

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291674 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.10.12

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)  
C07K 14/55 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.17

(54) ДВОЙНОЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2/TNF ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

(31) 62/949,380

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.17

Чаудри Ашутosh, Оуян Вэньцзюнь  
(US)

(33) US

(86) PCT/US2020/065734

(74) Представитель:

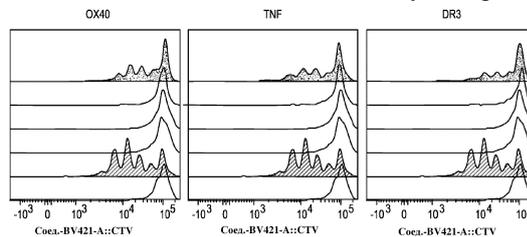
(87) WO 2021/127262 2021.06.24

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) В данном документе представлены комбинации молекулы или мутеина IL-2 и агониста TNFR и комплексы, содержащие молекулы агониста IL-2/TNFR, такого как Fc-связанные молекулы агониста IL-2/TNFR, которые предпочтительно приводят к экспансии и активации регуляторных T-клеток и пригодны для крупномасштабного производства. Также в данном документе представлены способы получения и применения композиций по настоящему изобретению.



202291674

A1

A1

202291674

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574463EA/032

### ДВОЙНОЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2/TNF ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

#### ПРЕДПОСЫЛКИ

Регуляторные Т-клетки (Treg), характеризующиеся экспрессией фактора транскрипции Foxp3, представляют собой субпопуляцию CD4 Т-клеток, целью которых является сдерживание активации и ответов иммунных клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Делеция или мутации с потерей функции в гене Foxp3 в результате приводят к аутоиммунному нарушению с ранним началом, называемому IPЕХ (Х-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии) как у людей, так и у мышей, которое проявляется во многих органах и часто приводит к летальному исходу. Самопроизвольное нарушение регуляции различных типов воспалительных ответов у животных с дефицитом Foxp3 свидетельствует о том, что клетки Treg необходимы для поддержания нормального иммунного гомеостаза. Некоторые аутоиммунные нарушения у людей, такие как диабет I типа (T1D), рассеянный склероз (MS) и системная красная волчанка (SLE), проявляется в виде дефицитов либо количества, либо супрессорной функции клеток Treg, выделенных из периферической крови. Поскольку клетки Treg могут доминирующе влиять на иммунные ответы, положительное целенаправленное воздействие на их количество, функцию или стабильность при аутоиммунной реакции представляет собой перспективный терапевтический подход.

Поддержание клеток Treg является критически зависимым от двух основных сигнальных путей: передача сигнала Т-клеточного рецептора (TCR) и передача сигнала рецептора IL-2; то есть в отсутствии любого из этих сигнальных путей гомеостаз и функционирование клеток Treg сильно нарушаются. По сравнению с другими клетками клетки Treg экспрессируют повышенные уровни высокоаффинной субъединицы рецептора IL-2 (IL-2R $\alpha$ , CD25). Согласно гипотезе, что IL-2 представляет собой ключевой цитокин для дифференцировки, выживаемости и функционирования клеток Treg, во многих исследованиях пытались определить, обладает ли избирательное целенаправленное воздействие на этот путь терапевтическим потенциалом. В клинических условиях оценивали IL-2 в низкой дозе для лечения ряда воспалительных заболеваний, таких как хроническая реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), T1D, а также SLE; при этом в ходе его применения было продемонстрировано увеличение количества клеток Treg вместе с одновременным снижением активности заболевания. Поэтому требуются улучшенные способы повышения количества Treg.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе описаны химерная молекула человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащая полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной

последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агонист рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), выбранный из группы, состоящей из комплексов антитела к OX40, антитела к DR3 и TNF, которые можно изготавливать с высоким выходом, и они характеризуются фармакологической активностью. При попытке получить такие молекулы для применения в качестве терапевтических средств для лечения человека произошел ряд неожиданных и непредсказуемых наблюдений. Композиции и способы, описанные в данном документе, представляют собой результат этой попытки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен Fc-слитый белок, содержащий Fc, полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агонист рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), выбранный из группы, состоящей из антитела к OX40, антитела к DR3 и TNF.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, при этом указанный способ предусматривает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества химерной молекулы человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащей полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агониста рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), выбранного из группы, состоящей из комплексов антитела к OX40, антитела к DR3 и TNF, или Fc-слитого белка, содержащего Fc, полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агониста фактора некроза опухоли (TNFR), выбранного из группы, состоящей из антитела к OX40, антитела к DR3 и TNF.

