документе, должен охватывать любой водорастворимый поли(этиленоксид). Если не указано иное, «полимер ПЭГ» или полиэтиленгликоль представляет собой полимер, в котором практически все (предпочтительно все) мономерные субъединицы являются субъединицами этиленоксида, хотя указанный полимер может содержать отдельные концевые фрагменты или функциональные группы, например, для конъюгации. Полимеры ПЭГ для использования в данном изобретении будут содержать одну из двух следующих структур: « $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ » или « $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$ », в зависимости от того, был ли замещен концевой кислород (кислороды), например, в процессе синтетического преобразования. Как указано выше, для полимеров ПЭГ переменная (n) находится в диапазоне значений от примерно 3 до 4000, и концевые группы и архитектура всего ПЭГ могут варьироваться. Предпочтительно, ПЭГ имеет конкретное значение, как подробно описано в данном документе.

«Разветвленный» применительно к геометрии или общей структуре полимера относится к полимеру, имеющему две или более полимерных «ветвей» или «цепей», отходящих от точки разветвления или центрального структурного элемента. В качестве примера, иллюстративный реагент ПЭГ, мПЭГ2-бутановая кислота, сложный эфир N-гидроксисукцинимид (1,3-бис(метоксиполи(этиленгликоль)карбамоил)-2-пропанокси)-4-сукцинимидилбутаноат) представляет собой разветвленный полимер полиэтиленгликоля, состоящий из двух линейных цепей ПЭГ, каждая из которых ковалентно присоединена через карбаматную связь ($\sim\text{NHC}(\text{O})\text{O}\sim$) к 1- и 3-атомам углерода, соответственно, центральной пропильной группы, от которой отходит сукцинимидиловый эфир оксибутаноата.

Молекулярная масса в контексте водорастворимого полимера, такого как ПЭГ, может быть выражена либо как среднечисловая (номинальная) молекулярная масса, либо как средневзвешенная молекулярная масса. Если не указано иное, все ссылки на молекулярную массу в данном документе относятся к номинальной средней молекулярной массе. Оба определения молекулярной массы, среднечисловой и средневзвешенной, можно измерить с помощью гель-проникающей хроматографии, гель-фильтрационной хроматографии или других методов жидкостной хроматографии. Также могут быть использованы другие методы измерения значений молекулярной массы, такие как использование анализа концевых групп или измерение коллигативных свойств (например, снижение точки замерзания, повышение

точки кипения или осмотическое давление) для определения среднечисловой молекулярной массы. или использование методов светорассеяния, ультрацентрифугирования или вискозиметрии для определения средневзвешенной молекулярной массы. Гель-фильтрационная хроматография часто используется для определения средней молекулярной массы разветвленных полимеров. Полимеры ПЭГ обычно являются полидисперсными (т.е. среднечисловая молекулярная масса и средневзвешенная молекулярная масса полимеров не равны), обладают низкими значениями полидисперсности, предпочтительно, менее примерно 1,2, более предпочтительно, менее примерно 1,15, еще более предпочтительно, менее примерно 1,10, еще более предпочтительно, менее примерно 1,05, и наиболее предпочтительно, менее примерно 1,03.

«Стабильная» связь или связь относится к химической связи, которая является по существу стабильной в воде, то есть не подвергается гидролизу в физиологических условиях в сколько-нибудь заметной степени в течение длительного периода времени. Примеры гидролитически стабильных связей обычно включают, без ограничений, следующие: углерод-углеродные связи (например, в алифатических цепях), простые эфиры, амиды, амины и т.п. Как правило, стабильной является такая связь, которая демонстрирует скорость гидролиза менее примерно 1-2% в день в физиологических условиях. Скорости гидролиза типичных химических связей можно найти в большинстве стандартных учебников химии.

При использовании в данном документе, формы единственного числа включают обсуждаемые объекты во множественном числе, если контекст явно не указывает иное.

«По существу» или «существенно» означает почти полностью или полностью, например, 95% от данного количества или более, если не указано иное.

Приготовление и примеры

Следует понимать, что приведенные ниже приготовления и примеры представлены с целью иллюстрации, а не ограничения, и что рядовые специалисты в данной области техники могут вносить различные модификации. Способы получения композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, описаны в данном документе и/или известны квалифицированному специалисту. Реагенты и исходные материалы легко доступны или могут быть легко синтезированы специалистом в данной области техники. Подходящие условия для стадий этих способов хорошо известны, и соответствующие замены буферов и реагентов находятся в пределах компетенции

специалиста в данной области. Кроме того, квалифицированному специалисту понятно, что в некоторых обстоятельствах стадии и порядок, в котором осуществляют получение композиции, могут быть изменены, как будет хорошо понятно квалифицированному биохимику. Точно так же следует понимать, что препараты могут быть выделены и/или очищены различными хорошо известными методами, если это необходимо или желательно.

Приготовление промежуточного продукта IL-2:

Фрагмент IL-2 может быть получен нерекомбинантными методами и/или рекомбинантными методами, и данное описание не ограничено в этом отношении. Фрагмент IL-2 может происходить из источников, относящихся к человеку, животных и растительных источников. Например, можно выделить IL-2 из биологических систем или же получить IL-2 из культуральной среды. См., например, процедуры, описанные в патенте США №4401756 и в Pauly et al. (1984) *J. Immunol. Methods* 75(1):73-84.

Способы получения и экспрессии рекомбинантных полипептидов *in vitro*, а также в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах хорошо известны специалистам в данной области техники. (см., например, патент США № 5614185). Фрагмент IL-2 может экспрессироваться в бактериальных [например, *E. coli*, см., например, Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. BioIL-2m*. 21 (3): 295-311], млекопитающих [см., например, Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304], дрожжевых [например, *Pichia pastoris*, см., например, Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1):121-129], и растительных [см., например, Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] системах экспрессии. Хотя основанные на рекомбинации методы получения белков могут различаться, рекомбинантные методы обычно включают конструирование нуклеиновой кислоты, кодирующей желаемый полипептид или фрагмент, клонирование нуклеиновой кислоты в вектор экспрессии, трансформацию клетки-хозяина (например, растительной, бактериальной, дрожжевой, клетки трансгенного животного или клетки млекопитающего, такой как клетка яичника китайского хомячка или клетка почки детеныша хомячка), и экспрессию нуклеиновой кислоты для получения желаемого полипептида или фрагмента. Различные способы очистки белков могут использоваться для очистки композиции по данному изобретению, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994). Чтобы облегчить идентификацию и очистку рекомбинантного полипептида, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие метку эпитопа или

другую последовательность аффинного связывания, могут быть вставлены или добавлены в рамку считывания с кодирующей последовательностью, с образованием в результате слитого белка, состоящего из желаемого полипептида и полипептида, пригодного для связывания.

В зависимости от системы, используемой для экспрессии белков, обладающих активностью IL-2, фрагмент IL-2 может быть негликозилированным или гликозилированным, и любой из них может быть использован. Таким образом, фрагмент IL-2 может быть негликозилированным, или фрагмент IL-2 может быть гликозилированным, и в одном или нескольких предпочтительных вариантах реализации фрагмент IL-2 является негликозилированным. Фрагмент IL-2 также может быть предпочтительно модифицирован для включения и/или замены одного или нескольких аминокислотных остатков, таких как, например, лизин, цистеин и/или аргинин, чтобы обеспечить легкое присоединение полимера к атому в боковой цепи аминокислоты. Пример замены в фрагменте IL-2 (substitution of an IL-2 moiety) описан в патенте США № 5206344. Кроме того, фрагмент IL-2 может быть модифицирован с целью включения не встречающегося в природе аминокислотного остатка. Способы добавления аминокислотных остатков и неприродных аминокислотных остатков хорошо известны специалистам в данной области.

Кроме того, фрагмент IL-2 можно предпочтительно модифицировать, чтобы включить присоединение функциональной группы (отличное от добавления аминокислотного остатка, содержащего функциональную группу). Например, фрагмент IL-2 может быть модифицирован для включения тиольной группы. Кроме того, фрагмент IL-2 может быть модифицирован для включения N-концевого альфа-углерода. Кроме того, фрагмент IL-2 может быть модифицирован для включения одного или нескольких углеводных фрагментов. Кроме того, фрагмент IL-2 может быть модифицирован для включения альдегидной группы. Кроме того, фрагмент IL-2 может быть модифицирован для включения кетонной группы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предпочтительно, чтобы фрагмент IL-2 не был модифицирован путем включения одной или нескольких из тиольной группы, N-концевого альфа-углерода, углевода, альдегидной группы и кетонной группы.

Типичные фрагменты IL-2 описаны в литературе, например, в патентах США №№ 5116943, 5153310, 5635597, 7101965 и 7567215, и публикациях патентных заявок США №№ 2010/0036097 и 2004/0175337. Предпочтительный фрагмент IL-2 имеет аминокислотную последовательность, представленную на Фиг. 2, и представляет собой аминокислотную последовательность алдеслейкина, как используется в данном документе.

В некоторых случаях фрагмент IL-2 будет представлен «мономерной» формой, в которой единичная экспрессия соответствующего пептида осуществляется в дискретную единицу. В других случаях фрагмент IL-2 будет иметь форму «димера» (например, димера рекомбинантного IL-2), в которой две мономерные формы белка связаны друг с другом (например, посредством дисульфидной связи). Например, в контексте димера рекомбинантного IL-2 человека, димер может находиться в форме двух мономеров, связанных друг с другом дисульфидной связью, образованной остатками Cys125 каждого мономера.

Для любого данного пептида или белкового фрагмента или композиции можно определить, обладает ли этот фрагмент активностью IL-2. Различные способы определения активности IL-2 *in vitro* описаны в известном уровне техники и в данном документе. Типичным подходом является описанный в данном документе анализ пролиферации клеток СТТЛ-2. Иллюстративный подход также описан Moreau et al. (1995) *Mol. Immunol.* 32:1047-1056). Вкратце, в неспецифическом анализе связывания, предлагаемый фрагмент IL-2 или композицию предварительно инкубируют в течение одного часа при 4 °C в присутствии клеточной линии, несущей рецептор IL-2. После этого IL-2, меченый ¹²⁵I, инкубируют в системе в течение трех часов при 4 °C. Данные выражают в % ингибирующей способности для активности предлагаемого фрагмента IL-2 по сравнению с IL-2 дикого типа. Другие методологии, известные в данной области техники, также могут быть использованы для оценки функции IL-2, включая электрометрию, спектрофотометрию, хроматографию и радиометрические методы.

Приготовление композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции:

Типичную композицию селективного стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 обычно получают путем проведения реакции очищенного IL-2 с молярным избытком реагента ПЭГ (избыток молярных эквивалентов по отношению к IL-2), сложного эфира N-гидроксисукцинимид мПЭГ2(20кД)-бутановой кислоты (или любого другого подходящим образом активированного сложного эфира) (1,3-бис(метоксиполи(этиленгликоль)MB10000-карбамоил)-2-пропанокси)-4-сукцинимидилбутаноат, в растворе бисина при высоком значении pH около 9. Реагенты перемешивают в течение от примерно 30 минут до примерно 5 часов, или от примерно 30 минут до 4 часов, или от примерно 30 минут до 2 часов, или от

примерно 30 минут до 1 часа, обычно в мягких условиях, например, от примерно 20 °C до примерно 65 °C, или от примерно 20 °C до примерно 40 °C, или при температуре окружающей среды или при комнатной температуре. Реакцию гасят подкислением до низкого значения pH путем добавления подходящей кислоты, такой как уксусная кислота.

5 Продукт реакции, представляющий собой пегилированный gIL-2, затем очищают подходящим методом, таким как ионообменная хроматография. Например, при использовании ионообменной хроматографии композиция RUR_{20kD}-IL-2 связывается со смолой, а затем элюируется подходящим градиентом, таким как градиент хлорида натрия. Объединенный продукт хроматографии затем концентрируют и подвергают диафильтрации в
10 подходящем буфере для композиции (например, натрий-ацетатный буфер с сахарозой), используя, например, фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF).

 При желании, объединенный продукт может быть дополнительно разделен на изомеры положения методом обращенно-фазовой хроматографии с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ) на
15 подходящей колонке (например, на колонке C18 или колонке C3, коммерчески доступных от таких компаний, как Amersham Biosciences или Vydac), или методом ионообменной хроматографии с использованием ионообменной колонки, например, ионообменной колонки Sepharose™, поставляемой фирмой Amersham Biosciences. Любой подход можно использовать для разделения изомеров полимер-активный агент, имеющих одинаковую
20 молекулярную массу (т.е. позиционные изоформы).

 Композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, могут быть охарактеризованы различными аналитическими методами и методами биоанализа, описанными в данном документе и/или известными
25 квалифицированному специалисту, включая аналитическую ВЭЖХ, ДСН-ПААГ, ЖХ-МС и биологические анализы, такие как пролиферация CTLL-2, и индукцию Treg *in vivo*.

Составы:

 В еще одном или нескольких вариантах реализации в данном документе предусматривается композиция селективного стимулятора Treg, включая варианты
30 реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, содержащие композицию конъюгата IL-2, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

«Фармацевтически приемлемый эксципиент» или «фармацевтически приемлемый носитель» относится к компоненту, который может быть включен в композиции, описанные в данном документе, и не вызывает значительных неблагоприятных токсикологических эффектов у субъекта. Композиции по данному изобретению предпочтительно составляют в виде

5 фармацевтических композиций для введения любым путем, делающих композицию биодоступной, например, парентеральным введением, включая внутривенное, внутримышечное или подкожное. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins,

10 2006)). Необязательно, предусматриваемые в данном документе композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, и типичные примеры эксципиентов включают, без ограничений, выбранные из группы, состоящей из углеводов, неорганических солей, антимикробных агентов, антиоксидантов, поверхностно-активных веществ, буферов, кислот, оснований, аминокислот, и их комбинаций. Количество любого

15 отдельного эксципиента в композиции будет варьироваться в зависимости от активности эксципиента и конкретных требований к композиции. Как правило, оптимальное количество любого отдельного эксципиента определяется путем экспериментов, т.е. путем приготовления композиций, содержащих различные количества эксципиента (в диапазоне от низких до высоких), исследования стабильности и других параметров, а затем определения

20 диапазона, в котором достигается оптимальная эффективность без значительных побочных эффектов. В качестве эксципиента может присутствовать углевод, такой как сахар, дериватизированный сахар, такой как альдит, альдоновая кислота, этерифицированный сахар и/или сахарный полимер. Конкретные углеводные эксципиенты включают, например:

25 моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелецитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), пиранозилсорбит, миоинозит, циклодекстрины и т.п. Эксципиент также может включать неорганическую соль или буфер, такие как лимонная кислота, хлорид натрия, хлорид калия, сульфат натрия, нитрат калия,

30 одноосновный фосфат натрия, двухосновный фосфат натрия и их комбинации. Композиция также может включать противомикробный агент для предотвращения или сдерживания роста микроорганизмов. Неограничивающие примеры противомикробных агентов, подходящих для

одного или нескольких вариантов реализации данного изобретения, включают хлорид бензалкония, хлорид бензетония, бензиловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорбутанол, фенол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилмеркуриевой кислоты, тимерсол и их комбинации. В композиции может также присутствовать антиоксидант. Антиоксиданты используются для предотвращения окисления, тем самым предотвращая порчу конъюгата или других компонентов препарата. Подходящие антиоксиданты для использования в одном или нескольких вариантах реализации данного изобретения включают, например, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, гипофосфористую кислоту, монотиоглицерин, пропилгаллат, бисульфит натрия, формальдегидсульфоксилат натрия, метабисульфит натрия и их комбинации. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в качестве эксципиента. Типичные примеры поверхностно-активных веществ включают: полисорбаты, такие как «Твин 20» и «Твин 80», и плуроники, такие как F68 и F88 (оба доступны от BASF, Маунт Олив, Нью-Джерси); сложные эфиры сорбитана; липиды, такие как фосфолипиды, такие как лецитин и другие фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины (хотя предпочтительно не в липосомальной форме), жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот; стероиды, такие как холестерин; и хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; цинк и другие подобные подходящие катионы. Кислоты или основания могут присутствовать в композиции в качестве эксципиента. Неограничивающие примеры кислот, которые могут быть использованы, включают кислоты, выбранные из группы, состоящей из соляной кислоты, уксусной кислоты, фосфорной кислоты, лимонной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты, муравьиной кислоты, трихлоруксусной кислоты, азотной кислоты, перхлорной кислоты, фосфорной кислоты, серной кислоты, фумаровой кислоты, и их комбинаций. Примеры подходящих оснований включают, без ограничений, основания, выбранные из группы, состоящей из гидроксида натрия, ацетата натрия, гидроксида аммония, гидроксида калия, ацетата аммония, ацетата калия, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия, формиата натрия, сульфата натрия, сульфата калия, фумарата (fumerate) калия, и их комбинаций. Одна или несколько аминокислот могут присутствовать в качестве жксципиента в композициях, описанных в данном документе. Типичные примеры аминокислот в этом отношении включают аргинин, лизин и глицин. Дополнительные подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают вещества, описанные, например, в Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012. Предпочтительный состав композиций

селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, предусматриваемые в данном документе, представляет собой 1,5 мг/мл белкового эквивалента, 10 мМ ацетата натрия, 110 мМ хлорида натрия, 2% сахарозы (мас./об.), pH 5,0. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 может храниться в стерильных одноразовых поликарбонатных флаконах соответствующего объема с полипропиленовым колпачком с силиконовым вкладышем, поставляемых стерильными и готовыми к использованию.

Дозирование:

Дозируемое количество композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, но оптимально будет терапевтически эффективной дозой, при хранении композиции в стандартном контейнере с единичной дозой (например, флаконе). Кроме того, фармацевтический препарат может быть помещен в шприц. Терапевтически эффективная доза может быть определена экспериментально путем повторного введения возрастающих количеств композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, с целью определения количества, дающего клинически желаемую конечную точку, как описано в данном документе, такую как облегчение аутоиммунных симптомов и/или иммуносупрессия, и/или индукция толерантности.

Предпочтительными дозировочными количествами являются низкие дозированные количества, эффективно обеспечивающие преимущественную экспансию и активацию регуляторных Т-клеток по сравнению с обычными Т-клетками и естественными клетками-киллерами у субъекта. Активацию регуляторных Т-клеток можно измерить с помощью ряда различных подходов. Например, учитывая неотъемлемую роль STAT5 в IL-2-зависимых Т-клеточных процессах, детектирование повышенного STAT5 в лимфоцитах можно использовать в качестве ключевого маркера активации Treg. Фенотипически активация Treg также может быть измерена методом проточной цитометрии по увеличению IL-2R α (CD25) на клеточной поверхности и/или увеличению внутриклеточной экспрессии белка forkhead box P3 (Foxp3), главного регулятора роста Treg, и/или повышенной экспрессии белка Ki67, который связан с пролиферацией клеток. В совокупности эти маркеры связаны с функциональностью клеток Treg и часто разрегулированы в таких клетках при

аутоиммунных заболеваниях. В данном документе, предпочтительно, определение индукции и активации клеток Treg осуществляется методом проточной цитометрии. Функциональность Treg также можно оценить с помощью теста супрессии *ex vivo*, который измеряет их способность ингибировать пролиферацию обычных Т-клеток. Последствия мобилизации и активации Treg также можно непосредственно измерить *in vivo* с использованием моделей воспаления, управляемого антигеном.

Введение вариантов реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций, представленных в данном документе, обычно осуществляется путем инъекции. Предусмотрены также другие способы введения, такие как легочное, назальное, буккальное, ректальное, сублингвальное и трансдермальное. Используемый в данном документе термин «парентеральный» включает подкожную, внутривенную, внутриартериальную, внутриопухолевую, внутрилимфатическую, внутрибрюшинную, внутрисердечную, интратекальную, и внутримышечную инъекции, а также вливания. В конкретном варианте реализации инъекция осуществляется подкожно. Например, введение пациенту может быть осуществлено путем инъекции композиции, содержащей варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, и разбавитель. Что касается возможных разбавителей, то разбавитель может быть выбран, например, из бактериостатической воды для инъекций, 5%-ной декстрозы в воде, забуференного фосфатом физиологического раствора, раствора Рингера, раствора Рингера с лактатом, физиологического раствора, стерильной воды, деионизированной воды, и их комбинаций. Рядовой специалист в данной области может определить путем тестирования, совместимы ли два определенных фармакологических компонента в данном составе. Типичный пример композиции для введения пациенту, например, препарата для подкожного введения, содержит, например, терапевтически эффективную дозу вариантов реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций, представленных в данном документе, воду, ацетат натрия, хлорид натрия и сахарозу. Жидкая композиция будет иметь pH в диапазоне примерно 4,5-7,5; или примерно 4,5-6.

В некоторых вариантах реализации композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, находятся в твердой форме. Предпочтительными твердыми формами являются представляющие собой твердые сухие формы, например, содержащие менее 5 % мас. воды, или предпочтительно менее 2 % мас. воды. Твердые формы обычно пригодны для

восстановления в водном разбавителе. Предпочтительные твердые составы стабильны в течение по меньшей мере примерно 24 месяцев при хранении в герметичных контейнерах при температуре около 0-10 °C.

5 Термин «пациент» или «субъект», используемый в данном документе, относится к живому организму, страдающему или склонному к состоянию, которое можно предотвратить или лечить путем введения композиции, предусмотренной в данном документе, такому как аутоиммунное заболевание, и включает как людей, так и животных. Субъекты включают, без ограничений, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, бычьих, свиней, собачьих, кошачьих и т.п.), и предпочтительно являются людьми. В некоторых вариантах
10 реализации пациент, предпочтительно, человек, дополнительно характеризуется заболеванием, расстройством или состоянием, таким как аутоиммунное состояние, при котором будет полезно введение композиции по данному изобретению.

Термин «лечение» или «проведение лечения», используемый в данном документе, относится к тактике ведения и уходу за пациентом, страдающим от состояния, для которого
15 показано введение композиции по данному изобретению, с целью устранения или облегчения симптомов и осложнений указанных состояний. Лечение включает введение композиции по данному изобретению пациенту, нуждающемуся в этом, для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения заболевания, состояния или расстройства. Например, аутоиммунного заболевания.
20 Предпочтительно, лечение включает введение композиции по данному изобретению пациенту, нуждающемуся в этом, чтобы вызвать иммуносупрессию и/или толерантность. Пациент, подлежащий лечению, является животным, и предпочтительно человеком. Введение, в используемом в данном документе значении, включает либо поглощение композиции пациентом, и/или предписание пациенту принимать композицию.

25 Фразы «фармацевтически эффективное количество», «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» и «физиологически эффективное количество» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству RUR_{20kD}-IL-2 и родственной композиции, представленных в данном документе, которое необходимо для достижения желаемого уровня вещества в кровотоке или целевой ткани.
30 Точное количество будет зависеть от множества факторов, таких как, например, конкретное состояние, лечение которого проводится, предполагаемая популяция пациентов,

индивидуальные особенности пациента, компоненты и физические характеристики терапевтической композиции, которую нужно вводить, и т.п.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по данному изобретению, можно вводить парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Парентеральное
5 введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или механического инъектора. Альтернативно, парентеральное введение может осуществляться с помощью инфузионной помпы. Варианты реализации данного изобретения предусматривают фармацевтические композиции, пригодные для введения пациенту, включая введение нуждающемуся в этом
10 пациенту терапевтически эффективного количества композиции по данному изобретению и одного или нескольких фармацевтически приемлемых эксципиентов. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением традиционных эксципиентов для фармацевтических продуктов, хорошо известных в данной области техники. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition,
15 University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)).

Дозы композиций селективных стимуляторов Treg, включая RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, а также схема введения доз, связанная со способами и композициями, будут варьироваться в зависимости от возраста, веса и общего состояния пациента. а также типа и статуса состояния, подлежащего лечению,
20 заключения медицинского работника и конкретной композиции селективного стимулятора Treg, которую следует вводить.

В используемом в данном документе значении, термин «эффективное количество» относится к такому количеству или дозе композиции по данному изобретению, которые при однократном или многократном введении доз пациенту или субъекту вызывают
25 биологический или медицинский ответ от, или желаемое терапевтическое воздействие на, ткань, систему, животного, млекопитающего или человека, к которым стремится исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Предпочтительно, эффективное количество относится к количеству или дозе композиции по данному изобретению, которые при однократном или многократном введении пациенту или субъекту будут вызывать
30 селективное повышение Treg-клеток по меньшей мере в 10 раз по сравнению с уровнями до введения дозы. Доза может включать в себя более высокую начальную ударную дозу с последующей более низкой дозой. В одном или нескольких случаях терапевтически

эффективное количество композиций селективных стимуляторов Treg, включая RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, представляет собой количество, охватываемое одним или несколькими из следующих диапазонов, выраженное в количестве IL-2: от примерно 0,10 до примерно 700 мкг/кг; от примерно 0,20 до примерно 650 мкг/кг, от примерно 0,30 до примерно 600 мкг/кг; от примерно 1,0 до примерно 550 мкг/кг, от примерно 2,0 до примерно 500 мкг/кг, от примерно 10 до примерно 450 мкг/кг, от примерно 25 до примерно 400 мкг/кг, от примерно 50 до примерно 350 мкг/кг или от примерно 100 до примерно 300 мкг/кг, включая любые и все комбинации вышеприведенных начальных и конечных значений из каждого и всех вышеуказанных диапазонов. В некоторых вариантах реализации, например, для лечения аутоиммунного заболевания, или заболевания или состояния, при которых может быть благоприятной преимущественная экспансия и активация регуляторных Т-клеток по сравнению с обычными Т-клетками и естественными клетками-киллерами у субъекта, композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, вводят в определенной дозе, например, в дозе меньше или равной 500 мкг/кг. Предпочтительной схемой введения доз по данному изобретению является такая, в которой RUR_{20kD}-IL-2 и родственную композицию, в частности, композиции в соответствии с формулами А-Е, вводят в дозе 3-24 мкг/кг один раз в две недели. Другой предпочтительной схемой введения доз по данному изобретению является такая, в которой RUR_{20kD}-IL-2 и родственную композицию, в частности, композиции в соответствии с формулами А-Е, вводят в дозе 3-18 мкг/кг один раз в две недели. Другой предпочтительной схемой введения доз по данному изобретению является такая, в которой RUR_{20kD}-IL-2 и родственную композицию, в частности, композиции в соответствии с формулами А-Е, вводят в дозе 3-12 мкг/кг один раз в две недели. Другой предпочтительной схемой введения доз по данному изобретению является такая, в которой RUR_{20kD}-IL-2 и родственную композицию, и в частности, композиции в соответствии с формулами А-Е, вводят в дозе 3-6 мкг/кг один раз в две недели. Другой предпочтительной схемой введения доз по данному изобретению является такая, в которой RUR_{20kD}-IL-2 и родственную композицию, в частности, композиции в соответствии с формулами А-Е, вводят в дозе 3 мкг/кг один раз в две недели.

Предусматриваемые в данном документе композиции эффективно восстанавливают гомеостатическую способность иммунной системы, например, обладают способностью положительно влиять на заболевания, при которых дисфункция Treg играет определенную

роль, такие как аутоиммунные заболевания, аллергия и отторжение трансплантата. В одном варианте реализации в данном документе предусматривается способ селективной экспансии эндогенных Treg *in vivo* путем введения композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе. Иллюстративные дозовые диапазоны включают, например, от примерно 100 мкг/кг до примерно 500 мкг/кг, или от примерно 150 мкг/кг до примерно 450 мкг/кг, или от примерно 175 мкг/кг до примерно 400 мкг/кг, или даже от примерно 175 мкг/кг до примерно 350 мкг/кг. Предпочтительные дозы и режимы дозирования описаны в приведенных в данном документе примерах. Подходящие дозы эффективны для достижения максимальной амплификации Treg-клеток с минимальной стимуляцией Teff-клеток и ЕК-клеток; это можно контролировать путем сбора периферической крови для анализа методом проточной цитометрии для определения распространенности Treg-клеток, эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и ЕК-клеток. На основании этих цифр можно соответствующим образом скорректировать дозировки.

Схемы введения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического эффекта). Схемы дозирования для внутривенного (в/в) или не-внутривенного введения, местного или системного, или их комбинаций, обычно будут варьироваться от однократной болюсной дозы или непрерывной инфузии до многократных введений за день (например, каждые 4-6 часов), или по указанию лечащего врача и по состоянию пациента. Что касается частоты и графика введения композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, рядовой специалист в данной области техники может определить подходящую схему введения доз. Например, в цикле лечения клиницист может принять решение о введении композиции либо в виде разовой дозы, либо в виде серии доз, например, в течение нескольких дней или недель). В зависимости от природы длительного действия композиции, предпочтительным является ее относительно нечастое введение (например, один раз в три недели, один раз в две недели, один раз каждые 8-10 дней, один раз в неделю и т.д.). Примерная продолжительность периода времени, связанного с курсом лечения, составляет около одной недели; около двух недель; около трех недель; около четырех недель; около пяти недель; около шести недель; около семи недель; около восьми недель; около девяти недель; около десяти недель; около одиннадцати недель; около двенадцати недель; около тринадцати недель; около

четырнадцать недель; около пятнадцати недель; около шестнадцати недель; около семнадцати недель; около восемнадцати недель; около девятнадцати недель; около двадцати недель; около двадцати одной недели; около двадцати двух недель; около двадцати трех недель; около двадцати четырех недель; около семи месяцев; около восьми месяцев; около девяти месяцев; около десяти месяцев; около одиннадцати месяцев; около двенадцати месяцев; около тринадцати месяцев; около четырнадцати месяцев; около пятнадцати месяцев; около шестнадцати месяцев; около семнадцати месяцев; около восемнадцати месяцев; около девятнадцати месяцев; около двадцати месяцев; около двадцати одного месяца; около двадцати двух месяцев; около двадцати трех месяцев; около двадцати четырех месяцев; около тридцати месяцев; около трех лет; около четырех лет и около пяти лет. Описанные в данном документе способы лечения обычно продолжаются до тех пор, пока клиницист, наблюдающий за уходом за пациентом, будет считать способ лечения эффективным, т.е. пока пациент реагирует на лечение, или пока не исчезнут симптомы, связанные с состоянием. Неограничивающие параметры, указывающие на эффективность метода лечения, могут включать в себя что-то одно или несколько из следующего: увеличение количества регуляторных Т-клеток, таких как CD25⁺ Treg и FoxP3⁺ Treg, и/или уменьшение количества ЕК-клеток и эффекторных клеток CD4⁺ и CD8⁺.

Композиции, представленные в данном документе, полезны для увеличения соотношения регуляторных Т-клеток, таких как клетки Foxp3⁺ и CD25⁺, к эффекторным Т-клеткам, таким как клетки CD4⁺ и CD8⁺, при введении субъекту в терапевтически эффективной дозе. Например, введение композиций селективных стимуляторов Treg, включая RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, может быть эффективным, приводя к по меньшей мере двукратному увеличению количества регуляторных Т-клеток по сравнению с исходным уровнем при оценке в мышинной модели *in vivo*, например, такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации способ также может быть эффективным, приводя к по меньшей мере четырехкратному увеличению количества регуляторных Т-клеток по сравнению с исходным уровнем при оценке в мышинной модели *in vivo*, например, такой, как описано в данном документе. В некоторых случаях увеличение количества регуляторных Т-клеток сохраняется выше базового уровня в течение по меньшей мере 3 суток после введения, или даже по меньшей мере 5 суток после введения.

Как показано в сопроводительных примерах, композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, при введении в подходящем диапазоне доз эффективно обеспечивают предпочтительное увеличение клеточной популяции и иммуносупрессивной функции регуляторных Т-клеток при минимальном стимулирующем воздействии на эффекторные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации композиции селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, способны обеспечить устойчивое воздействие для обеспечения величины, продолжительности и специфичности ответов Treg по сравнению с Teff, которые не могут быть достигнуты с помощью эквивалентных дозы нативного IL-2.

ПРИМЕРЫ

Следует понимать, что предшествующее описание, а также следующие далее примеры предназначены для иллюстрации, и не ограничивают объем раскрытия, представленного в данном документе. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема раскрытия будут очевидны специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение.

Материалы и способы

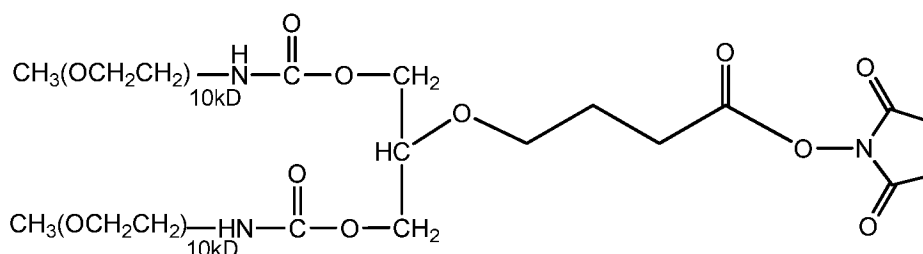
Рекомбинантный человеческий IL-2, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную последовательности алдеслейкина (дез-аланил-1, серин-125, интерлейкин-2 человека, см. Фиг. 2) клонируют, экспрессируют и используют для приготовления типичного примера композиций селективных стимуляторов Treg, обозначаемых в данном документе RUR_{20kD}-IL-2. Последовательность исключает аминокислоту №1 (аланин) из последовательности нативного зрелого IL-2 человека, и имеет аминокислотную мутацию цистеина в серин в положении аминокислоты 125. Первая аминокислота в последовательности представляет собой метионин для прямой бактериальной экспрессии (сигнальный пептид не кодируется). После экспрессии N-концевой метионин удаляется метиониаминопептидазой хозяина. Одиночная дисульфидная связь образуется между цистеинами в положениях аминокислот 58 и 105. Белок не гликозилирован, поскольку он получен из *E.coli*. В некоторых описаниях композиции конъюгированного IL-2 могут быть описаны в некоторых отношениях как (1,3-бис(метоксиполи(этиленгликоль)карбамоил)-2-

пропанокси)-4-бутанамид)интерлейкин-2), с указанием, что эта номенклатура не описывает в полной мере характер пегилирования или смесь.

Реагент полиэтиленгликоля, мПЭГ2(20кДа)-бутановая кислота, сложный эфир N-гидроксисукцинимид (1,3-бис(метоксиполи(этиленгликоль)_{10кДа}-карбамоил)-2-пропанокси)-4-сукцинимидилбутаноат (также называемый в данном документе мПЭГ2-gu-20K NHS), получают, как описано в Примере 2 патента США № 7887789. Внешний вид:

гранулированный порошок от белого до не вполне белого цвета; молекулярная масса (Mn) 18-22 кДа (за счет полидисперсности полимера). Структура 1,3-

бис(метоксиполи(этиленгликоль)_{10кДа}-карбамоил)-2-пропанокси)-4-сукцинимидилбутаноата приведена ниже.



Если не указано иное, концентрация, количество и уровни дозировки композиций селективных стимуляторов Treg, включая варианты реализации RUR_{20кД}-IL-2 и родственные композиции, представленные в данном документе, приводятся в пересчете на белок, с учетом только массы белкового компонента, без массы, приходящейся на фрагменты ПЭГ. При использовании расчетов по белку, эффективная молекулярная масса композиции RUR_{20кД}-IL-2, используемая в расчетах, составляет 15,3 кДа, даже для смеси конъюгированных молекул rhIL-2, имеющих различные степени пегилирования, так как учитывается только белок rhIL-2.

Композиция, родственная RUR_{20кД}-IL-2, представляет собой композицию смеси пегилированных конъюгатов, состоящей из rhIL-2 (последовательность алдеслейкина), конъюгированного с множеством фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ), ковалентно связанных с группами лизина. Количество фрагментов ПЭГ на молекулу rhIL-2 (степень пегилирования) представляет собой распределение преимущественно 2 и 3 фрагментов ПЭГ на молекулу (ди- или трипегилированных) с незначительным содержанием конъюгатов с 1 ПЭГ (монопегилированных) и 4 ПЭГ (тетрапегилированных) и/или молекул с более высокой степенью пегилирования, что соответствует в среднем примерно 2,5 фрагментам ПЭГ на rhIL-2. Каждый фрагмент ПЭГ имеет номинальную молекулярную массу 20 кДа, и rhIL-2

имеет молекулярную массу 15,3 кДа, с номинальной молекулярной массой RUR_{20kD}-IL-2 65 кДа.

ПРИМЕР 1

Приготовление RUR_{20kD}-IL-2 и родственных композиций

- 5 Готовят маточный раствор (100 мг/мл) мПЭГ2-ru-20K NHS в 2 мМ HCl. Типичную реакцию пегилирования IL-2 проводят следующим образом: 115 мл маточного раствора IL-2 (алдеслейкина) (1,3 мг/мл) переносят в пластиковую бутылку объемом 250 мл и добавляют к раствору IL-2 15 мл 0,5 М бисина (*N,N*-бис(2-гидроксиэтил)глицин), pH 9,2, и 0,5 мл воды. Пегилирование инициируют добавлением по каплям 19,5 мл маточного раствора мПЭГ2-ru-
- 10 20K NHS к раствору, содержащему IL-2. Полученная реакционная смесь содержит 1 мг/мл IL-2, 50 мМ бисина и 10 молярных эквивалентов мПЭГ2-ru-20K NHS (по отношению к белку) и имеет pH 8,7. Реакции дают возможность протекать при температуре окружающей среды в течение 40 мин при осторожном перемешивании. Реакцию останавливают добавлением 2,2 мл уксусной кислоты для снижения pH реакции до 4,1.
- 15 Полученный продукт конъюгата IL-2 очищают катионообменной хроматографией с использованием SP FF Sepharose. По завершении реакции конъюгации реакционную смесь диализуют против 20 объемов 10 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 4,0). Диализованный образец разбавляют водой 1:4 и загружают на колонку, набитую смолой SP FF Sepharose. Для катионообменной хроматографии используют следующие буферы: Буфер А: 10 мМ натрия ацетата (pH 4,0), и Буфер В: 10 мМ натрия ацетата, 1,0 М натрия хлорида (pH 4,0). Смолу промывают буфером В и уравнивают буфером А перед загрузкой образца. После загрузки смолу промывают 3 объемами колонки буфера А. Конъюгированный и неконъюгированный IL-2 элюируют с использованием четырехступенчатого градиента, состоящего из 0-50% буфера В в количестве 5 объемов колонки, 25-50% буфера В в
- 20 количестве 1 объема колонки, 50% буфера В в количестве 1 объема колонки, от 50% до 100% буфера В в количестве 1 объема колонки и 100% буфера В в количестве 1 объема колонки при скорости потока 28 см/ч. Фракции, содержащие конъюгаты IL-2, имеющие степень пегилирования (dP) 2 и 3 (т.е. димеры и тримеры), идентифицируют с помощью ДСН-ПААГ и объединяют.
- 25 Объединенные фракции, содержащие димеры и тримеры, концентрируют с использованием ячейки для ультрафильтрации с перемешиванием (Amicon) и газообразного азота. Состав конечного продукта определяют методом ОФ ВЭЖХ с использованием
- 30

подвижных фаз: А, 0,09% трифторуксусной кислоты (TFA) в воде и В, 0,04% TFA в ацетонитриле. Используют колонку Intrada WP-RP C18 (3 x 150 мм) со скоростью потока 0,5 мл/мин и температурой колонки 50 °С. Очищенная смесь конъюгатов, как определено, содержит около 4,6 % (мол.) монопегилированного гIL-2, около 47,7 % (мол.)

- 5 дипегилированного гIL-2, около 42,9 % (мол.) трипегилированного гIL-2 и около 4,8 % (мол.) тетрапегилированного IL-2. См. Фиг. 1, где по оси абсцисс отложено время элюирования. Средняя степень пегилирования смеси конечных продуктов определена равной 2,48 (т.е. примерно 2,5). В смеси конечных продуктов свободный IL-2 не обнаруживается. Этот препарат является примером композиции RUR_{20kD}-IL-2 формулы А.

10

ПРИМЕР 1

Альтернативные препараты RUR_{20kD}-IL-2 и родственные композиции

Приготовление желаемого RUR_{20kD}-IL-2 и родственной композиции состоит из: ферментации и очистки промежуточного продукта процесса белка rhIL-2, конъюгации rhIL-2
15 с исходным материалом реагента ПЭГ мПЭГ2-гу-20K NHS, очистки фракций конъюгата IL-2, имеющих заданные степени пегилирования, и конечное составление композиции пегилированных конъюгатов rhIL-2 для получения композиции RUR_{20kD}-IL-2 с желаемым распределением согласно вариантам реализации, описанным в данном документе.

- Желаемую композицию RUR_{20kD}-IL-2 получают путем проведения реакции 1,3-
20 бис(метоксиполи(этиленгликоль)_{10kDa}-карбамоил)-2-пропанокси)-4-сукцинимидилбутаноата (также называемого в данном документе мПЭГ2-гу-20K NHS) с остатками лизина в белке интерлейкина-2 (IL-2) (последовательность алдеслейкина), что приводит к распределению пегилированных конъюгатов IL-2. Продукт содержит преимущественно дипегилированные и трипегилированные формы с меньшими количествами моно- и/или тетрапегилированных
25 форм.

- Замороженный исходный материал IL-2 (очищенный рекомбинантный IL-2 (последовательность алдеслейкина) в 10 мМ ацетата, 5% трегалозы, буфере pH 4,5, который хранился при -70 °С) оттаивают до комнатной температуры. Реагент ПЭГ, мПЭГ2-гу-20K NHS (порошок), солюбилизируют путем добавления к 2 мМ раствору HCl в концентрации
30 ~90 г/л при комнатной температуре и перемешивают в течение минимум 15 минут. Затем раствор загружают в реакционный сосуд. В реакционный сосуд добавляют размороженный IL-2, соответствующим образом разбавленный водой, с последующим добавлением буфера

0,75 М бигина с pH 9,7. Конечная концентрация IL-2 в реакционной смеси составляет приблизительно 1,0 г/л, а концентрация бигина составляет приблизительно 50 мМ для достижения целевого pH 8,7. Обычно для пегилирования белка массовое соотношение ПЭГ:rhIL-2 составляет примерно от 10:1 до 13:1 в забуференном бигином растворе при pH от 8,5 до 9,5. Реакционную смесь инкубируют при непрерывном перемешивании в течение 40 минут при 22 °С, начиная с момента завершения добавления раствора мПЭГ2-gu-20K NHS. В конце периода инкубации реакцию гасят, добавляя 1 н. уксусную кислоту для быстрого понижения pH, и немедленно проводят дополнительное ступенчатое титрование до pH 4,0 с использованием дополнительного количества 1 н. уксусной кислоты. Погашенную реакцию разбавляют в 10 раз добавлением воды. Разбавленную погашенную реакцию фильтруют через фильтр 0,22 мкм, получая неочищенный продукт.

Затем проводят катионообменную хроматографию SP SEPHAROSE® Fast Flow сырого продукта для частичного разделения пегилированных реакционных фракций. Колонку для катионообменной хроматографии SP SEPHAROSE® Fast Flow уравнивают и загружают исходным сырьем при комнатной температуре со временем пребывания ~5 минут, после чего промывают 5 CV (объем колонки) буфера для загрузки. Пегилированный rhIL-2 связывается со смолой, а свободный ПЭГ вымывается. Затем продукт элюируют с использованием элюирования с линейным градиентом 0-500 мМ хлорида натрия в буфере 10 мМ ацетата натрия, pH 4,0. Собирают фракции по 0,15 CV каждая, начиная с ~1 CV в элюцию. Сбор фракций заканчивают, когда поглощение при 280 нм составляет <5% от пиковых максимальных концентраций пегилированных фракций (т.е. монопегилированного IL-2 (мономера), дипегилированного IL-2 (димера), трипегилированного IL-2 (тримера), тетрапегилированного IL-2 (тетрамера) и т.д., в каждой из фракций, измеряемое по оптической плотности на длине волны 280 нм. Распределение пегилированных фракций измеряют методом ОФ-ВЭЖХ, как описано в данном документе, и фракции, содержащие моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ и более высокие компоненты, идентифицируют и используют для исследований повторного объединения необходимых фракций с целью создания композиций, которые будут иметь целевой профиль распределения пегилированных фракций, как описано в композиции RUR_{20kD}-IL-2, представленной в данном документе, в частности, в формулах А-Е. Аликвоты выбранных фракций идентифицированного состава, например, ди-ПЭГ-IL-2 и три-ПЭГ-IL-2, и/или моно-ПЭГ или с более высокой степенью пегилирования, рассчитываются так, чтобы достичь целевого профиля, как предусмотрено в

данном документе, и затем повторно объединяют таким образом, чтобы получить композицию RUR_{20kD}-IL-2, содержащую продукт с желаемым распределением пегелированных фракций. В качестве альтернативы могут быть разработаны схемы очистки, посредством которых элюирование и сбор могут обеспечивать желаемый профиль в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе, без необходимости повторного объединения фракций. Желаемый (и/или повторно объединенный) хроматографически очищенный препарат затем концентрируют и подвергают диафильтрации в 10 mM ацетата натрия, 150 mM хлорида натрия, 2% мас./об. сахарозы, pH 5,0, используя фильтрацию в тангенциальном потоке (TFF), для достижения конечной целевой концентрации 1 мг/мл (в пересчете на белок) лекарственной субстанции композиции RUR_{20kD}-IL-2.