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

На фигуре 1 показана пролиферация Treg при стимуляции посредством IL-2 в комбинации с агонистом TNFR (антитело к OX40, рекомбинантный TNF или антитело к DR3). (A) PBMC, меченные CellTrace™ Violet (CTV), стимулировали с использованием указанных реагентов в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы размещены в следующем порядке (снизу вверх): нестимулированные, стимулированные с помощью 1 мкг/мл антитела к CD3, 20 ЕД/мл IL-2, IgG, агониста TNFR (антитела к OX40, рекомбинантного TNF, антитела к DR3), агониста TNFR с IL-2. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Только на графиках с положительным контролем к CD3 и комбинацией агониста TNFR (антитела к OX40, рекомбинантного TNF и антитела к DR3) была продемонстрирована пролиферация Treg.

На фигуре 2 показаны гистограммы для PBMC, стимулированных антителом к OX40 и IL-2. (A) PBMC человека, меченные CTV, стимулировали с помощью указанных

титрующих доз антитела к ОХ40 (клон 15А9) в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Клетки, стимулированные с помощью CD3, демонстрируют стабильную пролиферацию и служат в качестве положительного контроля для анализа. Стимуляция с помощью IL2 или контрольного IgG не приводит к какому-либо ослаблению интенсивности окрашивания СTV. Пролиферация отсутствовала в случае какой-либо из указанных доз только антитела к ОХ40. Однако комбинированная стимуляция с применением антитела к ОХ40 и IL2 приводит к пролиферации клеток Treg, что видно по ослаблению интенсивности окрашивания СTV. (В) Обобщенные данные из (А). На графиках показаны три повторности от одного донора для каждого состояния. Также оценивали Т-клеточный ответ на указанные стимуляции, и только очень низкие уровни пролиферации Т-клеток наблюдались при более высоких дозах обработки антителом к ОХ40/IL2.

На фигуре 3 показаны гистограммы для РВМС, стимулированных TNF и IL-2. (А) РВМС человека, меченные СTV, стимулировали с помощью указанных титрующих доз TNF в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Пролиферация отсутствовала в случае какой-либо из указанных доз только TNF. Однако комбинированная стимуляция посредством TNF и IL2 приводит к пролиферации клеток Treg, что видно по ослаблению интенсивности окрашивания СTV. (В) Обобщенные данные из (А). На графиках показаны три повторности от одного донора для каждого состояния. Также оценивали Т-клеточный ответ на указанные стимуляции, и только очень низкие уровни пролиферации Т-клеток наблюдались при всех дозах обработки с помощью TNF/IL2.

На фигуре 4 показаны гистограммы для РВМС, стимулированных антителом к DR3 и IL-2. (А) РВМС человека, меченные СTV, стимулировали с помощью указанных титрующих доз антитела к DR3 в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Пролиферация отсутствовала в случае какой-либо из указанных доз только антитела к DR3. Однако комбинированная стимуляция посредством антитела к DR3 и IL2 приводит к пролиферации клеток Treg. (В) Обобщенные данные из (А). На графиках показаны три повторности от одного донора для каждого состояния. Также оценивали Т-клеточный ответ на указанные стимуляции, и только очень низкие уровни пролиферации Т-клеток наблюдались при всех дозах обработки антителом к DR3/IL2.

На фигуре 5 показаны гистограммы для РВМС, стимулированных GITR и IL-2. (А) РВМС человека, меченные СTV, стимулировали с помощью указанных титрующих доз антитела к GITR в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Очень низкий уровень пролиферации Т-клеток наблюдали при использовании только антитела к GITR. Однако комбинированная стимуляция посредством антитела к GITR и IL2 приводит к более выраженной пролиферации клеток Treg. (В) Обобщенные данные из (А). На

графиках показаны три повторности от одного донора для каждого состояния. Также оценивали Т-клеточный ответ на указанные стимуляции, и только умеренные уровни пролиферации Т-клеток наблюдались при всех дозах обработки антителом к GITR/IL2.

На фигуре 6 показана диаграмма для химерного антитела к OX-40 и молекул IL-2 в нескольких различных форматах.

На фигуре 7 показаны исследования на мышах *in vivo* с использованием антитела к OX-40 со связанными с ним молекулами IL-2 для измерения уровней Treg, активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток и клеток NK, измеренных в день 4 и день 15. Исследования демонстрируют, что мышам вводили только IL-2, только антитело к OX-40 или химерную молекулу, а также контроль.