Повторно объединенные и/или целевые продукты анализируются, и распределение композиции проверяют описанными в данном документе способами, включая ОФ ВЭЖХ, для оценки профиля фракций ПЭГ. Препараты композиций в соответствии с приведенным в данном документе описанием для композиции RUR_{20kD}-IL-2 в соответствии с формулами А-Е проиллюстрированы примерами партий продукта, пронумерованными 1-4, перечисленными в Таблице 1 ниже. Анализы характерных признаков известны квалифицированным специалистам и/или описаны в Примерах от 1-В до 1-І или в другом месте данного документа. Были определены соответствующие композиции исторических контрольных образцов, которые используются для сравнения в последующих синтезах.

Таблица 1. Сводная таблица иллюстративных анализов образцов из различных партий композиции RUR_{20kD}-IL-2 методами ОФ-ВЭЖХ и эксклюзионной ВЭЖХ

Характерный признак	Фракция (где применимо)	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4
Внешний вид образца	-	Прозрачная бесцветная жидкость	Слегка опалесцирующая бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
pH	-	5,1	5,0	5,1	5,1
Идентификация методом	-	Соответствует	Соответствует эталону	Соответствует эталону	Соответствует эталону

ДСН-ПААГ					
Идентификация методом ОФ ВЭЖХ	-	Соответствует	Соответствует эталону	Соответствует эталону	Соответствует эталону
Содержание белка по методу БЦК (бицинхониновая кислота) (по сравнению с rhIL-2)	-	1,58 мг/мл	0,96 мг/мл	1,00 мг/мл	1,12 мг/мл
Чистота ОФ ВЭЖХ	Свободный IL-2	<0,1%	н.о. (не более 0,3%)	н.о. (не более 0,3%)	н.о. (не более 0,3%)
	Моно-ПЭГ	3,0%	3,5%	3,1%	3,1%
	Ди-ПЭГ	42,4%	45,8%	46,8%	44,4%
	Три-ПЭГ	46,6%	42,6%	42,4%	44,8%
	Более высокие степени пегилирования	8,0%	8,1%	7,7%	7,7%
	Прочее	н.о.	н.о. (не более 0,5%)	н.о. (не более 0,5%)	н.о. (не более 0,5%)
	Всего ди-ПЭГ/три-ПЭГ	89,0%	88,4%	89,2%	89,2%
Чистота Эксклюзионная ВЭЖХ	Низкомолекулярные (моно)	3,0%	3,0%	2,4%	1,4%
	Ди-ПЭГ	47,0%	48,6%	50,7%	47,2%
	Три-ПЭГ	45,0%	42,5%	41,2%	45,6%
	Высокомолекулярные	4,9%	5,8%	5,8%	5,8%
	Всего ди-ПЭГ/три-ПЭГ	92,0%	91,1%	91,9%	92,8%

Свободный ПЭГ (ВЭЖХ/ИДС Р (испарительн ый детектор по светорассеян ию))		<0,1%	н.о. (не более 0,1%)	н.о. (не более 0,1%)	н.о. (не более 0,1%)
---	--	-------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

н.о. - не обнаружено

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, на молярной основе, менее 1% свободного неконъюгированного IL-2 (более предпочтительно, не содержит детектируемого свободного IL-2), 5% или менее монопегилированного IL-2, от 28% до примерно 60% дипегилированного IL-2, от примерно 24% до примерно 65% трипегилированного IL-2, 12% или менее форм IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и в общей сложности 80% или более объединенных ди- и трипегилированных форм IL-2.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, менее 0,5 % мол. свободного IL-2, от примерно 2,5 до примерно 4,5 % мол. монопегилированного IL-2, от примерно 35 до примерно 50 % мол. дипегилированного IL-2, от примерно 38 до примерно 46 % мол. трипегилированного IL-2, примерно от 3 до примерно 10 % мол. форм IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и общее количество дипегилированного и трипегилированного IL-2 от примерно 80 до примерно 95% мол.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, на молярной основе, 5% или менее монопегилированного IL-2, и от 28% до примерно 60% дипегилированного IL-2, и от примерно 24% до примерно 65% трипегилированного IL-2, и 12% или менее форм IL-2 с более высокими степенями пегилирования. Предпочтительно, композиция содержит 80% или более объединенных ди- и трипегилированных форм IL-2.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, от примерно 2,5 до примерно 4,5 % мол. монопегилированного IL-2

(will contain, for example, about 2.5 to about 4.5 mol % comprises mono-PEGylated IL-2), и от примерно 35 до примерно 50 % мол. дипегилированного IL-2, и от примерно 38 до примерно 46 % мол. трипегилированного IL-2, и от примерно 3 до примерно 10 % мол. форм IL-2 с более высокими степенями пегилирования. Предпочтительно, композиция содержит

5 дипегилированный и трипегилированный IL-2, в общей сложности, в количестве от примерно 80 до примерно 95 % мол.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированного IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированного IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированного IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. форм IL-2 с более высокими степенями пегилирования. Предпочтительно, композиция содержит дипегилированный и трипегилированный IL-2, в общей сложности, в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированного IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированного IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированного IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. форм IL-2 с более высокими степенями пегилирования, и при этом указанная композиция содержит смесь монопегилированных конъюгатов IL-2, которые имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к одному из лизинов K7, K8, K31 или K75. Предпочтительно, композиция содержит дипегилированный и трипегилированный IL-2, в общей сложности, в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.

В некоторых вариантах реализации продукт композиции RUR_{20kD}-IL-2 будет содержать, например, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированного IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированного IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированного IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. форм IL-2 с более высокими степенями пегилирования, и при этом указанная композиция содержит конъюгаты монопегилированного IL-2, которые имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к лизину K7. Предпочтительно, композиция содержит дипегилированный и трипегилированный IL-2, в общей сложности, в количестве от примерно 87 до примерно 90 % мол.

ПРИМЕР 1-В

Чистота и характеристика композиции RUR_{20kD}-IL-2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой

Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ)

5 используется для оценки хроматографической чистоты и идентичности образцов композиции RUR_{20kD}-IL-2 с использованием прибора серии Agilent 1200, оснащенного детектором с диодной матрицей (УФ при 215 нм). Может использоваться колонка ACE 3 Phenyl-300 (Mac-Mod Analytical Inc.) (или другая подходящая колонка) со скоростью потока элюента 0,6 мл/мин. ОФ-ВЭЖХ проводят с использованием градиента, содержащего смеси двух
10 подвижных фаз: (1) подвижной фазы А - раствора 0,1% муравьиной кислоты в воде, и (2) подвижной фазы В - раствора 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Линейный градиент изменялся от 60% подвижной фазы А/40% подвижной фазы В до 40% подвижной фазы А/60% подвижной фазы В, (затем) до 20% подвижной фазы А/80% подвижной фазы В, и до 60% подвижной фазы А/40% подвижной фазы В. Компонентами разбавителя/буфера для
15 составления композиции являются 10 мМ ацетат натрия, 200 мМ хлорид натрия, 2% сахара при pH 5,0.

Замороженный эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2 и образцы оттаивают и разбавляют до 1,0 мг/мл буфером для составления композиции. Сначала впрыскивают по крайней мере один холостой контроль буфера для составления композиции для проведения
20 ОФ-ВЭЖХ, чтобы гарантировать отсутствие помех для анализа пиков, связанных с композицией RUR_{20kD}-IL-2. Затем пять раз впрыскивают эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2 или контроль. Затем впрыскивают образцы композиции RUR_{20kD}-IL-2. Эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2/контроль впрыскивают после каждого шести вводов пробы и в конце последовательности введения.

25 Относительное стандартное отклонение (ОСО), в %, времени удерживания для первых пяти впрыскиваний эталонного материала, содержащего дипегилированные (ди-ПЭГ) и трипегилированные (три-ПЭГ) композиции RUR_{20kD}-IL-2, составляет не более 2,0%. % ОСО для процента площади компонентов ди-ПЭГ и три-ПЭГ для всех впрыскиваний композиции эталонного материала RUR_{20kD}-IL-2 составляет не более 5,0%. Все пики композиции RUR_{20kD}-
30 IL-2, полученные при вводе эталонного материала и образца, объединяют. В частности, для концентрации композиции RUR_{20kD}-IL-2, равной 1,0 мг/мл, объединяют, соответственно, формы ди-ПЭГ и три-ПЭГ композиции RUR_{20kD}-IL-2 выше предела обнаружения (LOD)

0,5%, и пик rhIL-2 выше предела обнаружения 0,3%. Для концентрации RUR_{20kD}-IL-2, равной 1,0 мг/мл, предел количественного определения (ПКО) составляет 1,0% для дипегилированных и трипегилированных форм RUR_{20kD}-IL-2, и 0,5% для rhIL-2. Результаты анализов приведены ниже в Таблице 2 (6 образцов) и Таблице 3 (12 образцов).

5

Таблица 2: Процент площади фракций моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ из шести повторных образцов композиции RUR_{20kD}-IL-2, проанализированных методом ОФ ВЭЖХ

Образец	Код результата	Моно-ПЭГ (% площади)	Ди-ПЭГ (% площади)	Три-ПЭГ (% площади)	Тетра-ПЭГ (% площади)	Пента-ПЭГ (% площади)
Образец 1	1084	2,93	42,54	46,69	7,10	0,75
Образец 2	1085	2,98	42,48	46,67	7,17	0,70
Образец 3	1086	2,98	42,60	46,65	7,21	0,56
Образец 4	1087	3,04	42,58	46,50	7,18	0,71
Образец 5	1088	2,97	42,52	46,62	7,33	0,56
Образец 6	1089	2,88	42,51	46,69	7,34	0,58
Среднее		2,96	42,54	46,64	7,22	0,64
% ОСО (не более 2,0% для ди-ПЭГ и три-ПЭГ)		1,8	0,1	0,2	1,3	13,3

10 **Таблица 3: Процент площади для фракций моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ из двенадцати повторных образцов композиции RUR_{20kD}-IL-2, проанализированных методом ОФ ВЭЖХ**

Образец	Код результата	Моно-ПЭГ (% площади)	Ди-ПЭГ (% площади)	Три-ПЭГ (% площади)	Тетра-ПЭГ (% площади)	Пента-ПЭГ (% площади)
Образец 7	2323	3,30	42,37	46,20	7,84	0,29
Образец 8	2324	3,07	42,36	46,55	7,76	0,26
Образец 9	2325	3,10	42,30	46,59	7,69	0,30
Образец 10	2326	3,02	42,37	46,59	7,75	0,26

Образец 11	2327	3,10	42,29	46,59	7,75	0,26
Образец 12	2328	3,05	42,33	46,58	7,78	0,26
Образец 13	1084	2,93	42,54	46,69	7,10	0,75
Образец 14	1085	2,98	42,48	46,67	7,17	0,70
Образец 15	1086	2,98	42,60	46,65	7,21	0,56
Образец 16	1087	3,04	42,58	46,50	7,18	0,71
Образец 17	1088	2,97	42,52	46,62	7,33	0,56
Образец 18	1089	2,88	42,51	46,69	7,34	0,58
Среднее		3,04	42,44	46,58	7,49	0,46
% ОСО (не более 2,0% для ди-ПЭГ и три-ПЭГ)		3,5	0,3	0,3	3,9	44,4

ПРИМЕР 1-С

Чистота и характеристика композиции RUR_{20kD}-IL-2 методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии

- 5 Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (эксклюзионная ВЭЖХ) также может использоваться для определения чистоты и характеристики композиции RUR_{20kD}-IL-2 с использованием прибора Agilent серии 1200, оснащенного диодно-матричным детектором (УФ при 280 нм) и колонкой Yarra SEC-2000 (Phenomenex), и скорости потока элюента 0,225 мл/мин. Подвижная фаза представляет собой 0,2 М ацетат аммония (pH 5,5)
- 10 при объемном соотношении 80:20 с ацетонитрилом. Разбавитель/буфер для составления композиции содержал 10 мМ ацетата натрия, 200 мМ хлорида натрия, 2% сахарозы при pH 5,0.
- Замороженный эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2 и аналитические пробы оттаивают и разбавляют до 1,0 мг/мл буфером для составления коомпозиции. Образцы
- 15 стабильны до 5 дней при 5 °С в растворе.
- Процедурно, сначала впрыскивают по меньшей мере один холостой контроль буфера для составления композиции для проведения ОФ-ВЭЖХ, чтобы гарантировать отсутствие помех при анализе пиков, связанных с RUR_{20kD}-IL-2. Затем вводят композицию RUR_{20kD}-IL-2, раствор для проверки пригодности системы, чтобы гарантировать, что агрегаты или формы с
- 20 более высокой молекулярной массой отделяются от тетрапегилированных фракций RUR_{20kD}-IL-2. Затем вводят пять раз эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2 или контроль.

Затем впрыскивают образцы композиции RUR_{20kD}-IL-2. Эталонный материал композиции RUR_{20kD}-IL-2/контроль впрыскивают после каждых шести вводов пробы и в конце последовательности введения.

5 % ОСО для времени удерживания фракций ди-ПЭГ и три-ПЭГ RUR_{20kD}-IL-2 для первых пяти впрыскиваний эталонных материалов не превышает 2,0%. % ОСО для процента площади ди-ПЭГ и три-ПЭГ RUR_{20kD}-IL-2 для всех впрыскиваний эталонных материалов не превышает 5,0%. Все пики фракций RUR_{20kD}-IL-2, полученные при вводе эталонного материала и образца, объединяют. В частности, для концентрации 1,0 мг/мл композиции 10 RUR_{20kD}-IL-2 объединяют фракции ди-ПЭГ и три-ПЭГ RUR_{20kD}-IL-2, превышающие предел обнаружения (LOD), равный 1,0%. Для концентрации 1,0 мг/мл RUR_{20kD}-IL-2 приведены данные только для ди-ПЭГ и три-ПЭГ RUR_{20kD}-IL-2, превышающих ПКО 3,0%.

Анализы повторных образцов композиций RUR_{20kD}-IL-2 представлены ниже в Таблицах 4 и 5, где приведены площади пиков для фракций моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ композиции RUR_{20kD}-IL-2.

15

Таблица 4: Площади пиков, в %, для компонентов моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ RUR_{20kD}-IL-2 по данным эксклюзионной ВЭЖХ

Образец	Код результата	RT (время удерживания) тетра- ПЭГ (мин)	Площадь тетра- ПЭГ (%)	RT (мин) три- ПЭГ	Площадь три-ПЭГ (%)	RT ди-ПЭГ (мин)	Площадь ди-ПЭГ (%)	RT моно- ПЭГ (мин)	Площадь моно- ПЭГ (%)
Образец 1	1119	21,62	4,59	22,40	46,73	23,91	46,99	28,65	1,70
Образец 2	1120	21,62	4,53	22,41	46,67	23,91	47,11	28,66	1,69
Образец 3	1121	21,62	4,45	22,41	46,75	23,92	47,04	28,75	1,76
Образец 4	1122	21,63	4,66	22,42	46,68	23,92	46,91	28,76	1,75
Образец 5	1123	21,64	4,63	22,44	46,81	23,94	46,80	28,76	1,77
Образец 6	1124	21,64	4,54	22,43	46,79	23,94	46,87	28,86	1,80
Среднее	-	21,63	4,57	22,42	46,74	23,92	46,95	28,74	1,74
% ОСО (критерии приемлемости)	-	0,0 (неприменимо)	1,6 (неприменимо)	0,0 (неприменимо)	0,1 (не более 10,0%)	0,1 (неприменимо)	0,2 (не более 10,0%)	0,3 (неприменимо)	2,4 (неприменимо)

Таблица 5: Площади пиков (%) для фракций моно-ПЭГ, ди-ПЭГ, три-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ образцов композиции RUR_{20kD}-IL-2 по данным эксклюзионной ВЭЖХ

Образец	Код результата	RT тетра- ПЭГ (мин)	Площадь тетра- ПЭГ (%)	RT три- ПЭГ (мин)	Площадь три-ПЭГ (%)	RT ди-ПЭГ (мин)	Площадь ди-ПЭГ (%)	RT моно- ПЭГ (мин)	Площадь моно- ПЭГ (%)
Образец 7	2021	23,32	4,93	24,12	45,21	25,58	46,82	29,39	3,04
Образец 8	2022	23,32	4,83	24,10	45,67	25,58	46,97	29,42	2,52
Образец 9	2023	23,32	4,74	24,11	45,08	25,59	46,66	29,44	3,52
Образец 10	2024	23,32	4,90	24,11	45,05	25,59	46,74	29,41	3,31
Образец 11	2025	23,31	4,89	24,11	45,00	25,58	46,72	29,41	3,39
Образец 12	2026	23,32	4,86	24,11	45,12	25,59	46,90	29,48	3,12
Образец 13	1119	21,62	4,59	22,40	46,73	23,91	46,99	28,65	1,70
Образец 14	1120	21,62	4,53	22,41	46,67	23,91	47,11	28,66	1,69
Образец 15	1121	21,62	4,45	22,41	46,75	23,92	47,04	28,75	1,76
Образец 16	1122	21,63	4,66	22,42	46,68	23,92	46,91	28,76	1,75
Образец 17	1123	21,64	4,63	22,44	46,81	23,94	46,80	28,76	1,77
Образец 18	1124	21,64	4,54	22,43	46,79	23,94	46,87	28,86	1,80
Среднее	-	22,47	4,71	23,26	45,96	24,75	46,88	29,08	2,45
% ОСО (критерии приемлемости)	-	3,9 (неприменимо)	3,5 (неприменимо)	3,8 (неприменимо)	1,8 (не более 10,0%)	3,5 (неприменимо)	0,3 (не более 10,0%)	1,2 (неприменимо)	31,6 (неприменимо)

5 Сводные данные репрезентативных анализов различных образцов композиции RUR_{20kD}-IL-2 методами как ОФ-ВЭЖХ, так и эксклюзионной ВЭЖХ, приведены в Таблице 1. Как видно, препараты композиции RUR_{20kD}-IL-2 демонстрируют хорошую однородность показателей качества от партии к партии по отношению к смесям пегилированных фракций (т.е. монопегилированных, дипегилированных, трипегилированных, тетрапегилированных, 10 пентапегилированных и т.д.).

ПРИМЕР 1-D

ДСН-ПААГ

ДСН-ПААГ используется для подтверждения идентичности композиции RUR_{20kD}-IL-

2. Образцы композиции RUR_{20kD}-IL-2, маркера молекулярной массы и соответствующего

эталонного материала композиции RUR_{20kD}-IL-2 загружают на гель NuPAGE Bis-Tris и

пропускают через гель. После электрофореза гели окрашивают с помощью красителя

GelCode™ Blue Safe Protein Stain. Сравнение картины полос миграции геля с эталонным

материалом и подтверждение отсутствия новых полос в образце служит подтверждением

идентичности образцов. Две наиболее интенсивные полосы будут соответствовать

трипегилированной и дипегилированной фракциям. Самая верхняя полоса на дорожках

соответствует вариантам с более высокими степенями пегилирования, а самая нижняя полоса

соответствует монопегилированным вариантам.

Пример 1-E

Определение сродства к IL-2R $\alpha\beta$ с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и эффективность в клетках U-2 OS, экспрессирующих комплекс IL-2R $\alpha\beta$ человека.

Аффинность связывания композиции RUR_{20kD}-IL-2 определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса Biacore X-100 с детектированием поляризованного света. Методика включает активацию поверхности сенсорного чипа Biacore CM5 комплексом

1:1 N-гидроксисукцинимид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (NHS EDC) для

образования активного эфира NHS. Козьи антитела против Fc человека в буфере ацетата

натрия, pH 4,0, ковалентно присоединяют к поверхности чипа. Остаток эфира NHS гасят 1 М

этаноломином. Смесь 1:1 IL-2-R α -Fc (химера IL-2R α -Fc человека; Symansis) и IL-2R β -Fc

(химера IL-2R β -Fc человека; Symansis) улавливается на чипе с использованием буфера HBS-

EP (1 mM HEPES, pH 7,4, 15 mM NaCl, 0,3 mM ЭДТА, 0,0005% об./об. поверхностно-

активного вещества P20) с 0,1% БСА. Композицию RUR_{20kD}-IL-2 последовательно разводят в

буфере HBS-EP с 0,1% БСА и пропускают над сенсорным чипом. Кинетические аффинности

связывания измеряют путем нанесения растворов в течение 3 минут (kon) с последующей 3-

минутной промывкой (koff). Отношение koff и kon используется для расчета кинетической

аффинности связывания KD. Результаты анализа с тремя параллельными определениями

двух партий композиции RUR_{20kD}-IL-2 приведены в Таблице 6. Аффинности связывания и

скорости имеют близкие значения для двух партий лекарственной субстанции.

Таблица 6: Аффинность связывания композиции RUR_{20kD}-IL-2 с IL-2Rαβ с использованием метода ППР

Партия композиции RUR _{20kD} -IL-2	k _{on} (x 10 ⁻⁴ M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{off} (c ⁻¹)	K _D (мкМ)
A.	6,23, 6,11, 6,11	0,06689, 0,07009, 0,05573	1,07, 1,15, 0,912
B.	5,89, 5,51, 6,77	0,06893, 0,06674, 0,07156	1,17, 1,21, 1,06

В качестве альтернативы, платформа PathHunter[®], представляющая собой готовый к использованию криоконсервированный формат анализа клеток, обеспечивает более надежную и последовательную реакцию клеток по сравнению с культивируемыми клетками. Анализ комплементации фрагментов фермента (β-галактозидазы) (платформа PathHunter[®] фирмы DiscoverX Corporation, Калифорния) используется для измерения взаимодействий лекарственное средство/лиганд-рецептор. Эффективность композиции RUR_{20kD}-IL-2 измеряют в клетках U-2 OS, экспрессирующих комплекс IL-2Rαβ человека. В основе анализа лежит использование фрагментов расщепленного фермента, которые по отдельности неактивны. Два фрагмента фермента сливаются с внутриклеточными доменами субъединиц IL-2Rβ или IL-2Rγ, и при взаимодействии лиганда с рецептором субъединицы рецептора сближаются с восстановлением активности фермента. При добавлении субстрата фермент начинает действовать и продуцирует люминесцентный сигнал. Активация рецептора посредством комплементации фрагментов фермента измеряют после инкубации образца и сравнения с клетками на протяжении ок. 6 часов. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 в низких дозах обеспечивают передачу сигналов через высокоаффинный гетеротримерный рецептор αβγ IL-2 (IL-2R).

ПРИМЕР 1-F

Занятость сайта пегилирования композиции RUR_{20kD}-IL-2

Занятость сайта пегилирования композиций RUR_{20kD}-IL-2 из двух партий характеризуют путем прямого сравнения композиции RUR_{20kD}-IL-2 с rhIL-2 с помощью пептидного картирования. В гидролизате RUR_{20kD}-IL-2 лизинсодержащий пептид может быть пегилирован, что отражается в том, что его соответствующий нативный лизинсодержащий пептид имеет более низкое относительное содержание по сравнению с тем же пептидом в гидролизате эталонного rhIL-2. Таким образом, занятость сайта пегилирования может быть рассчитана на основании снижения относительного содержания нативного пептида в анализируемом гидролизате RUR_{20kD}-IL-2. Кроме того, пептидное картирование суррогатного материала можно использовать для дополнительного подтверждения занятости сайта.

В общем, такой анализ можно провести следующим образом. В сравнительных исследованиях прямого пептидного картирования композицию RUR_{20kD}-IL-2 и контрольный образец эталонного rhIL-2 гидролизуют одновременно с помощью GluC и GluC/трипсина с последующим анализом ЖХ-УФ/МС/МС для идентификации пептидов и определения их относительного содержания. Сравнение пептидного картирования композиции RUR_{20kD}-IL-2 и rhIL-2 используют для определения занятости сайта пегилирования.

Вкратце, обычный пептид или пептиды, не содержащие лизина, выбирают в качестве эталона или эталонов для анализа как композиции RUR_{20kD}-IL-2, так и rhIL-2. Относительная интенсивность пептида - это нормирование по их эталону (эталонам). Снижение относительного содержания нативного пептида (RR) с лизином рассчитывают по относительной интенсивности пептидов (уравнение 1). Занятость сайта пегилирования у лизина представляет собой усредненное значение RR пептидов, содержащих лизин.

Уравнение 1:

$$RR(\% \text{ Отн. снижение нативного пептида}) = \frac{[(\text{Отн. интенсивность пептидов в rhIL2}) - (\text{Отн. интенсивность пептидов в RUR20KD - IL2})]}{\text{Отн. интенсивность пептидов в rhIL2}}$$

Относительная интенсивность пептидов (Пеп/Реф) = Площадь пика УФ (пептид) / Площадь пика УФ (референсный пептид)

Материал, используемый в качестве суррогата композиции RUR_{20kD}-IL-2, представляет собой продукт, полученный в результате конъюгации монодисперсного 4 кДа

ПЭГ с лизинами rhIL-2. Для имитации профиля пегилирования композиции RUR_{20kD}-IL-2 суррогат готовят с использованием того же линкера конъюгации, и реакцию конъюгации проводят в таких же реакционных условиях, которые использовались для получения композиции RUR_{20kD}-IL-2. Картирование суррогата, гидролизованного GluC и гидролизованного трипсином, на основе ЖХ-МС/МС, идентифицирует пегилированные лизины и обеспечивает дополнительную информацию о RUR_{20kD}-IL-2.

Карта GluC для RUR_{20kD}-IL-2 (партия GMP) имеет 95% покрытие последовательностей rhIL-2. Прямое сравнение GluC-карты RUR_{20kD}-IL-2 с rhIL-2 обеспечивает относительное количественное определение четырех из 11 лизинов в RUR_{20kD}-IL-2 (см. Таблицу 7), причем лизины 7 и 8 учитываются как один сайт в пептидной карте. Пептиды, содержащие остальные лизины на карте GluC, демонстрируют свидетельства пегилирования без дифференциации сайтов. Дополнительное расщепление трипсином пептидов, содержащих лизины, на карте GluC/трипсин демонстрирует связывание ПЭГ в позициях K31, K34, K42 и K47. Сравнение хроматограмм картирования GluC/трипсин для RUR_{20kD}-IL-2 и rhIL-2 показывает значительное снижение указанных пептидов (см. Таблицу 7). Занятость сайта пегилирования K48 не определяется (N/A) на карте трипсин/GluC из-за неправильного ферментативного расщепления.

Пептидное картирование суррогата 4к-пегилированного rhIL-2 позволяет идентифицировать пептиды с мечеными 4к ПЭГ лизинами с высокой точностью определения массы (<5 млн⁻¹). Объединение результатов прямого пептидного картирования RUR_{20kD}-IL-2 и суррогата 4к-пегилированного rhIL-2 показывает, что преобладающими сайтами пегилирования являются K7, K31 и K75 (см. Таблицу 8). Менее преобладающими сайтами пегилирования композиции RUR_{20kD}-IL-2 могут быть K8, K34, K42, K47, K53 и K63. K48 может быть пегилирован, а состояние K96 не определено.

Занятость сайта пегилирования сопоставима в GMP-препарате второй композиции RUR_{20kD}-IL-2 и в разрабатываемой партии (см. Таблицу 7). Комбинированный подход с использованием картирования GluC и картирования трипсин/GluC обеспечивает сравнительную информацию для разных партий, касающуюся некоторых преобладающих сайтов пегилирования конъюгатов в композициях RUR_{20kD}-IL-2.

Таблица 7.

Занятость сайта пегилирования в композициях RUR_{20kD}-IL-2: партия GMP и партия DEMO

Положение лизина	Карта GluC (% RR)		Карта трипсин/GluC (% RR)		% пегилирования Занятость сайта	
	Партия GMP	Партия DEMO	Партия GMP	Партия DEMO	Партия GMP	Партия DEMO
K7/K8	56	53	нет данных		56	53
K31	нет данных		53	56	53	56
K31/34			85	77	83	77
K42			14	<10	14	<10
K47			<10	<10	<10	<10
K48			Неизвестно		Неизвестно	
K53	24	16	<10	10	<10	13
K63	11	36	<10	21	<10	29
K75	53	65	45	47	49	56
K96	Неизвестно		Неизвестно		Неизвестно	

- 5 Партия DEMO относится к препарату, приготовленному для демонстрации работоспособности производственного процесса.

Таблица 8. Сводные данные о занятости сайтов пегилирования в композиции RUR_{20kD}-IL-2 и суррогате 4k-пегилированном rhIL-2

Преобладающие сайты ПЭГ при прямом гидролизе (карта GluC и GluC/трипсин)	Преобладающий сайт ПЭГ суррогата пегилированного rhIL-2 (карта GluC и трипсина)	Преобладающие сайты ПЭГ по комбинированным результатам
K7/K8	K7	K7
K31	K31	K31
K34 (возможно)	K34 (не предпочтительный)	-
K48 (неизвестно)	K48	K48 (возможно)
K75	K75	K75

10

ПРИМЕР 1-G

Стабильность композиции RUR_{20kD}-IL-2 в фазе раствора

- 15 Стабильность растворов 1,0 мг/мл композиции RUR_{20kD}-IL-2 (~1 мг/мл эквивалента rhIL-2 в 10 mM ацетате натрия, 200 mM хлориде натрия, pH 5, содержащем 2% (мас./об.) сахарозы) оценивают в трех различных условиях хранения - при комнатной температуре

(условия окружающей среды лаборатории), 5 °С (в холодильнике) и -20 °С - в моменты времени 1, 3, 5 и 7 дней методом ОФ ВЭЖХ, как описано выше.

- Различия между растворами композиции RUR_{20kD}-IL-2 оценивают по сравнению с
- 5 контрольным свежеприготовленным раствором образца композиции RUR_{20kD}-IL-2. Формы ди-ПЭГ и три-ПЭГ в образцах композиций RUR_{20kD}-IL-2, хранящихся при комнатной температуре, 5 °С и -20 °С до 7 дней, демонстрируют относительные различия до 1% по сравнению с номинальным режимом хранения образца при -70 °С. Относительная разница (отн. разн.) для компонентов с меньшим процентным содержанием пегилированных RUR_{20kD}-
- 10 IL-2 (моно-ПЭГ, тетра-ПЭГ и пента-ПЭГ) составляет до 8%. Это указывает на стабильность образцов раствора, хранящихся при таких репрезентативных условиях хранения.

Биологические анализы *in vitro*:

- Методы *in vitro* могут использоваться для дополнительных измерений биологической
- 15 активности и биологических характеристик композиций RUR_{20kD}-IL-2, включая клеточные анализы для характеристики биоактивности после активации рецептора, который является типичным представителем рецепторного комплекса IL-2:

Методики биотестирования

Биологический анализ	Тип клеток	Форма рецептора IL-2	Платформа для анализа	Отклик
Клеточная пролиферация	CTLL-2 (непрерывная культура)	IL-2R $\alpha\beta\gamma$ мыши	Анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® Cell Viability, Promega	Димеризация рецепторов и клеточная пролиферация
Взаимодействие рецептора с лигандом/лекарственным средством	U-2 OS (замороженные клетки, готовые к использованию)	IL-2R $\alpha\beta\gamma$ человека	PathHunter®, DiscoverX	Димеризация рецептора и комплементация с ферментом

Активация фосфо-STAT5	CTLL-2 (непрерывная культура)	IL-2R $\alpha\beta\gamma$ мышь	Multiplex, Meso Scale Discovery	Димеризация и фосфорилирование рецепторов
--------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	---

Во всех трех анализах данные кривой доза-ответ (ответ в зависимости от концентрации) оценивают с использованием модели нелинейной регрессии. Эффективность образца композиции RUR_{20kD}-IL-2 измеряют относительно эталонного материала посредством отношения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀).

ПРИМЕР 1-Н

Анализ клеточной пролиферации CTLL-2

В анализе пролиферации клеток, клеточный рост измеряют *in vitro* с использованием клеток CTLL-2 после инкубации образца и эталона в течение ~26 часов, причем пролиферацию клеток измеряют с помощью анализа люминесценции на основе аденозинтрифосфата (CellTiter-Glo®, Promega, Висконсин, США). Например, в этом анализе клеточной пролиферации используют линию клеток CTLL-2, которая демонстрирует дозозависимый ответ пролиферации на белок rhIL-2. rhIL-2 используют в качестве контроля анализа и в этом методе готовят в диапазоне концентраций, отличном от концентрации RUR_{20kD}-IL-2. Этот анализ проводят в формате 96-луночного планшета. Клетки CTLL-2 культивируют в среде голодания без rhIL-2 и инкубируют в течение ночи на протяжении 20±3 часов в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Голодающие клетки высевают в 96-луночные планшеты и добавляют к клеткам серию разведений композиции RUR_{20kD}-IL-2 и инкубируют еще 25±3 часов в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Измеряют вызванный композицией RUR_{20kD}-IL-2 рост клеток в каждой лунке с использованием набора для обнаружения CellTiter Glo® фирмы Promega. CellTiter Glo® генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству АТФ, присутствующему в каждой лунке, которое прямо пропорционально числу присутствующих жизнеспособных клеток. Люминесцентный сигнал считывают на планшет-ридере SpectraMax M5. Кривую доза-ответ для эталонного материала композиции RUR_{20kD}-IL-2 и каждого образца получают путем построения графика зависимости люминесцентного сигнала (ось y) от концентрации (ось x). График аппроксимируют 4-параметрической моделью логистической нелинейной регрессии. Программное обеспечение для анализа параллельных линий (PLA) используется для оценки теста на эквивалентность разницы наклонов (параллелизм), значимости регрессии, и для

расчета отношения эффективности образца по сравнению с эталонным материалом в том же планшете.

ПРИМЕР 1-1

Активация фосфо-STAT5

5 В анализе фосфо-STAT5 после связывания рецептора нижестоящая клеточная передача сигналов может затем активировать сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 5 (STAT5) посредством фосфорилирования, способствуя экспрессии генов и индуцируя пролиферацию клеток. Активация фосфо-STAT5 измеряют в клетках CTLL-2, представляющих собой IL-2-зависимую линию Т-лимфоцитов мыши, с использованием
10 мультиплексного анализа фосфо-STAT5/общего STAT5 (Meso Scale Discovery, Мэриленд, США) в ответ на обработку образца и эталона в течение ~10 минут.

ПРИМЕР 2

Исследования *in vivo*: Исследование фармакокинетики/фармакодинамики однократной 15 дозы на мышах

Селективная стимуляция Treg композицией RUR_{20kD}-IL-2 может быть продемонстрирована на мышах. Мышам C57BL/6 (n = 4/группу) вводят однократную подкожную дозу композиции RUR_{20kD}-IL-2 в дозах 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг. После введения, образцы крови и селезенки собирают в дни 1-7 и 10 после введения. В частности, в каждый
20 момент времени берут образцы крови и селезенки; образцы объединяют и оценивают для фармакодинамического анализа действия лекарственного средства на клеточные популяции лимфоцитов методом проточной цитометрии (см., например, Пример 5), выражаемого в виде кратности изменения относительно контрольного носителя. Помимо изменения количества клеток, проводится количественная оценка функциональных маркеров и маркеров
25 активности. Наконец, также оценивают концентрацию лекарственного средства в плазме.

Как показано на Фиг. 3А и 3В, введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 приводит к дозозависимому увеличению CD4⁺ Treg как в крови, так и в селезенке, с пиковым увеличением числа клеток через четыре дня после введения. При максимальной испытанной дозе (0,3 мг/кг) достигается устойчивый эффект мобилизации Treg, при этом уровни Treg не
30 возвращаются к исходным уровням на протяжении 7-10 дней после введения. В крови, количество ЕК-клеток повышается после введения наивысшей испытанной дозы, в то время

как изменения CD4 Т-лимфоцитов являются умеренными, и происходит небольшое снижение CD8 Т-лимфоцитов (Фиг. 4А-С). В-клетки и CD8-Т-клетки немного снижаются после введения самой высокой испытанной дозы, которая также привела к менее чем 2-кратному повышению количества ЕК-клеток. Маркеры функции и активности Treg (Фиг. 5А и 5В) демонстрируют, что при наивысшей испытанной дозе введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 приводит к повышению активации Treg, измеряемой по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD25 и Foxp3. Хотя число Treg не достигает максимальных значений в течение четырех дней после введения, эти маркеры активации достигают своего максимума в первые два дня после введения, медленно снижаясь в соответствии с экспозицией RUR_{20kD}-IL-2 в плазме. Процент быстро пролиферирующих Treg, измеряемый по Ki67, быстро увеличивался на протяжении двух дней после введения, и этот процент оставался стабильным до дня 6, после чего возвращался к исходным уровням. Кроме того, также увеличивается процент Treg, экспрессирующих индуцируемый маркером клеточной поверхности костимулятор Т-клеток (ICOS), что является важным результатом, поскольку экспрессия ICOS связана с повышенной супрессивной активностью Treg в аутоиммунной системе. Хотя повышение Ki67 и ICOS, по-видимому, несколько задерживается относительно пиковой концентрации композиции RUR_{20kD}-IL-2, их возвращение к исходным уровням действительно совпадает со снижением концентрации в плазме в этом доклиническом исследовании на мышах.

ПРИМЕР 3

Тест подавления Treg *in vitro*

Целью данного исследования является оценка ингибирующей функции регуляторных Т-клеток. Treg выделяют с помощью магнитного поля у наивных и получавших композицию RUR_{20kD}-IL-2 мышей C57BL/6, в дни 1-7 и 10 после подкожного введения. Treg и Tcon совместно культивируют в диапазоне соотношений от 1:2 до 1:512 в течение трех дней. Клеточную пролиферацию оценивают по включению ³H-тимидина в течение последних 16 часов анализа и рассчитывают % пролиферирующих клеток по сравнению с контролями на планшете.

Вкратце, селезенки собирают у самок мышей C57BL/6, получавших композицию RUR_{20kD}-IL-2 при различных уровнях доз (0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг) или носитель в указанные моменты времени после введения дозы (n = 4 мыши/экспериментальную группу/момент

времени). Из каждой селезенки выделяют отдельные клетки, и полученные смеси спленоцитов объединяют для каждой дозовой группы в каждый момент времени. Часть объединенного образца, эквивалентную одной селезенке, разделяют на аликвоты для определения профиля иммунных клеток. Оставшийся препарат спленоцитов используется для выделения регуляторных Т-клеток (Treg). CD4+CD25+ Treg выделяют из селезенки мышей методом магнитно-активируемой сортировки клеток (MACS) с использованием набора для выделения мышинных клеток CD4+CD25+ Regulatory T-cell isolation, mouse (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. CD4+ Т-клетки подвергают негативной селекции и затем разделяют на CD4+CD25- Т-клетки и CD4+CD25+ Treg. Наивные обычные CD4+CD25- Т-клетки (Tcon) выделяют методом MACS из селезенки мышей, взятых у не получавших лечения животных, с использованием набора для выделения наивных CD4+ Т-клеток (Miltenyi Biotec) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем.

Анализ подавления *in vitro* проводят в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 0,5 мкМ β-меркаптоэтанола и 1X антибиотика/фунгицида (100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 нг/мл амфотерицина В). 5×10^4 Tcon стимулируют шариками, покрытыми анти-CD3 и анти-CD28 (набор для активации/экспансии Т-клеток, мышинных, Miltenyi Biotec) в соотношении 2 шарика на каждую Tcon в 100 мкл культуральной среды в 96-луночных круглодонных планшетах. Супрессивную способность Treg оценивают путем добавления Treg к Tcon в различных соотношениях (отношения Treg:Tcon от 2:1 до 1:512). Каждое отношение Treg:Tcon тестируют в трех повторах. Клетки совместно культивируют в течение 72 часов при 37 °C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере; за 16 часов до завершения анализа в лунки добавляют 0,5 мкКи [3H]-тимидина. После отмывки клеток от невключенного [3H]-тимидина, поглощение тимидина измеряют как число импульсов в минуту (CPM) с использованием сцинтилляционного счетчика для микропланшетов (TopCount NXT, Perkin Elmer). Индивидуальные значения CPM нормируют по максимальной пролиферации путем деления на среднюю CPM, зарегистрированную для четырех самых низких разведений Treg:Tcon. Графики кривых «концентрация-ответ» строят с использованием четырехпараметрической нелинейной регрессии и взвешивания $1/y^2$ в Prism® 6.03 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Как показано на Фиг. 6A-D, Treg селезенки, выделенные у мышей, получавших носитель, через 1 и 4 дня после начала исследования, демонстрируют супрессивную способность, причем наибольшее подавление наблюдается при соотношении 1:2. Однако, Treg, выделенные в эти моменты времени после введения композиции RUR_{20kD}-IL-2, демонстрируют существенно повышенную супрессивную способность, о чем свидетельствует снижение пролиферации Tcon, особенно при соотношениях выше 1:8. Также оценивают относительную супрессивную способность выделенных Treg, культивируемых с Tcon в соотношении 1:2, в зависимости от времени (Фиг. 7). После введения RUR_{20kD}-IL-2 повышенная супрессивная активность Treg сохраняется в течение четырех дней, после чего возвращается к исходной активности, проявляемой в группе, получавшей контрольный носитель.

ПРИМЕР 4

Оценка композиции RUR_{20kD}-IL-2 в модели эффективности ГЗТ с КЛН на мышах

Для оценки способности индуцировать Treg путем введения композиции RUR_{20kD}-IL-2 для подавления воспаления, вызванного Т-клеточным антигеном, использовали мышей Balb/c (n = 6-10/группу) в модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Мышей сенсibilизируют подкожно в спинной области путем подкожной инъекции 100 мкл, содержащей 100 мкг гемоцианина лимфы улитки (КЛН) в эмульсии, содержащей полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда в соотношении 1:1:1, соответственно. Через пять дней измеряют исходную толщину уха перед провокационной пробой 10 мкг КЛН внутрикожно в левое ухо, при этом правое ухо остается интактным. Толщину ушей измеряют штангенциркулем в моменты времени 24, 48, 72 и 96 часов после провокационной пробы КЛН во всех группах. Композицию RUR_{20kD}-IL-2 вводят в день 0, во время проведения сенсibilизации, подкожными дозами в диапазоне значений от 0,003 мг/кг до 0,3 мг/кг каждые три дня. Положительный контроль, состоящий из циклоспорина (10 мг/кг, разовая доза), вводят в день 0.

Как показано на Фиг. 8А, 8В, после провокации антигеном индуцируется отек уха со средним увеличением толщины уха, достигающим максимума более 14 мм через 48 часов. Интактные уши без введения провокационной пробы продемонстрировали отсутствие изменений толщины в ходе исследования. Введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 на протяжении периода сенсibilизации и провокационной пробы в этом исследовании приводит к

значительному дозозависимому уменьшению отека уха, о чем свидетельствует уменьшение воспаления в каждый момент времени по сравнению с контрольным носителем. Для более количественной оценки эффекта после провокационной пробы, для каждой экспериментальной группы рассчитывают AUC (площадь под кривой) изменения толщины (AUC_{0-96ч}). Как показано на Фиг. 8А и 8В, минимально эффективная доза составляет 0,01 мг/кг каждые 3 дня (q3d), а максимальный эффект достигается при дозе 0,3 мг/кг каждые 3 дня. Статистически значимые значения AUC для группы носителя отмечены звездочкой ($p < 0,05$; ANOVA (дисперсионный анализ), критерий Тьюки). Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что повышенная мобилизация и активация Treg, достигаемая после введения, может подавлять антиген-зависимые воспалительные механизмы *in vivo*.

Активность композиции RUR_{20kD}-IL-2 по Примеру 1 оценивают после введения *in vivo* грызунам и яванским макакам. У мышей композиция RUR_{20kD}-IL-2 приводит к дозозависимому повышению Treg, которое достигает максимума через четыре дня после введения. Проточно-цитометрический анализ Treg, индуцируемых композицией RUR_{20kD}-IL-2 у мышей, показал, что маркеры активации Treg, такие как средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) Foxp3 и CD25, достигают своего максимального значения в течение первых двух дней после введения и постепенно снижаются с течением времени в соответствии с содержанием композиции RUR_{20kD}-IL-2 в плазме. Процент активно пролиферирующих Treg также достигает своего максимального значения в течение двух дней после введения и сохраняется до дня 6. Экспрессия функционального маркера Treg ICOS достигает пиковых значений в день 3, после чего возвращается к исходному уровню к дню 7. Treg, выделенные из селезенки получавших лечение мышей, значительно увеличивают свою супрессивную способность в первые четыре дня после введения, после чего она возвращается к базовым уровням активности. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 по Примеру 1 подавляла вызванную антигеном воспалительную реакцию в мышинной модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении раз в три дня.

ПРИМЕР 5

Исследование однократной дозы на яванских макаках

В этом исследовании яванским макакам, одной самке и одному самцу, вводили 25 мкг/кг композиции RUR_{20kD}-IL-2 подкожно. У каждого животного перед лечением (в дни -6 и

-1) и через ряд интервалов времени после лечения берут ряд образцов крови для оценки методом проточной цитометрии количества клеток Treg и состояния активации.

Для иммунофенотипического анализа образцы крови (приблизительно 1,0 мл) берут у каждой обезьяны в следующие моменты времени: до лечения (дни -6 и -1), день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 10, день 14 и день 21 после лечения. Образцы, взятые венепункцией, собирают в пробирки, содержащие антикоагулянт К₂ЭДТА. В ожидании переноса пробирки помещают на влажный лед. Образцы цельной крови анализируют методом проточной цитометрии с использованием следующих панелей, и образцы анализируют для определения:

10 Панель Т-клеток: CD45 / CD3 / CD4 / CD8 / ICOS

Панель T/B/NK: CD45 / CD3 / CD16 / CD20

Панель pSTAT5: CD3 / CD4 / CD8 / CD25 / CD127 / pSTAT5

Панель Treg 1: CD3 / CD4 / CD8 / CD25 / FoxP3 / Ki67

Панель Treg 2: CD3 / CD4 / CD8 / CD25 / FoxP3 / Helios

15 Компьютеризированные системы могут использоваться для проведения исследования, например, при сборе данных проточной цитометрии можно использовать программное обеспечение для анализа данных BD FACSCanto II/FACSDiva LEGENDPlex, а для анализа данных проточной цитометрии можно использовать программное обеспечение De Novo FCS Express.

20 Значения для мужчин и женщин усреднены, и величина изменения показана относительно значений для дня 1 (d-1), отмеченных пунктирной линией. Как показано на Фиг. 9, количество Treg-клеток значительно возрастает после введения, достигая максимального уровня через семь дней после введения, и возвращаясь к уровням, близким к d-1, к дням 14–21. Как показано незакрашенными треугольниками на рисунке 9А, почти все Treg, индуцированные композицией RUR_{20kD}-IL-2, являются пролиферативными, по результатам измерений Ki67.

Относительное состояние активации Treg, стимулированное введением композиции RUR_{20kD}-IL-2, дополнительно измеряют по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) FoxP3 и CD25. СИФ CD25 достигает своего максимального значения на 6-й день, затем идет плато до дня 10, и возвращение к уровням, близким к уровню до введения дозы, к дню 21. СИФ FoxP3 также достигает максимального значения через 6 дней после введения, после чего почти возвращается к уровням, предшествовавшим введению дозы, к дням 14-21.

Взятые вместе, эти данные демонстрируют возможность переноса результатов, полученных на мышах, на яванских макаков, поскольку наблюдается аналогичная величина индукции Treg в крови, которая сопровождается повышенной активацией Treg. Однако, в отличие от результатов на мышах, эффекты у яванских макаков более продолжительны по своей природе.

ПРИМЕР 6

Фармакокинетика и токсикокинетика однократной дозы у мышей, крыс и обезьян

Обобщены результаты фармакокинетики/токсикокинетики однократной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 у мышей, крыс и обезьян. Подробная информация о схеме дозирования представлена в Таблице 10.

Таблица 10: Обзор фармакокинетических и токсикокинетических исследований однократной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2

Вид	Путь введения	Пол	Объем дозы (мл/кг)	Дозовая концентрация (мг/мл)	Уровень дозы (мг/кг)	Собранные матрицы
Мышь (фармакинетика)	Подкожно	Самка	5	0,006, 0,02, 0,06	0,03, 0,1, 0,3	Плазма
Крыса (фармакинетика)	Внутривенно	Самец	1	0,01, 0,1, 1	0,01, 0,1, 1	Плазма, моча
	Подкожно	Самец	1	0,01, 0,1, 1	0,01, 0,1, 1	Плазма
Крыса (токсикокинетика)	Подкожно	Самка	0,2, 1,5	0,05, 0,5, 1	0,01, 0,1, 1,5	Плазма
Обезьяна (фармакинетика)	Внутривенно	Самец	0,2	0,125	0,025	Плазма, моча
	Внутривенно	Самка	0,2	0,125	0,025	Плазма, моча
	Подкожно	Самец	0,2	0,125	0,025	Плазма
	Подкожно	Самка	0,2	0,125	0,025	Плазма

Для исследования на мышах, носитель для композиции RUR_{20kD}-IL-2 представляет собой 10 мМ ацетата натрия, 200 мМ хлорида натрия и 2% сахарозы (рН 5). Для исследований на крысах и обезьянах носитель для композиции RUR_{20kD}-IL-2 представляет собой 50 мМ ацетата натрия, 200 мМ хлорида натрия и 2% сахарозы (рН 5).

После подкожного введения композиция RUR_{20kD}-IL-2 медленно всасывается с T_{max}, равным 0,33-1,0, 1,0-2,3 и 2,0 суток у мышей, крыс и обезьян, соответственно (Таблица 11).

Модерование композиции RUR_{20kD}-IL-2 в плазме возрастает в большей или меньшей степени пропорционально дозе у мышей и крыс. Биодоступность находится в диапазоне 29,8-46,0 % у крыс и 86,2 % у обезьян.

Объем распределения композиции RUR_{20kD}-IL-2 в стационарном состоянии (V_{ss}) у крыс, очевидно, возрастает с дозой и находится в диапазоне значений от 25,1 (0,01 мг/кг) до 52,6 мл/кг (1,0 мг/кг) (Таблица 12). В целом, V_{ss} в 1-2 раза и в 2-4 раза больше, чем видоспецифический объем плазмы у крыс и обезьян соответственно, что позволяет предположить, что RUR_{20kD}-IL-2 присутствует в основном в сосудистом пространстве.

Плазменный клиренс (CL) очень низок (0,560-1,14 мл/ч/кг у крыс и 0,245 мл/ч/кг у обезьян) (Таблица). После внутривенного или подкожного введения, концентрации композиции RUR_{20kD}-IL-2, по-видимому, демонстрируют моноэкспоненциальный спад с периодами полувыведения 1,85-2,24 суток у мышей, 1,25-2,44 суток у крыс и 10,4-12,9 суток у обезьян (Таблицы 11 и 12 и Фиг. 10А, 10В). Почечная экскреция RUR_{20kD}-IL-2 прогнозируется на низком уровне из-за его средней молекулярной массы 63 кДа, что близко к границе отсечки по молекулярной массе для клубочковой фильтрации.

Таблица 11: Среднее $\pm$ ст. ош. фармакокинетических/токсикокинетических параметров плазмы после введения разовой подкожной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 мышам C57BL/6, крысам Sprague-Dawley или яванским макакам

Вид (Номер исследования)	Доза п/к (мг/кг)	AUC _{inf} (ч*мкг/мл)	AUC _{last} (ч*мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	Период полувыведения (суток)	MRT _{inf} (суток)	T _{max} (суток)	Абсолютная биодоступность (%)
Мышь (LS-2016-2057, LS-2016-2073)	0,03	22,9	21,5	0,333	2,24	3,46	0,33	н.д.
	0,1	102	97,4	1,14	2,24	3,39	0,33	н.д.
	0,3	245	238	3,33	1,85	2,98	1,00	н.д.
Крыса (LS-2016-2033)	0,01	7,16 $\pm$ 0,53	7,12 $\pm$ 0,51	0,095 $\pm$ 0,006	1,35 $\pm$ 0,06	2,70 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,33	40,2
	0,1	35,7 $\pm$ 5,10	35,5 $\pm$ 5,10	0,38 $\pm$ 0,04	1,92 $\pm$ 0,08	3,42 $\pm$ 0,28	2,0 $\pm$ 0,00	29,8
	1	404 $\pm$ 79,0	398 $\pm$ 74,0	4,86 $\pm$ 0,93	1,27 $\pm$ 0,32	2,82 $\pm$ 0,16	2,30 $\pm$ 0,33	46,0
Крыса ¹ (LS-2016-004)	0,01	5,23	5,21	0,06	1,41	2,63	1	н.д.
	0,1	73,0	71,1	0,64	2,44	4,08	1	н.д.
	1,5	678	672	9,30	1,97	3,07	2	н.д.
Обезьяна ² (LS-2016-2026)	0,025	86,0	65,4	0,25	10,4	15,0	2,0	86,2

- 5 AUC_{inf}: площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от начального момента времени до бесконечности; AUC_{last}: площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от начального момента времени до последней измеримой концентрации; C_{max}: максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; MRT_{inf}: среднее время пребывания; T_{max}: время наблюдаемой максимальной концентрации в плазме
- 10
1. Фармакокинетические параметры основаны на среднем значении для трех крыс на момент времени.
 2. Среднее для самца и самки обезьяны.

Таблица 12: Среднее $\pm$ ст. ош. фармакокинетических параметров плазмы после введения однократной внутривенной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 крысам Sprague-Dawley или яванским макакам

Вид	Доза в/в (мг/кг)	AUCinf (ч*мкг/мл)	AUClast (ч*мкг/мл)	CL (мл/ч/кг)	Период полувыведения (суток)	MRTinf (суток)	Vss (мл/кг)
Мышь	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Крыса	0,01	17,8 $\pm$ 1,00	17,8 $\pm$ 0,90	0,56 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,16	1,87 $\pm$ 0,21	25,1 $\pm$ 1,80
	0,1	120 $\pm$ 8,00	120 $\pm$ 8,00	0,84 $\pm$ 0,06	1,67 $\pm$ 0,01	2,18 $\pm$ 0,04	44,1 $\pm$ 3,50
	1	877 $\pm$ 39,0 39100	870 $\pm$ 35	1,14 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,22	1,90 $\pm$ 0,16	52,6 $\pm$ 7,00
Обезьяна *	0,025	100	71,2	0,25	12,9	16,8	100

5 н.о.: не определено; AUCinf: площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от начального момента времени до бесконечности; AUClast: площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от начального момента времени до последней измеримой концентрации; CL: клиренс; MRTinf: среднее время пребывания; Vss: кажущийся объем распределения в стационарном состоянии. * Среднее для самца и самки обезьяны.

10

ПРИМЕР 7

Сравнительное исследование на мышах

Было проведено исследование, по существу аналогичное описанному в Примере 2, в котором мышам C57BL/6 вводили либо однократную подкожную дозу композиции RUR_{20kD}-IL-2 в количестве 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг, либо вводили немодифицированный IL-2 (алдеслейкин) в дозировках 0,03 мг/кг (ежедн. x5), 0,1 мг/кг (ежедн. x5) и 1 мг/кг (ежедн. x5). После введения образцы крови и селезенки собирают и анализируют для фармакодинамического анализа действия лекарственного средства на клеточные популяции лимфоцитов методом проточной цитометрии, выраженного как кратность изменения относительно контрольного носителя. Результаты представлены на Фиг. 10А и 10В (композиция RUR_{20kD}-IL-2 обозначена «RUR-IL-2», алдеслейкин обозначен «IL-2»).

20

ПРИМЕР 8

Исследование эффективности композиции RUR_{20kD}-IL-2 в мышинной модели системной красной волчанки (СКВ)

Данное исследование проводится для определения эффективности воздействия композиции RUR_{20kD}-IL-2 на развитие и прогрессирование СКВ и связанных с ней характеристик с использованием мышинной модели MRL/MpJ-Faslpr, представляющей собой наиболее часто изучаемую модель этого заболевания на мышах (Perry, D., *et al.*, *J Biomed Biotechnol* 2011:271694). У мышинной модели MRL/MpJ-Faslpr развивается аутоиммунное заболевание, которое отражает патологии СКВ человека, включая увеличение лимфатических узлов, повышение уровней IgG, продукцию антинуклеарных антител, протеинурию и почечную недостаточность, вызванную воспалением клубочков. Маточный раствор композиции RUR_{20kD}-IL-2, как описано в Примере 1, используют в качестве исследуемого препарата (1,58 мг/мл), поставляемого в носителе (прозрачная жидкость; 10 мМ ацетата натрия / 200 мМ хлорида натрия / 2% (мас./об.) сахарозы), приготовлен в стерильной воде для инъекций (SWFI), USP; pH 5,0 ± 0,1). В дни введения доз отбирают подходящее количество исследуемого препарата и разбавляют носителем для достижения желаемой дозовой концентрации (доза 0,03 мг/кг и доза 0,3 мг/кг); объем дозы составлял 5 мл/кг. Животные, использованные для исследования, представляют собой мышей MRL/MpJ-Faslpr и интактных самок мышей MRL/MpJ в возрасте от 6 до 8 недель. Животных распределяют по экспериментальным группам путем рандомизации. Экспериментальные группы описаны в Таблице 13 ниже. Перед началом эксперимента 45 мышей MRL/MpJ-Faslpr рандомизировали на 3 группы (по 15 в каждой из групп 2-4) на основании массы тела и уровня содержания белка в моче до начала эксперимента. Животным в группах 2-4 вводят подкожно носитель или исследуемый препарат, как описано в Таблице 6. Группа 1 - мыши MRL/MpJ получали носитель в качестве отрицательного контроля.

Через три (3) дня после введения первой дозы на 8-й неделе 3 мышей из групп 2-4 гуманно умерщвляли, а образцы крови собирали и обрабатывали. Вес тела измеряли два раза в неделю с начала исследования и продолжали на всем его протяжении.

Снимки кожных повреждений делали при первом появлении, а затем с интервалом в одну неделю.

Мочу собирали за день до введения дозы (на исходном уровне), а затем собирали еженедельно. Уровни белка в моче измеряли с помощью анализатора Siemens Clinitek Status Analyzer.

В день умерщвления (через 3 дня после последней дозы в конце 20-й недели) всех мышей анестезируют внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (50 мг/кг). Образцы крови собирают и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин для получения образцов сыворотки. Сыворотку хранят при -80 °С до проведения клинического биохимического тестирования. Образцы сыворотки (100 мкл) анализируют на уровень анти-дцДНК методом ИФА (набор для ИФА, специфичный к мышинному анти-дцДНК, IgG, Alpha Diagnostic International, № кат. 5120), и сыворотку тестируют на концентрацию BUN (остаточный азот мочевины крови) с использованием автоматического биохимического анализатора Hitachi 7020. Для анализа лимфоцитов образцы крови собирают в пробирки с ЭДТА-К и тестируют на процентное содержание CD3 / CD4 / CD8 / Treg / EK / В-клеток методом проточной цитометрии. Результаты представлены на Фиг. 11. Как видно, введение композиции RUR_{20KD}-IL-2 в дозе 0,3 мг/кг эффективно подавляет биомаркер повреждения почек (т.е. уровни белка в моче) почти до тех же уровней, которые наблюдаются у нормальных мышей. Это исследование дополнительно проясняет влияние индуцированных RUR-IL-2 Treg на контроль физиологического иммунного ответа и прогрессирование заболевания в репрезентативной животной модели СКВ.

Таблица 13 - Экспериментальные группы

Группа	Исследуемый препарат	N	Концентрация (мг/мл)	Дозировка		Путь	Схема
				(мл/кг)	(мл/кг)		
1	Носитель ^a (MRL/MpJ)	3	н.д.	5	н.д.	п/к	Два раза в неделю, с 8-й по 20-ю неделю
2	Носитель ^a (MRL/MPJ-Faslpr)	15	н.д.	5	н.д.	п/к	Два раза в неделю, с 8-й по 20-ю неделю
3	RUR _{20KD} -IL-2 Доза 1 (MRL/MpJ-	15	0,006	5	0,03	п/к	Два раза в неделю, с 8-

	Faslpr)						й по 20-ю неделю
4	RUR _{20kD} -IL-2 Доза 2 (MRL/MpJ- Faslpr)	15	0,06	5	0,3	п/к	Два раза в неделю, с 8- й по 20-ю неделю

а: носитель исследуемого препарата

ПРИМЕР 9

Исследование композиции RUR_{20kD}-IL-2 в модели антигензависимой опосредованной Т-клетками гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

В этом исследовании моделируется, как стимуляция и экспансия Treg *in vivo* с помощью композиции RUR_{20kD}-IL-2 может подавлять опосредованную Т-клетками реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) антигензависимым образом в модели пищевой аллергии с установившейся высокой степенью анафилаксии.

Для создания модели ГЗТ мышей Balb/c сенсibilизируют подкожным введением модельного антигена гемоцианина лимфы улитки (KLH), эмульгированного в полном и неполном адьюванте Фрейнда. Подкожное введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 (0,003, 0,01, 0,3, 0,1 или 0,3 мг/кг, раз в 3 дня (q3d)) или циклоспорин А (10 мг/кг, ежедневно (qd)) начинают в день 0 и продолжают до дня 8, с внутрикожным провокационным введением KLH в день 5, и отек уха измеряют в течение четырех дней. Проводят иммуногистохимию (ИГХ) воспаленных ушей для количественного определения процента FoxP3+ Treg-клеток после провокационной пробы KLH. Специфичность ответа оценивают через дополнительные 3-4 недели без лечения путем либо повторного провокационного тестирования KLH, либо проведения сенсibilизации и провокационного тестирования неродственным антигеном овальбумина (OVA). Чтобы понять влияние Treg, подвергнутых экспансии с помощью композиции RUR_{20kD}-IL-2, на пищевой аллерген, мышей Balb/C сенсibilизируют дважды в неделю внутрибрюшинно эмульгированным OVA с квасцами. Через десять дней после 2-й сенсibilизации мышам вводили OVA восемь раз перорально через день. Подкожное введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 (0,1 мг/кг, 3 раза через 3 дня (q3dx3)) или циклоспорин А (10 мг/кг, ежедневно) начинают в день 0 и продолжают до дня 8. Тяжесть аллергического ответа оценивают с помощью клинической шкалы в течение 30-45 минут после 8-й провокационной пробы. Далее количественно определяют титры протеазы тучных клеток 1

(МСРТ 1) сыворотки и OVA-специфического IgE. Процент Treg определяется методом проточной цитометрии в периферической крови и селезенке.

В этой мышинной модели ГЗТ введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 подавляло воспалительный ответ на повторное провокационное введение KLH дозозависимым образом.

5 ИГХ-анализ воспаленных ушей показывает значительную инфильтрацию FoxP3+ Treg-клеток. Супрессивное действие на воспаление является длительным и антигенспецифическим, что подтверждается повторным провокационным введением через 3-4 недели того же антигена и неродственного антигена после сенсibilизации без дополнительного введения композиции RUR_{20kD}-IL-2. Наконец, было обнаружено, что
10 введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 эффективно снижает высокую степень симптомов анафилаксии, вызванных повторным введением модельного пищевого аллергена, OVA. Снижение клинических показателей анафилаксии коррелирует со значительным снижением уровней МСРТ1 и титров анти-OVA-специфического IgE, а также со значительным повышением Treg. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 продемонстрировала антигенспецифическую и
15 стойкую экспансию Treg и терапевтические ответы в этой модели гиперчувствительности KLH у мышей. Кроме того, было обнаружено, что композиция RUR_{20kD}-IL-2 является эффективной в модели пищевой аллергии. Эти данные подтверждают возможность использования композиций RUR_{20kD}-IL-2 для лечения антигенспецифического воспаления, которое может иметь место при аутоиммунных и/или воспалительных заболеваниях.

20 Доклинические данные, представленные в данном документе, подтверждают концепцию, согласно которой композиции конъюгата стимулятора Treg RUR_{20kD}-IL-2 с IL-2 увеличивают количество и супрессорную функцию регуляторных Т-клеток для лечения аутоиммунных и воспалительных расстройств. Нарушение продукции IL-2 и дисфункции регуляторных Т-клеток были задействованы в качестве иммунологического механизма во
25 многих аутоиммунных заболеваниях. Хотя низкие дозы IL-2 могут использоваться для стимуляции Treg с клинической пользой, плохая фармакокинетика требует ежедневной доставки, побочные эффекты ограничивают дозу, а повышение Treg является умеренным и непродолжительным. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 обеспечивают стимулятор Treg на основе конъюгата IL-2, предназначенный для подкожного введения в низких дозах, для селективного
30 восстановления гомеостаза Treg с минимальным влиянием на обычные функции Т-клеток. В данном документе представлены данные, характеризующие способность композиций RUR_{20kD}-IL-2 избирательно увеличивать количество и активность Treg в моделях мышей и не

являющихся человеком приматов, и оценки эффективности композиций RUR_{20kD}-IL-2 в моделях аутоиммунитета. Сродство к рецептору IL-2 оценивают методом поверхностного плазмонного резонанса. Активность в человеческих МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови) может быть измерена путем индукции pSTAT5 в нескольких популяциях лимфоцитов с использованием проточной цитометрии и времяпролетной массовой цитометрии (CyToF). Активность *in vivo* после подкожного введения мышам C57BL/6 или яванским макакам измеряют по изменениям числа лимфоцитов и активации методом проточной цитометрии. Функцию Treg *ex vivo* определяют путем ингибирования пролиферации Tcon выделенными Treg селезенки. Эффективность оценивают на модели системной красной волчанки (СКВ) с использованием мышей MRL/MpJ-Fas^{lpr}. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 обладают сильно ослабленным сродством к человеческому IL-2R β по сравнению с комплексами IL-2R α и IL-2R $\alpha\beta$, что свидетельствует о преимущественной активации Treg, которые экспрессируют высокоаффинный IL-2R $\alpha\beta\gamma$, по сравнению с Tcon, экспрессирующими низкоаффинный IL-2R $\alpha\beta$. В условиях *in vitro*, Treg более чувствительны к стимуляции композицией RUR_{20kD}-IL-2, демонстрируя повышенное фосфорилирование STAT5 по сравнению с другими субпопуляциями лимфоцитов в МКПК человека. У мышей однократное введение приводит к устойчивой мобилизации Treg в течение 7-10 дней в крови и селезенке без активации Tcon, причем этому эффекту сопутствует индукция маркеров активации Treg и повышение супрессивной способности *ex vivo*. У яванских макак экспозиция в плазме более продолжительна с устойчивой мобилизацией и активностью Treg на протяжении более 14 суток после однократного введения - ответ превосходит по величине, продолжительности и специфичности эффект эквивалентной общей дозы rhIL-2, вводимой ежедневно в течение пяти дней. Наконец, композиция RUR_{20kD}-IL-2 эффективна в мышинных моделях СКВ. В модели СКВ повторное введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 в течение 12 недель поддерживает повышение Treg, снижает уровень азота мочевины в крови и возвращает к норме уровни белка в моче и гистопатологию почек. В модели cGVHD (хроническая реакция "трансплантат против хозяина") повторное введение композиции RUR_{20kD}-IL-2 повышает Treg и снижает В-клетки зародышевого центра в селезенке и устраняет дисфункцию легких. Композиции RUR_{20kD}-IL-2 обеспечивают устойчивую, предпочтительную активацию Treg и демонстрируют эффективность в модельных системах СКВ.

ПРИМЕР 10

Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование фазы I для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики однократной возрастающей подкожной дозы композиции RUR_{20kD}-IL-2 у здоровых добровольцев

Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование проводится для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики однократных возрастающих низких подкожных доз композиции RUR_{20kD}-IL-2 (RUR_{20kD}-IL-2) у здоровых добровольцев. Исследование разделено на семь когорт, в которых испытуемые получали 0,3, 1,0, 3,0, 6,0, 9,0, 13,5 или 20,0 мкг/кг RUR_{20kD}-IL-2. В каждую дозовую когорту было рандомизировано по двенадцать субъектов, девять из которых получили однократную подкожную дозу RUR_{20kD}-IL-2, а трое - плацебо. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 приготовлена в виде стерильной жидкости для подкожных инъекций, разбавленной стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Готовая лекарственная форма выпускается в одноразовых стеклянных флаконах и хранится при 2-8 °С. Каждый флакон с готовой лекарственной формой содержал 0,75 ± 0,1 мг rhIL-2 (в пересчете на RUR_{20kD}-IL-2). Композицию RUR_{20kD}-IL-2 готовят в 10 мМ ацетата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 2% (мас./об.) сахарозы, pH 5,0, при концентрации белка приблизительно 1,0 мг/мл. Плацебо представляет собой коммерчески доступный 0,9% раствор хлорида натрия. Начальную дозу 0,3 мкг/кг выбирают с использованием подхода минимального ожидаемого уровня биологического эффекта (MABEL), и она подтверждается уровнем отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) у наиболее чувствительных видов из доклинических токсикологических исследований. Начальная доза устанавливается на уровне 0,3 мкг/кг, чтобы можно было оценить фармакокинетику и безопасность RUR_{20kD}-IL-2. Двум субъектам, одному из которых вводили RUR_{20kD}-IL-2, и одному - плацебо, вводили дозы двойным слепым методом и наблюдали за возможными побочными эффектами в течение не менее 7 дней до начала исследования.

Основная цель исследования - оценить безопасность и переносимость RUR_{20kD}-IL-2 при введении в виде однократной подкожной дозы. Вторичные цели исследования заключаются в том, чтобы (1) наблюдать динамику и степень изменений количества и/или активности регуляторных Т-клеток (Treg), (2) охарактеризовать фармакокинетический (PK) профиль RUR_{20kD}-IL-2, вводимого в виде однократной подкожной дозы, и (3) оценить

иммунологические эффекты RUR_{20kD}-IL-2 в крови, включая влияние на цитокины, Т-клетки, другие популяции периферической крови, другие сывороточные белки, изменения в экспрессии генов и антитела к лекарственному средству. На первой фазе исследования иммунные маркеры проверяют до введения дозы и в течение до 20 часов после введения дозы. В частности, тестируют Treg, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, естественные киллерные (ЕК) клетки, цитокины, растворимый CD25 и РНК в когортах, получающих RUR_{20kD}-IL-2 и плацебо. На последующих этапах эти же иммунные маркеры также тестируются в моменты времени через 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40 и 50 дней после введения дозы.

Не было сообщений о дозоограничивающей токсичности (DLT), серьезных побочных эффектах (SAE), летальных исходах или клинически значимых отклонениях. Побочные эффекты (ПЭ) ограничиваются слабыми (степень 1) реакциями в месте инъекции, и не наблюдалось никаких ПЭ, подтвержденно связанных с высокими дозами IL-2.

Предварительный фармакокинетический анализ показывает, что RUR_{20kD}-IL-2 достигал максимальной концентрации примерно через 4-6 дней после введения дозы у большинства субъектов, с небольшими изменениями концентраций на протяжении примерно до 2 недель после введения дозы, после чего концентрации снижались с периодом полувыведения приблизительно 8-9 дней.

Фармакодинамическая (PD) оценка показывает, что RUR_{20kD}-IL-2 приводит к дозозависимому повышению CD4⁺FoxP3⁺CD25^{яркие} Treg в циркуляции. В когортах с разовой дозой 3,0, 6,0, 9,0, 13,5 и 20,0 мкг/кг наблюдается устойчивое повышение абсолютного количества циркулирующих CD4⁺FoxP3⁺CD25^{ярких} Treg, причем уровни не возвращаются к базовой линии до примерно 20-25 дней после введения. Наблюдается среднее увеличение количества CD4⁺FoxP3⁺CD25^{ярких} Treg в 3, 3,5, 4,1, 5 и 8,1 раза по сравнению с уровнем до введения дозы для доз 3,0, 6,0, 9,0, 13,5 и 20,0 мкг/кг, соответственно. Также наблюдается увеличение общей популяции CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ Treg при дозах 3,0, 6,0, 9,0, 13,5 и 20,0 мкг/кг, но величина изменения меньше, чем наблюдаемая для CD4⁺FoxP3⁺CD25^{ярких} Treg. Не наблюдается изменений в количестве Treg у субъектов, получавших RUR_{20kD}-IL-2 в дозах 0,3 и 1,0 мкг/кг, по сравнению с субъектами, получавшими плацебо. Первичный эффект RUR_{20kD}-IL-2 наблюдается на Treg, поскольку отсутствуют изменения в процентном соотношении или численности популяций Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺) при использовании RUR_{20kD}-IL-2 в любой дозе. Наблюдается небольшое увеличение процентного и абсолютного

количества ЕК-клеток при 13,5 и 20,0 мкг/кг без признаков побочных эффектов, связанных с высокими дозами IL-2.

Как показано на Фиг. 12, композиция RUR_{20kD}-IL-2 приводила к дозозависимому увеличению CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg. При 3,0, 6,0, 9,0 и 13,5 мкг/кг наблюдалось

5 устойчивое увеличение абсолютных количеств CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg, причем уровни не возвращались к базовой линии в течение 20-25 дней после введения. Было отмечено среднее увеличение количества CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg в 3,0, 3,5, 4,1 и 5,0 раз по сравнению с плацебо при дозах 3,0, 6,0, 9,0 и 13,5 мкг/кг, соответственно, со смещением

10 максимального отклика от пика в момент времени 84 часа при 3,0 мкг/кг к более продолжительному пиковому ответу, продолжающемуся от 7 до 12 дней, при 13,5 мкг/кг, с последующим возвращением к исходным уровням к дням 20-25. Как показано на Фиг. 13, также наблюдалось дозозависимое увеличение общей популяции CD4+FoxP3+CD25+ Treg при дозах 3,0, 6,0, 9,0 и 13,5 мкг/кг, но величина изменения была меньше, чем наблюдаемого для CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg. Не наблюдали изменений в общем количестве CD4+ Treg у

15 субъектов, получавших RUR_{20kD}-IL-2, по сравнению с субъектами, получавшими плацебо, при дозах 0,3 мкг/кг и 1 мкг/кг (Фиг. 13).

Важно отметить, что первичный эффект RUR_{20kD}-IL-2 был замечен для Treg, так как не наблюдалось никаких изменений в процентном соотношении популяций клеток Tcon (CD4+, CD8+) у субъектов, получавших либо RUR_{20kD}-IL-2, либо плацебо. Однако небольшое

20 увеличение абсолютного количества CD8+ Т-клеток и процентного содержания Ki67+CD8+ Т-клеток наблюдалось при 13,5 мкг/кг у субъектов, получавших RUR_{20kD}-IL-2 (Фиг. 14A-D). Абсолютное количество CD4+ Т-лимфоцитов не изменялось при любых дозовых уровнях.

Также была проанализирована популяция CD56+ ЕК-клеток. Было отмечено увеличение абсолютного числа циркулирующих ЕК-клеток с аналогичным увеличением процента этой подгруппы клеток при уровне дозы 13,5 мкг/кг, но не при более низких уровнях доз. Также было отмечено при 3,0, 6,0, 9,0 и 13,5 мкг/кг дозозависимое увеличение процента CD56+ ЕК-клеток, экспрессирующих Ki67, маркер пролиферации и, следовательно, маркер активации. При 3,0, 6,0 и 9,0 мкг/кг процент клеток, экспрессирующих Ki67, составлял приблизительно 10%, 20-30% и 30-40%, соответственно, после введения RUR_{20kD}-IL-2. Процент клеток, экспрессирующих Ki67, при дозе 13,5 мкг/кг в дальнейшем не увеличивался, оставаясь на уровне 30-40%.

Использование RUR_{20kD}-IL-2, в соответствии с исследованием SAD (однократные возрастающие дозы) привело к устойчивому увеличению количества CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg, причем уровни не возвращались к базовой линии на протяжении 20-25 дней после введения. Также наблюдалось увеличение общей популяции CD4+FoxP3+CD25+ Treg, хотя величина указанного изменения была меньше, чем наблюдаемая для CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg. Увеличение количества CD8+ Т-клеток и ЕК-клеток наблюдалось при 13,5 мкг/кг.

Также проводились исследования дополнительных когорт RUR_{20kD}-IL-2, 20,0 мг/кг (n = 13); плацебо (n = 3) и RUR_{20kD}-IL-2, 28,0 мг/кг (n = 9); плацебо (n = 3). За каждой когортой наблюдают в течение 50 дней для оценки влияния подкожного введения разовых возрастающих доз RUR_{20kD}-IL-2 здоровым добровольцам на безопасность и переносимость у субъектов, оцениваемые по нежелательным явлениям, показателям жизненно важных функций и результатам клинических лабораторных исследований, а также динамике и степени изменений в количестве и активности Treg, Tcon и ЕК-клеток и их субпопуляций, фармакокинетики RUR_{20kD}-IL-2, и другим иммунологическим эффектам, таким как уровни цитокинов, популяции клеток периферической крови, сывороточные белки и экспрессия генов.

Как правило, результаты по безопасности не выявляли ограничивающих дозу токсичностей, летальных исходов или побочных эффектов, приводящих к прекращению исследования, клинически значимых показателей жизненно важных функций, ЭКГ или отклонений при физикальном обследовании. Побочные эффекты были в основном ограничены легкими или умеренными (степени 1 или 2) реакциями в месте инъекции, 4 субъекта испытывали головную боль 1 степени, 1 субъект, получивший самую высокую тестируемую дозу (28,0 мкг/кг), испытывал легкие признаки (степени 1) и симптомы

пирексии, анорексии, рвоты, диареи, тахикардии и миалгии (все 1 степени тяжести), отнесенные к повышенными уровнями цитокинов, без выявления антител к лекарственному средству.

Как правило, в ответ на RUR_{20kD}-IL-2 наблюдалось устойчивое дозозависимое увеличение количества CD25-ярких Treg (см. Фиг. 15). При 28 мкг/кг композиции RUR_{20kD}-IL-2 наблюдалось 17-кратное среднее увеличение пика количества CD25-ярких Treg по сравнению со значениями до введения дозы. Уровни Treg достигают пика в дни 10-12 и не возвращаются к базовой линии до дней 20-25 после введения. Увеличение маркеров активации Treg ICOS и CTLA4 наблюдалось при дозах $\geq 13,5$ мкг/кг.

Не наблюдалось никаких существенных изменений процентного содержания клеток T_{scn}, и наблюдалось минимальное увеличение CD56⁺ ЕК-клеток в ответ на RUR_{20kD}-IL-2 (см. Фиг. 16). (CD16⁺CD56⁺ ЕК-клетки также подсчитывались, данные не приведены). Увеличения количества ЕК-клеток не были дозозависимыми. Наблюдалось двукратное увеличение количества ЕК-клеток при наивысшей концентрации RUR_{20kD}-IL-2. RUR_{20kD}-IL-2 вызывает дозозависимое повышение Treg без индукции CD8⁺ Т-клеток до 28 мкг/кг. Введение RUR_{20kD}-IL-2 приводит к 15-кратному увеличению среднего отношения пиков Treg:CD8 по сравнению с базовой линией при 28 мкг/кг. (См. Фиг. 17).

Целью исследования была оценка безопасности и переносимости RUR_{20kD}-IL-2 у людей, которым вводили подкожно (п/к) однократные возрастающие дозы. Кроме того, были исследованы динамика и степень изменений количества и процентного содержания Treg, обычных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, ЕК-клеток, уровней цитокинов и фармакокинетики (РК) композиции RUR_{20kD}-IL-2 в периферической крови. В данном впервые проводившемся на людях, двойном слепом исследовании с однократной возрастающей дозой здоровые добровольцы получали подкожно дозы от 0,3 до 28 мкг/кг (9 активного вещества:3 плацебо на когорту), и за субъектами наблюдали в течение 50 дней. Все 8 запланированных когорт завершили введение доз. Не наблюдалось ограничивающих дозы токсичностей, серьезных нежелательных явлений, летальных исходов или клинически значимых отклонений жизненно важных функций, электрокардиограмм или значений лабораторных тестов. Нежелательные явления, отнесенные к RUR_{20kD}-IL-2, были в основном ограничены легкими (степени 1) реакциями в месте инъекции. Один субъект, получивший наибольшую дозу, продемонстрировал преходящие и легкие (степени 1) симптомы повышенного уровня цитокинов и лимфопении, которые исчезли без лечения. Ни у одной другой особы с любыми

уровнями дозы не было системных признаков или симптомов с установленной связью с лечением IL-2. На сегодняшний день, первые 6 когорт были протестированы на антитела к лекарственному препарату, и ничего не было обнаружено. RUR_{20kD}-IL-2 достигал максимального уровня в плазме через 4-6 дней после введения, с небольшими изменениями в течение около 2 недель, а затем снижался с периодом полувыведения около 8-9 дней. Первичный эффект RUR_{20kD}-IL-2 наблюдался для Treg. В когортах с дозами от 3,0 до 28,0 мкг/кг наблюдалось дозозависимое и устойчивое повышение абсолютного количества и процентного содержания циркулирующих CD4+FoxP3+CD25^{ярких} Treg. Повышенные уровни достигли пика в дни 10-12 и не возвращались к базовой линии в течение около 20-25 дней после введения. При 28,0 мкг/кг среднее увеличение пикового количества таких CD25^{ярких} Treg достигало 17-кратного по сравнению с базовой линией, а среднее процентное содержание пика увеличилось с 0,5% до 7,4%. Кроме того, наблюдалось увеличение маркеров активации Treg при дозах $\geq 13,5$ мкг/кг. Наблюдалось среднее увеличение в 3,5 раза процентного содержания и количества ЕК-клеток при наивысшей испытанной дозе, но не наблюдали никаких изменений процентного содержания или количества обычных CD4+ или CD8+ Т-клеток. Композиция RUR_{20kD}-IL-2 селективно индуцировала Treg, о чем свидетельствует 15-кратное увеличение среднего пикового отношения Treg:CD8 по сравнению с базовой линией в группе 28,0 мкг/кг. В заключение отметим, что разовые дозы конъюгата стимулятора T-reg с IL-2, RUR_{20kD}-IL-2, в испытанном диапазоне доз хорошо переносились и были безопасными. RUR_{20kD}-IL-2 приводил к внушительному и селективному дозозависимому повышению циркулирующих CD25^{ярких} Treg с минимальным воздействием на обычные Т-клетки и с относительно небольшими эффектами на ЕК-клетки. Эти клинические результаты дополняют предыдущие исследования на животных, демонстрирующие пролонгированное и селективное по отношению к Treg действие RUR_{20kD}-IL-2, и являются убедительной поддержкой для тестирования RUR_{20kD}-IL-2 в качестве нового терапевтического средства при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная волчанка.

Композиция RUR_{20kD}-IL-2 была безопасной и хорошо переносилась в этом первом проводившемся на людях исследовании с однократной возрастающей дозой и привела к поразительному и избирательному дозозависимому увеличению циркулирующих CD25-ярких клеток Treg. Влияние на Tcon и ЕК-клетки было минимальным, и данные этого исследования подтверждают необходимость тестирования RUR_{20kD}-IL-2 при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях.

ПРИМЕР 11

**Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с
возрастающей многократной дозой фазы I для оценки безопасности, переносимости,
5 фармакокинетики и фармакодинамики подкожного введения RUR_{20kD}-IL-2 у пациентов
с системной красной волчанкой**

Проводится двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и иммунологических эффектов возрастающих многократных доз RUR_{20kD}-IL-2 в четырех дозовых когортах пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) от минимальной до умеренной. Также оценивается влияние на активность заболевания СКВ. Рандомизируют в каждую из четырех дозовых когорт по двенадцать пациентов с СКВ с активностью заболевания от минимальной до умеренной, девять из которых получали многократные подкожные дозы 1,0 мг/мл водного раствора RUR-IL-2-20kD, а трое получали плацебо.

15 Лекарственное средство RUR_{20kD}-IL-2 и плацебо готовят, как описано в данном документе, например, в Примере 1-А. Клиническая активность заболевания СКВ не является необходимой в качестве критерия включения. В когорте 1 начальную дозу 3,0 мкг/кг вводят три раза с двухнедельными интервалами (дни 1, 15 и 29). Эта начальная доза основана на благоприятном профиле безопасности и фармакодинамики однократных подкожных доз

20 RUR_{20kD}-IL-2, ранее определенном в описанном выше исследовании. Последующие уровни доз в когортах 2, 3 и 4, соответственно, были в два раза выше, чем в предыдущей дозовой когорте. Пациенты в когортах 1-3 получали три дозы исследуемого лекарственного средства с двухнедельными интервалами на протяжении в общей сложности четырех недель. Дозы для

25 оценки в ходе исследования охватывают диапазон от 3,0 мкг/кг до 24 мкг/кг. Пациенты в когорте 4 получают двенадцать недель лечения RUR_{20kD}-IL-2 в дни 1, 15, 29, 43, 57, 71 и 85. Эта когорта дает данные о безопасности введения и фармакокинетическом и фармакодинамическом профилях на протяжении более длительного периода лечения RUR_{20kD}-IL-2. После получения последней дозы RUR_{20kD}-IL-2 или плацебо пациентов наблюдают в течение дополнительных пятидесяти дней для оценки безопасности,

30 фармакокинетики, фармакодинамики и предварительной эффективности. Комитет по рассмотрению вопросов безопасности оценивает восемь из двенадцати субъектов в каждой когорте через две недели после введения третьей дозы последнего пациента на предмет

возможных проблем с безопасностью. Кроме того, все пациенты в когорте 4 дважды проходят оценку Комитета по рассмотрению вопросов безопасности: (1) через две недели после того, как первые восемь субъектов получают свою третью дозу, и (2) через две недели после того, как все субъекты получают все дозы исследуемого лекарственного средства.

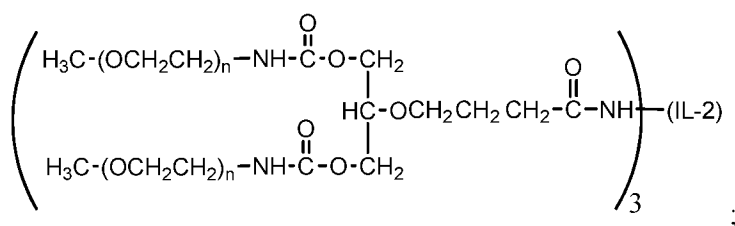
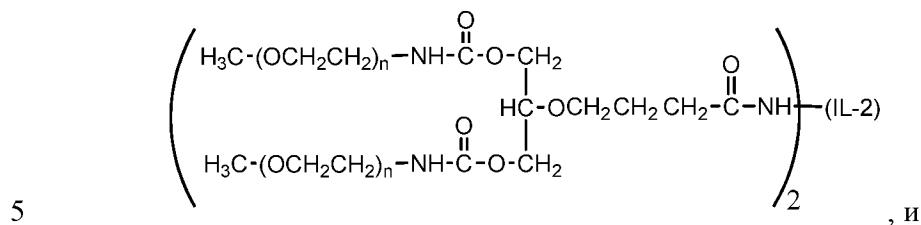
- 5 Иммунологические изменения, включая ответы Treg, CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и ЕК-клеток, уровни цитокинов и доступные фармакокинетические данные, в дополнение к результатам исследований безопасности, используются для определения уровней доз. Основная цель исследования заключается в оценке безопасности и переносимости RUR_{20kD}-IL-2, вводимого в виде многократных возрастающих подкожных доз пациентам с СКВ.
- 10 Вторичные цели исследования заключаются в том, чтобы (1) охарактеризовать фармакокинетический профиль RUR_{20kD}-IL-2 после многократных подкожных доз у пациентов с СКВ, (2) оценить влияние RUR_{20kD}-IL-2 на динамику и степень изменений биомаркеров фармакодинамики, включая количество и функцию Treg и субпопуляций Treg, CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, ЕК-клеток, и уровни цитокинов у пациентов с SLE, (3)
- 15 оценить влияние RUR_{20kD}-IL-2 на наличие и уровни антител против двухцепочечной ДНК, а также уровни С3 и С4 комплемента у пациентов с СКВ, и (4) оценить влияние RUR_{20kD}-IL-2 на активность заболевания у пациентов с СКВ. Результаты, отображающие предварительные фармакокинетические данные исследования с многократными возрастающими дозами, сравниваются с данными из исследования с однократным подкожным введением в Таблице
- 20 15 ниже:

Таблица 15. Фармакокинетические данные исследований на людях с однократным и многократным введением

Доза	Исследование однократной дозы				Многодозовое исследование			
		AUC _{0–14дней} (нг/мл*день)	C _{max} (нг/мл)	t _{max} (суток)		AUC _{0–14дней} (нг/мл*день)	C _{max} (нг/мл)	t _{max} (суток)
3,0 мкг/кг	Медиана (n = 9)	214	21	3,5	Медиана (n = 9)	185	18	6
	min	143	13	1,3	min	113	15	2
	max	388	41	14	max	291	26	14
6,0 мкг/кг	Медиана (n = 9)	542	46	5	Медиана (n = 7)	113	14	6
	min	73	13	2	min	43	5	4
	max	705	70	9	max	206	22	14

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая пегилированные конъюгаты IL-2, имеющие структуру:



где:

IL-2 представляет собой интерлейкин-2;

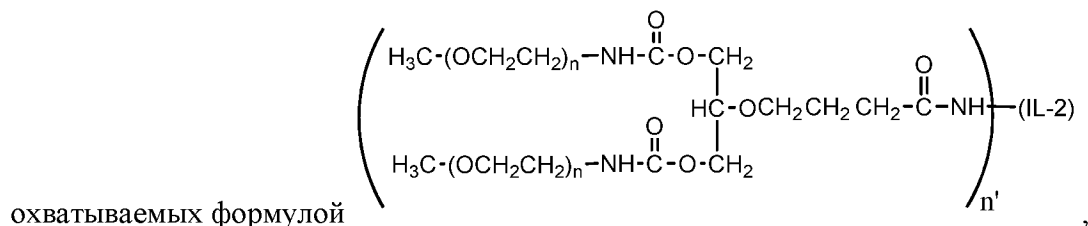
n независимо в каждом случае обозначает целое число от примерно 3 до примерно

10 4000.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что IL-2 представляет собой алдеслейкин.

3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит в общей сложности не более примерно 20 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2,

15

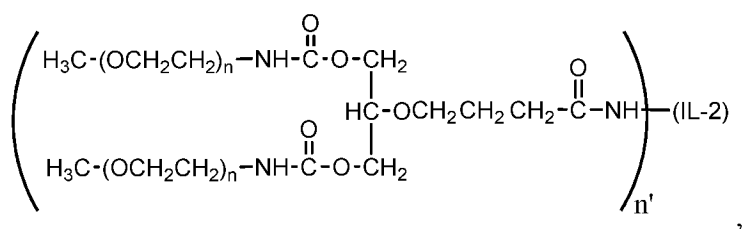


охватываемых формулой

где n' выбирают из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

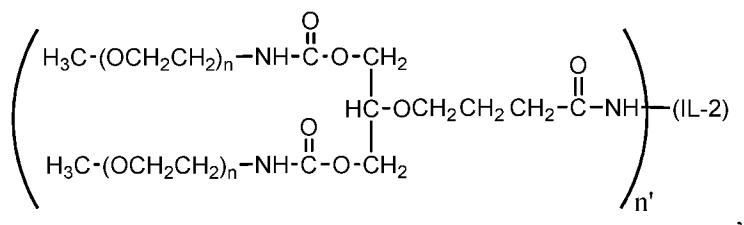
4. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит в общей сложности не более примерно 15 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, охватываемых формулой

20



где n' выбирают из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

5. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит в общей сложности не более примерно 10 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, охватываемых формулой



где n' выбирают из 1, 4, 5, или целого числа больше 5.

6. Композиция по любому из пп. 3-5, содержащая не более примерно 10 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 1.

7. Композиция по любому из пп. 3-5, содержащая не более примерно 7 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 1.

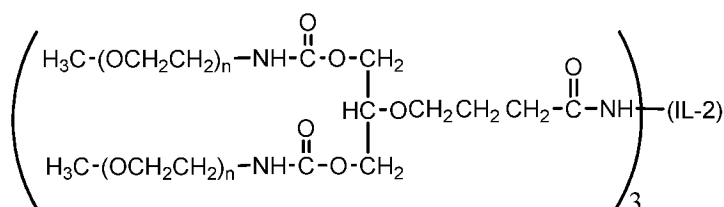
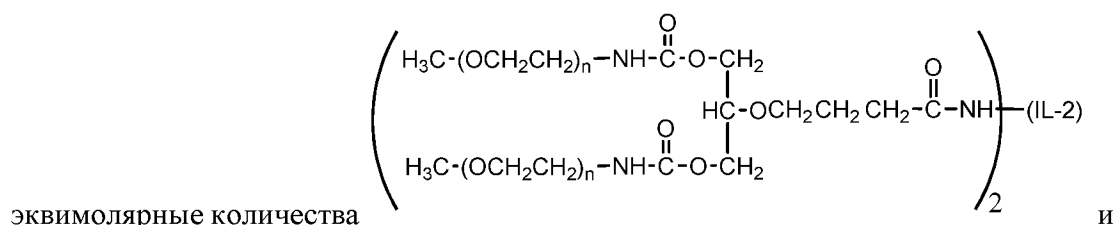
8. Композиция по любому из пп. 3-5, содержащая не более примерно 5 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 1.

9. Композиция по любому из пп. 3-8, содержащая не более чем примерно 10 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 4.

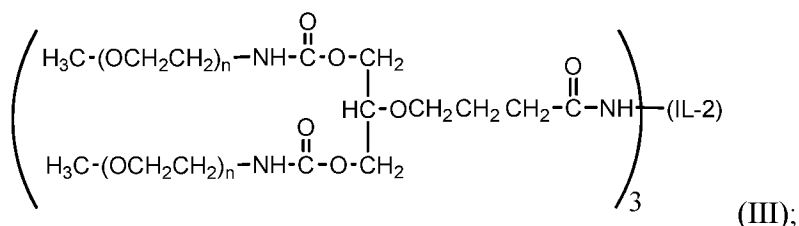
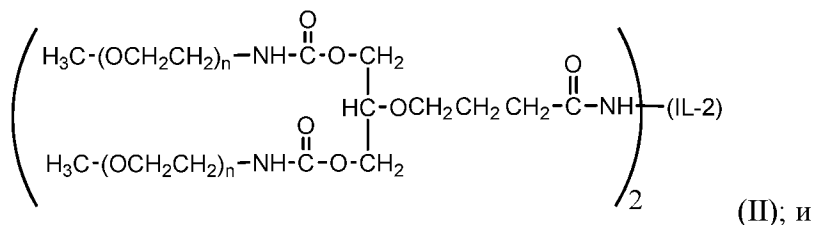
10. Композиция по любому из пп. 3-8, содержащая не более примерно 7 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n' , равный 4.

11. Композиция по любому из пп. 3-8, содержащая не более примерно 5 % мол. пегилированных конъюгатов IL-2, имеющих n', равный 4.

12. Композиция, содержащая смесь пегилированных конъюгатов IL-2 по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит приблизительно

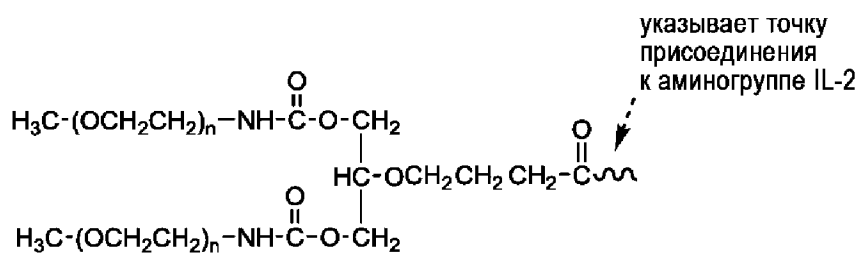


13. Композиция, содержащая смесь пегилированных конъюгатов IL-2 по п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит пегилированные конъюгаты IL-2 формулы



где молярное соотношение (II)/(III) выбирают из группы, состоящей из 1,4:1; 1,3:1; 1,2:1; 1,1:1; 1:1; 1:1,1; 1:1,2; 1:1,3; и 1:1,4.

14. Композиция по п. 13, имеющая среднее число разветвленных фрагментов полиэтиленгликоля,



15. , на алдеслейкин,
выбранное из группы, состоящей из 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; и 3.

16. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что среднее число разветвленных
фрагментов полиэтиленгликоля на алдеслейкин составляет примерно 2,5.

17. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что значение n находится в
диапазоне 5-2000.

18. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что значение n находится в
диапазоне 10-1000.

19. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что значение n находится в
диапазоне 10-750.

20. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что значение n находится в
диапазоне 10-500.

21. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что значение n находится в
диапазоне 20-250.

22. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что среднее значение n
составляет примерно 226.

23. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что номинальная средняя
молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится
в диапазоне от примерно 250 дальтон до примерно 90000 дальтон.

24. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 1000 дальтон до примерно 60000 дальтон.
- 5 25. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 5000 дальтон до примерно 60000 дальтон.
- 10 26. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля находится в диапазоне от примерно 10000 дальтон до примерно 55000 дальтон.
- 15 27. Композиция по п. 1 или 2, содержащая, на молярной основе, примерно 5 % мол. или менее монопегилированных конъюгатов PL-2 и от примерно 28 % мол. до примерно 60 % мол. дипегилированных конъюгатов PL-2, и от примерно 24 % мол. до примерно 65 % мол. трипегилированных конъюгатов PL-2 и примерно 12 % мол. или менее конъюгатов PL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.
- 20 28. Композиция по п. 26, которая дополнительно содержит 80% или более объединенных ди- и трипегилированных конъюгатов PL-2.
- 25 29. Композиция по п. 1 или 2, содержащая, на молярной основе, от примерно 2,5 до примерно 4,5 % мол. монопегилированных конъюгатов PL-2, и от примерно 35 до примерно 50 % мол. дипегилированных конъюгатов PL-2, и от примерно 38 до примерно 46 % мол. трипегилированных конъюгатов PL-2, и от примерно 3 до примерно 10 % мол. конъюгатов PL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента
- 30 полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.
30. Композиция по п. 28, дополнительно содержащая, в общей сложности, от примерно 80 до примерно 95 % мол. дипегилированных и трипегилированных конъюгатов PL-2.

31. Композиция по п. 1 или 2, содержащая, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.
32. Композиция по п. 30, которая дополнительно содержит, в общей сложности, от примерно 87 до примерно 90 % мол. дипегилированных и трипегилированных конъюгатов IL-2.
33. Композиция по п. 1 или 2, содержащая, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом указанная композиция содержит смесь монопегилированных конъюгатов IL-2, имеющих фрагмент ПЭГ, присоединенный по одному из лизинов K7, K8, K31 или K75, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.
34. Композиция по п. 32, которая дополнительно содержит, в общей сложности, от примерно 87 до примерно 90 % мол. дипегилированных и трипегилированных конъюгатов IL-2.
35. Композиция по п. 1 или 2, содержащая, на молярной основе, от примерно 2,8 до примерно 3,8 % мол. монопегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 44 до примерно 48 % мол. дипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 41 до примерно 44 % мол. трипегилированных конъюгатов IL-2, и от примерно 7 до примерно 9 % мол. конъюгатов IL-2 с более высокой степенью пегилирования, и при этом указанная композиция содержит конъюгаты монопегилированного IL-2, которые

имеют фрагмент ПЭГ, присоединенный к лизину К7, и при этом номинальная средняя молекулярная масса каждого разветвленного фрагмента полиэтиленгликоля составляет примерно 20000 дальтон.

- 5 36. Композиция по п. 34, которая дополнительно содержит, в общей сложности, от примерно 87 до примерно 90 % мол. дипегилированных и трипегилированных конъюгатов IL-2.
- 10 37. Композиция по любому из пп. 1-35, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.
38. Композиция по любому из пп. 1-35 в форме, подходящей для парентерального введения.
- 15 39. Композиция по любому из пп. 1-35 в форме, подходящей для подкожного введения.
40. Композиция по п. 36, содержащая водный разбавитель.
41. Композиция по п. 39, имеющая рН около 5.
- 20 42. Композиция по п. 39 или п. 40, дополнительно содержащая ацетат натрия, хлорид натрия и сахарозу.
- 25 43. Композиция по п. 37, содержащая 1,5 мг/мл белкового эквивалента, 10 мМ ацетата натрия, 110 мМ хлорида натрия, 2% сахарозы (мас./об.), рН 5,0.
- 30 44. Способ повышения соотношения регуляторных Т-клеток к эффекторным Т-клеткам у субъекта путем введения субъекту терапевтически эффективной дозы композиции по любому из пп. 1-42.
45. Способ по п. 43, отличающийся тем, что указанные регуляторные Т-клетки выбирают из клеток Foxp3⁺ и CD25⁺.

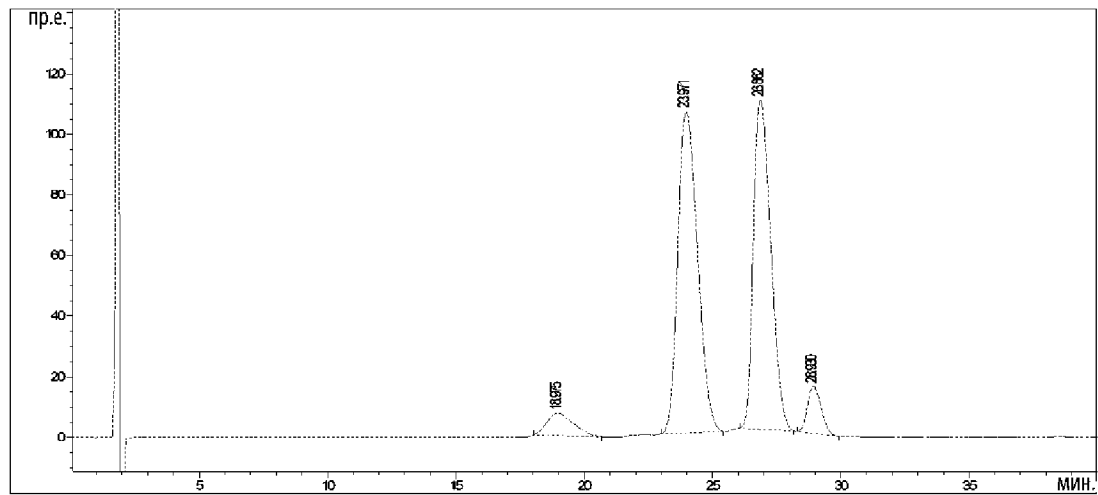
46. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанные эффекторные Т-клетки выбирают из клеток CD4+ и CD8+.
- 5 47. Способ по любому из пп. 43-45, отличающийся тем, что кратность повышения регуляторных Т-клеток по сравнению с исходным уровнем достигает значения, равного по меньшей мере примерно 2, при оценке на мышинной модели *in vivo*.
- 10 48. Способ по любому из пп. 43-45, отличающийся тем, что кратность повышения регуляторных Т-клеток по сравнению с исходным уровнем достигает значения, равного по меньшей мере примерно 4, при оценке на мышинной модели *in vivo*.
- 15 49. Способ по любому из пп. 43-47, отличающийся тем, что увеличение количества регуляторных Т-клеток поддерживается выше базового уровня в течение по меньшей мере 3 дней после введения.
50. Способ по п. 43, отличающийся тем, что увеличение количества регуляторных Т-клеток поддерживается выше базового уровня в течение по меньшей мере 5 дней после введения.
- 20 51. Способ лечения субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-42.
- 25 52. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанное введение осуществляется путем подкожной инъекции.
53. Способ по любому из пп. 50-51, отличающийся тем, что указанное введение проводят один раз в 2 недели или один раз в 4 недели.
- 30 54. Способ по любому из пп. 50-52, отличающийся тем, что указанное введение включает дозу от 3 до 24 мкг/кг один раз в две недели.

55. Композиция по любому из пп. 1-42 для применения в терапии.

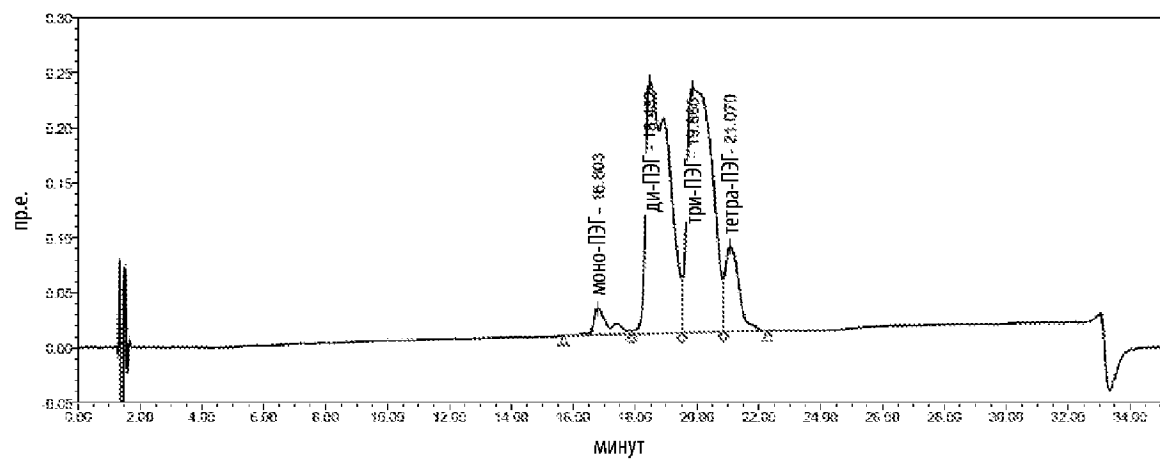
56. Композиция по любому из пп. 1-42 для применения при лечении аутоиммунного заболевания.

5

57. Применение композиции по любому из пп. 1-42 для производства лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания.



Фиг. 1А



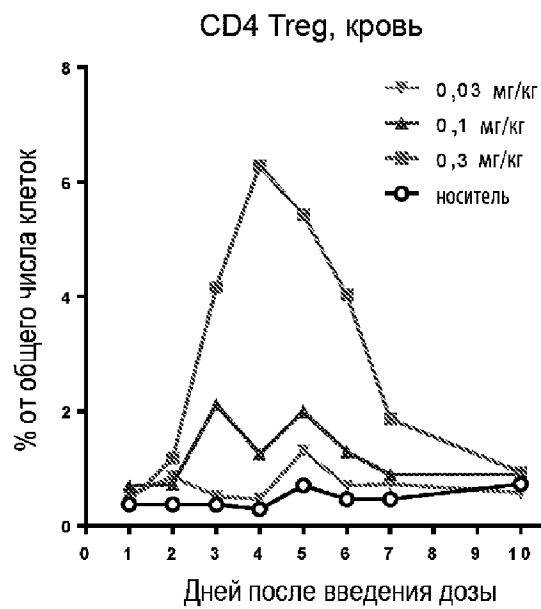
Фиг. 1В

X21700 (PCT)

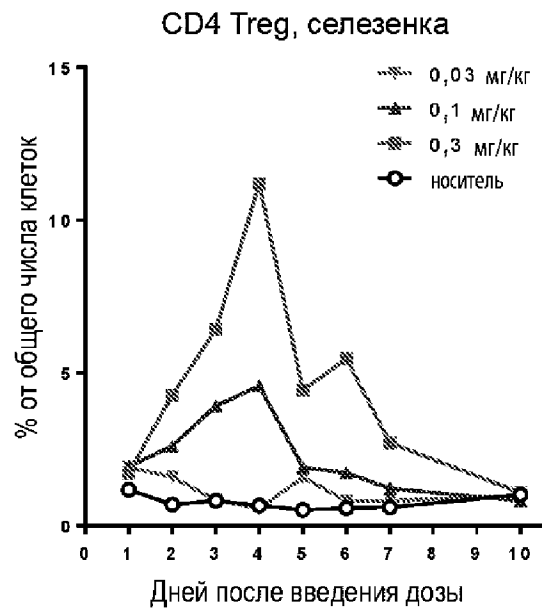
2/17

MPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE
TATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

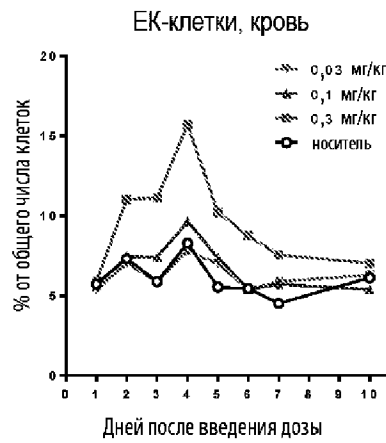
Фиг. 2



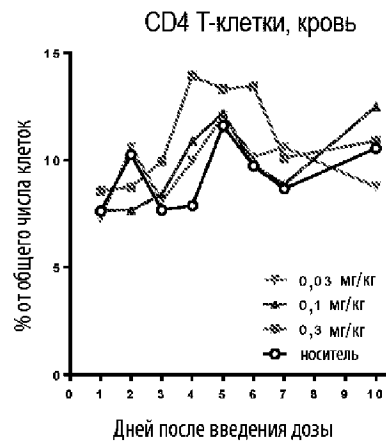
Фиг. 3А



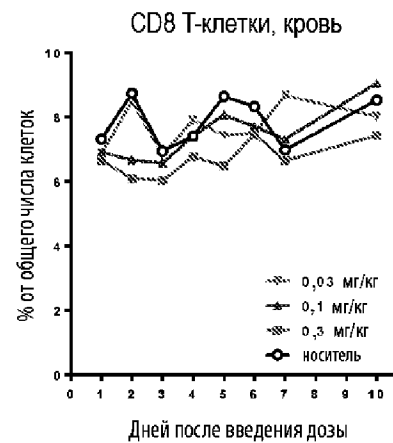
Фиг. 3В



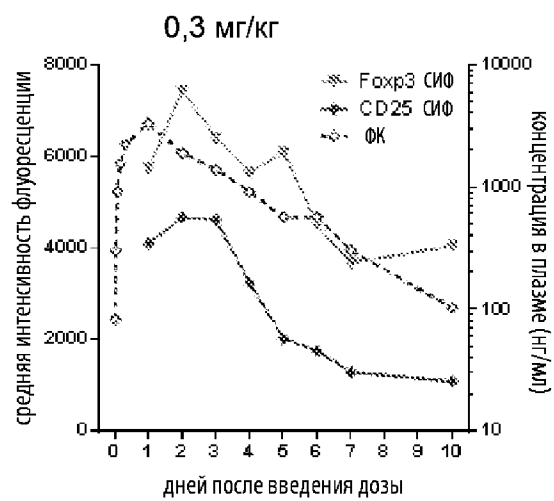
Фиг. 4А



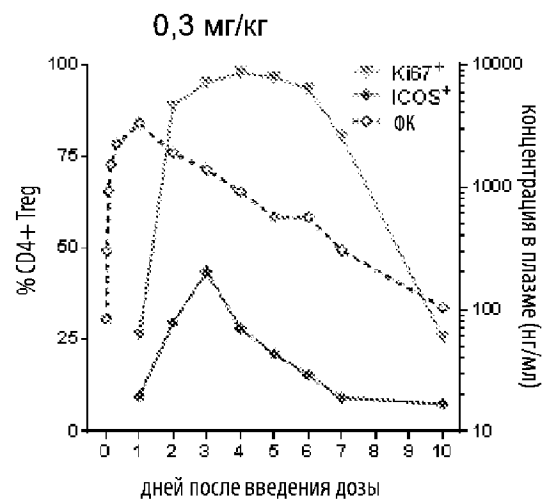
Фиг. 4В



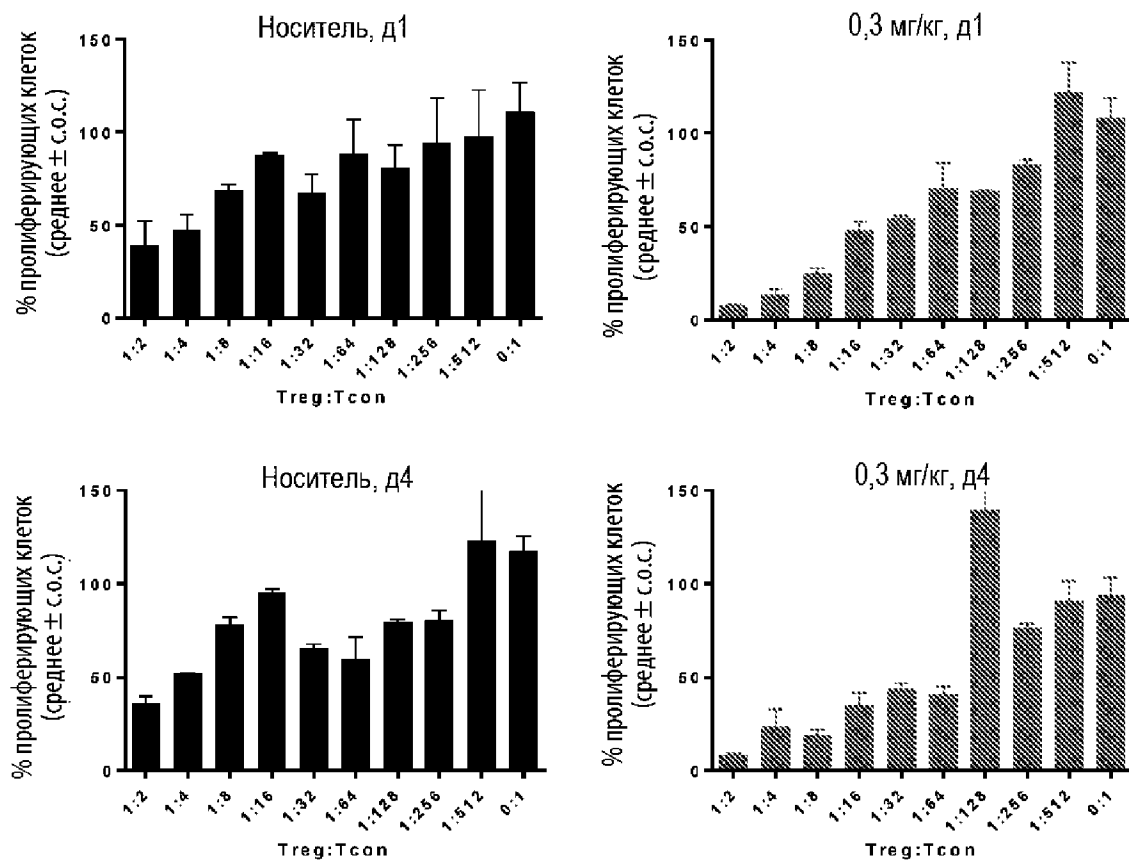
Фиг. 4С



Фиг. 5А

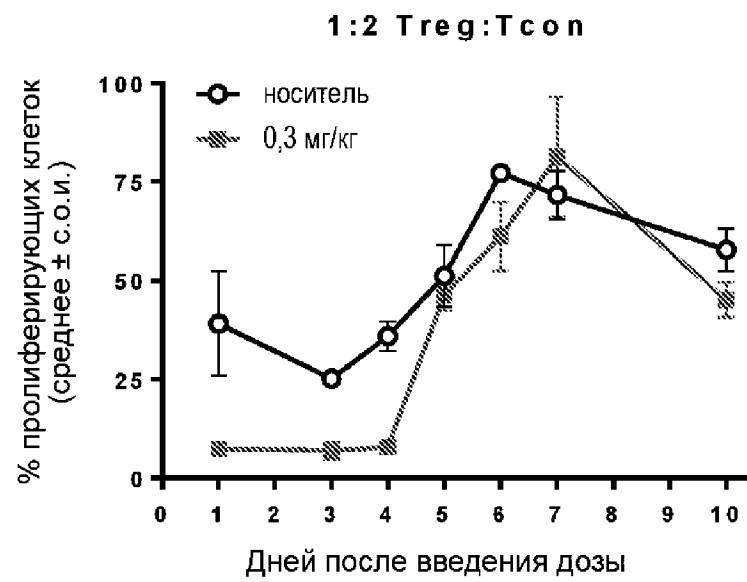


Фиг. 5В

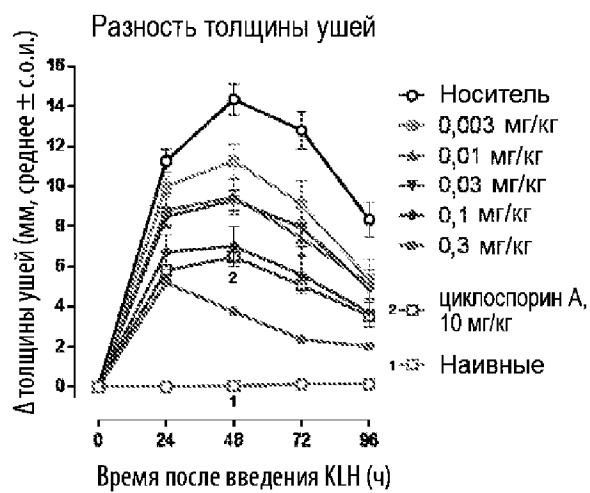


Фиг. 6А-6В (верхний ряд)

Фиг. 6С-6D (нижний ряд)



Фиг. 7

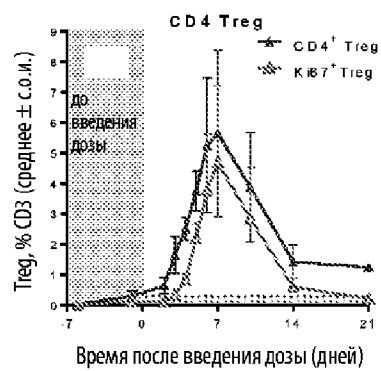


Фиг. 8А

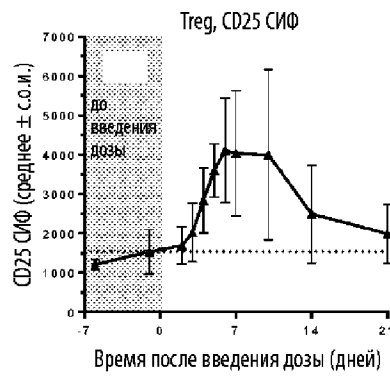


Фиг. 8В

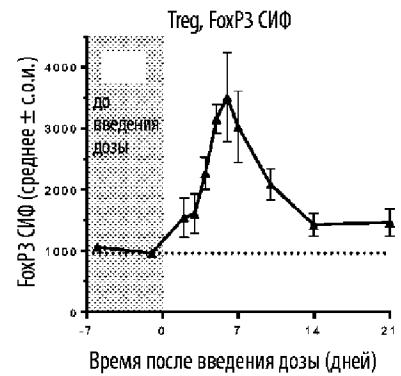
9/17



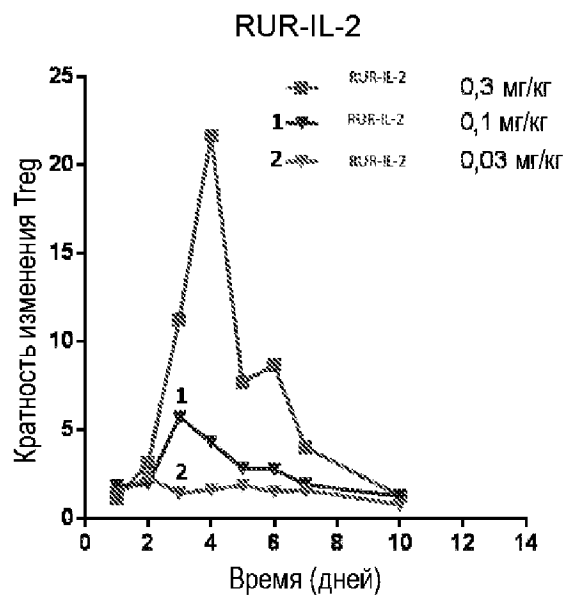
Фиг. 9А



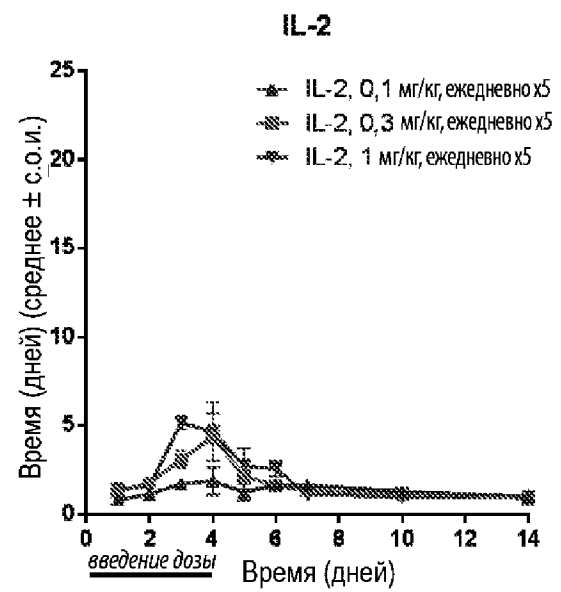
Фиг. 9В



Фиг. 9С

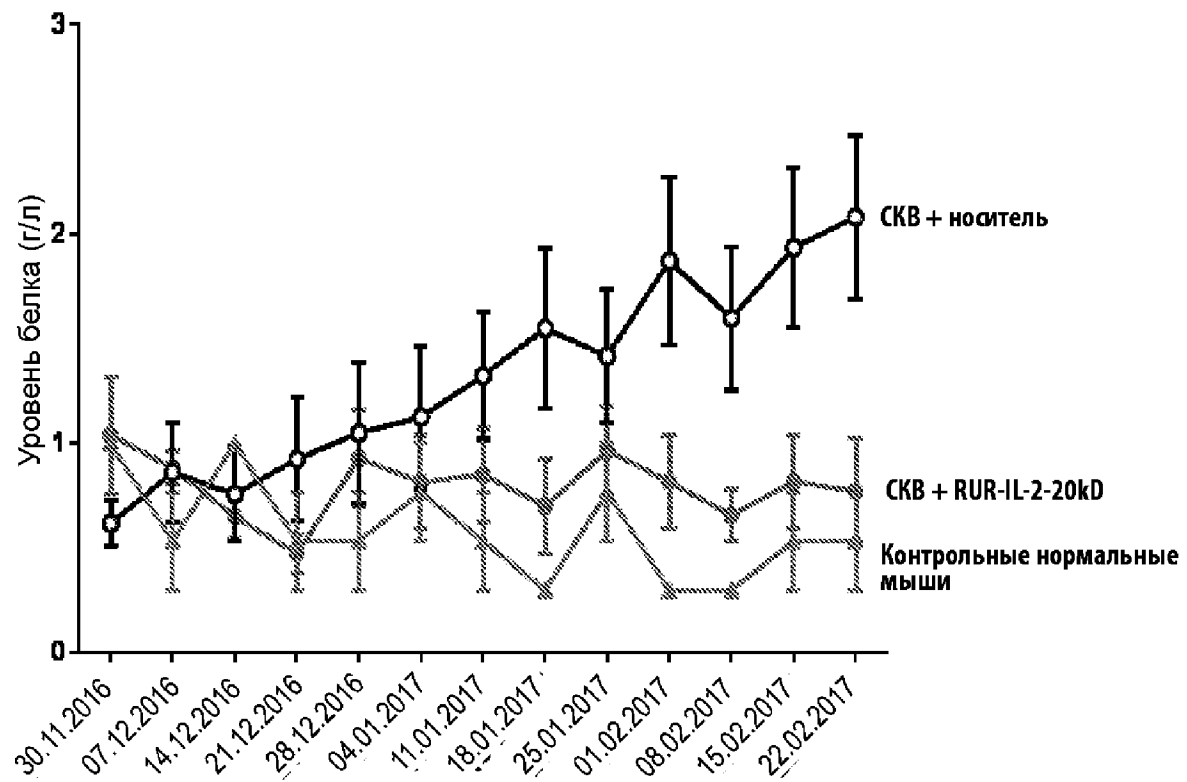


Фиг. 10А

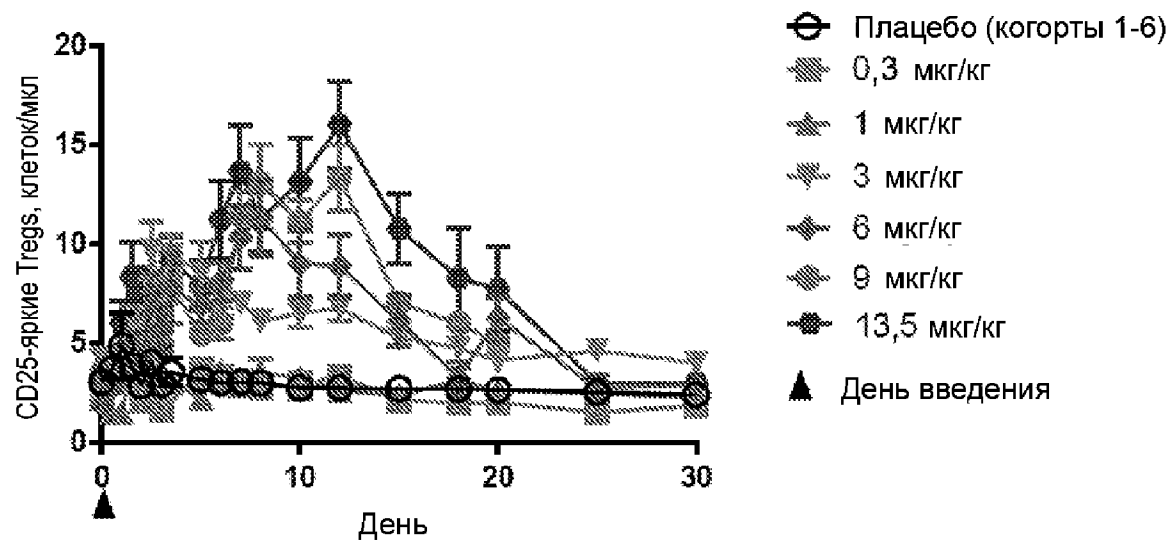


Фиг. 10В

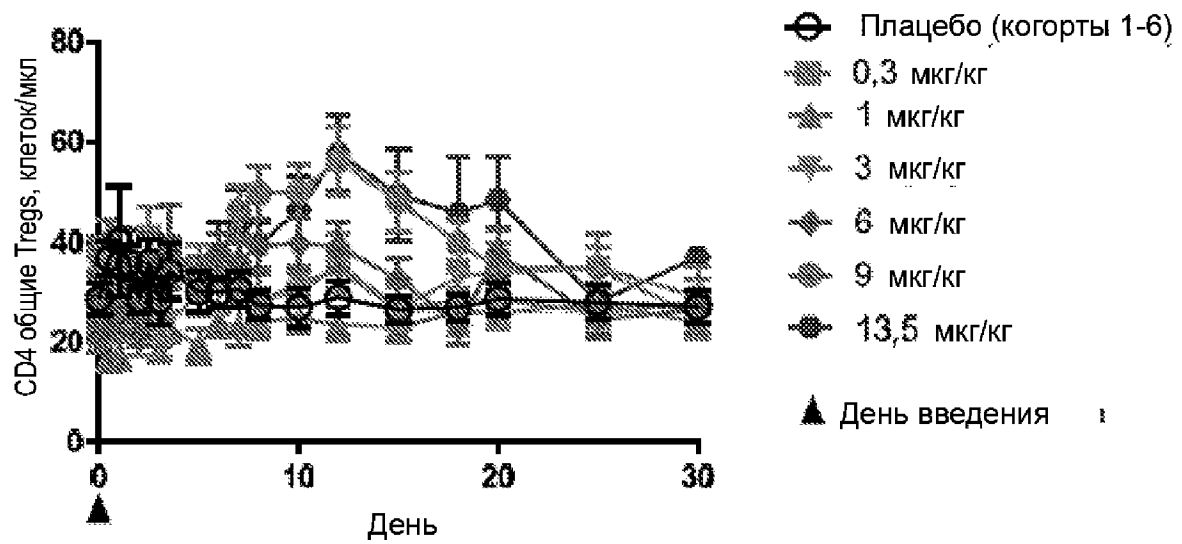
11/17



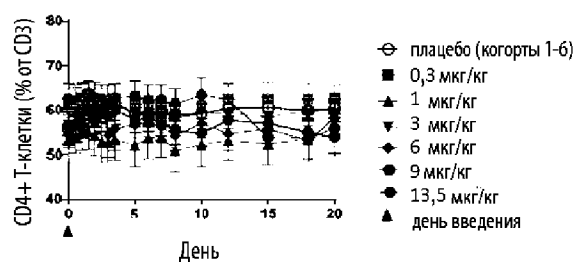
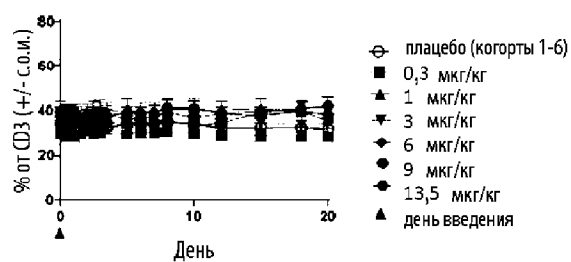
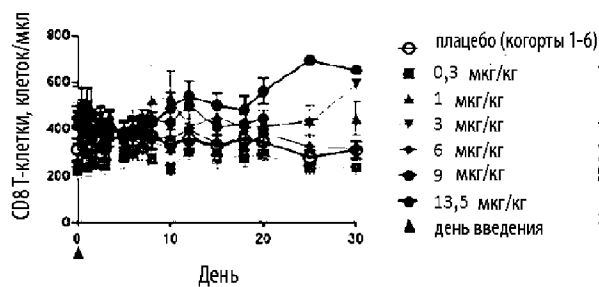
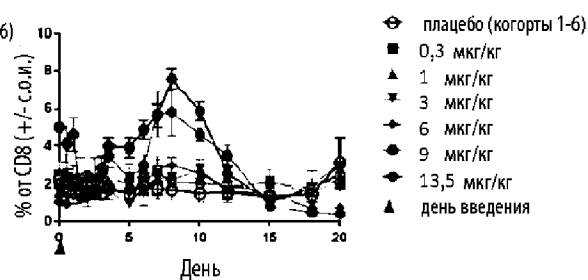
Фиг. 11



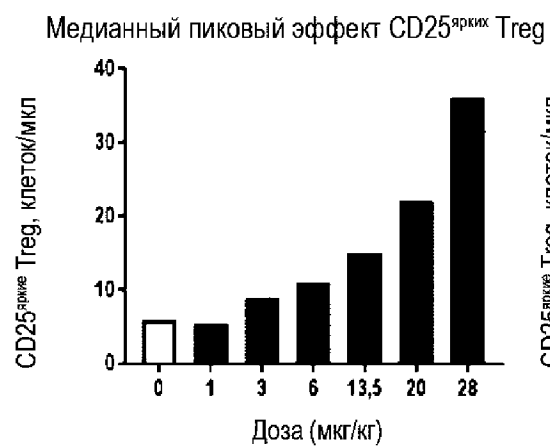
Фиг. 12



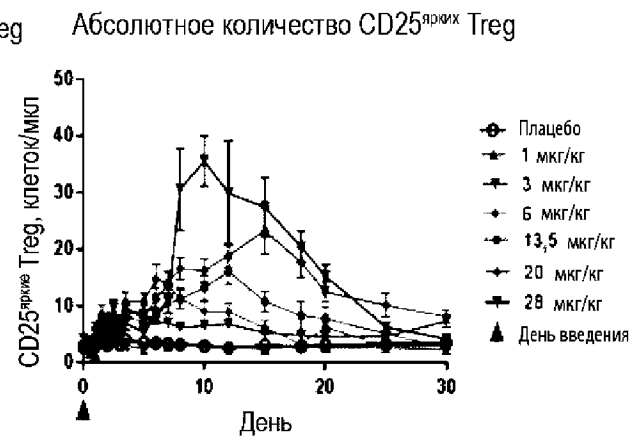
Фиг. 13

CD4+ T-клетки (% от CD3):**CD8+ T-клетки (% от CD3):****CD8+ T-клетки (клеток/мкл):****% Ki67+ CD8+ T-клетки (% от CD8):**

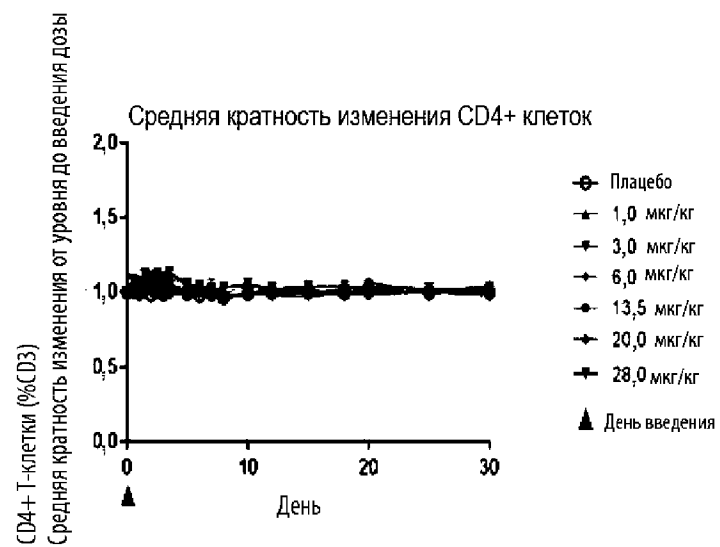
Фиг. 14а-в (верхний ряд)
Фиг. 14с-д (нижний ряд)



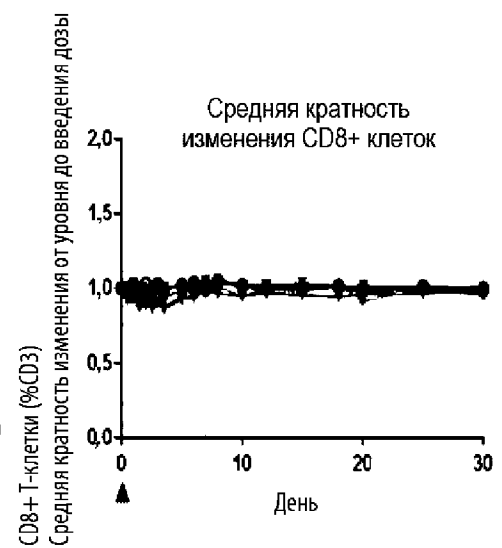
Фиг. 15А



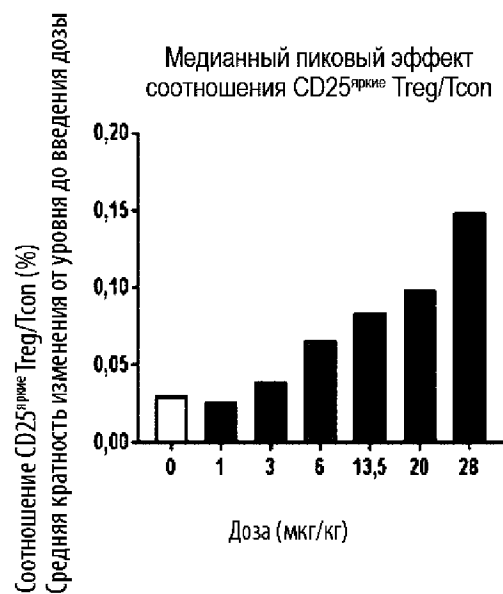
Фиг. 15В



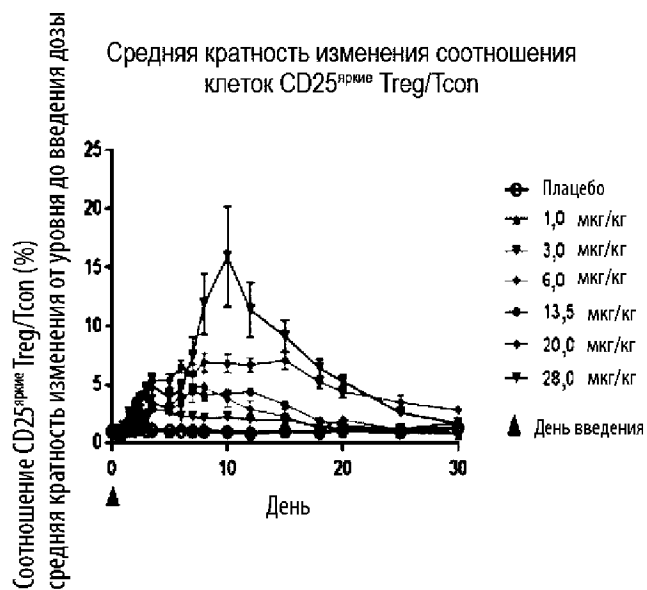
Фиг. 16А



Фиг. 16В



Фиг. 17А



Фиг. 17В