### **Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления**

Используемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект настоящего изобретения. Все приведенные в тексте данного описания литературные источники включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования и трансформации тканей, очистки белков и т. д. можно применять стандартные методики. Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии с описаниями производителя или так, как это обычно делается в уровне техники, или как описано в данном документе. Следующие процедуры и методики обычно можно осуществлять в соответствии с обычными способами, хорошо известными из уровня техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые приводятся и рассматриваются в описании. См., например, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. Если не предусмотрены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, органической химии, медицинской и фармацевтической химии, описанными в данном документе, хорошо известна и обычно используется в уровне техники. Стандартные методики можно применять для химического синтеза, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

IL-2 связывает три субъединицы трансмембранного рецептора: IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ , которые совместно активируют внутриклеточные события передачи сигнала при связывании IL-2, и CD25 (IL-2R $\alpha$ ), который служит для стабилизации взаимодействия между IL-2 и IL-2R $\beta\gamma$ . Сигналы, обеспечиваемые IL-2R $\beta\gamma$ , включают сигналы путей PI3-киназы, Ras-МАР-киназы и STAT5.

Т-клеткам требуется экспрессия CD25 для ответа на низкие концентрации IL-2, которые обычно присутствуют в тканях. Т-клетки, которые экспрессируют CD25, включают FOXP3<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (клетки Treg), которые необходимы для

подавления аутоиммунного воспаления, и FOXP3- T-клетки, которые активируются для экспрессии CD25. FOXP3- CD25+ эффекторные T-клетки (Teff) могут быть либо клетками CD4+, либо клетками CD8+, при этом обе субпопуляции клеток могут способствовать развитию воспаления, возникновению аутоиммунной реакции, отторжению трансплантированных органов или реакции "трансплантат против хозяина". Стимулированная IL-2 передача сигналов с участием STAT5 является критической для нормального роста и выживания клеток T-reg и для высокой экспрессии FOXP3.

Было установлено, что в равновесном состоянии по сравнению с другими иммунными клетками клетки Treg также экспрессируют более высокие поверхностные уровни некоторых представителей семейства рецепторов TNF (фактора некроза опухоли), особенно TNFR2, OX40, GITR, 4-1BB, CD30 и DR3. Экспрессия данных рецепторов TNF, в частности OX40, GITR и TNFR2, на клетках Treg непосредственно коррелирует с силой передачи сигнала TCR, и было показано, что эти рецепторы усиливают развитие клеток Treg в тимусе за счет повышения чувствительности к IL-2, а также посредством обеспечения костимулирующего сигнала. Передача сигнала IL-2 также влияет на экспрессию этих TNFR. В данном исследовании авторы настоящего изобретения выявили синергизм двух этих путей.

Влияние передачи сигнала TNFR в клетках Treg на периферии менее изучено, поскольку ее модуляция приводила к различным эффектам. Например, вовлечение OX40 на клетках Treg приводило к потере экспрессии Foxp3 и снижению функционированию клеток Treg, тогда как передача сигнала TNFR2 связана с поддержанием количества и функции клеток Treg. В настоящем изобретении показано, что комбинирование агонистов TNFR, таких как TNFR2, GITR, OX40 и DR3, со стимуляцией IL-2 повышает пролиферацию клеток Treg. Поскольку экспрессия лигандов TNFR обычно повышается за счет антигенпрезентирующих клеток после восприятия воспалительных сигналов и IL-2 секретируется T-клетками при активации, они могут взаимодействовать с обеспечением устойчивой экспансии клеток Treg в ходе процесса воспаления. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению представлена химерная слитая молекула на основе агонистов TNFR и IL-2, которая может быть селективным средством для экспансии клеток Treg. В некоторых вариантах осуществления химерная молекула связана с Fc-молекулой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ увеличения количества Treg за счет совместного введения агониста TNFR и молекулы или мутеина IL-2.

## **IL-2**

Молекулы IL-2, описанные в данном документе, включают дикий тип и варианты человеческого IL-2 дикого типа. Используемый в данном документе термин "человеческого IL-2 дикого типа", "IL-2 WT" или "IL-2 дикого типа" обозначает полипептид, характеризующийся следующей аминокислотной последовательностью:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK  
HLQCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV

EFLNRWITFXQSIISTLT,

где X представляет собой C, S, V или A (SEQ ID NO:1).

Варианты могут содержать одну или несколько замен, делеций или вставок в аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа и включать варианты на основе мутеина IL-2, описанные в WO2010085495, WO2014153111, WO2016164937, PCT/US2020/046202, WO1999060128, WO2002000243, WO2012107417, WO2005086798, WO2005086751 и WO2006089064, которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративный пример мутеина IL-2 содержит мутацию V91K, характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFYMPKKATELK  
HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIV  
EFLNRWITFXQSIISTLT,

где X представляет собой C, S, V или A (SEQ ID NO:2).

Остатки обозначаются в данном документе однобуквенным кодом аминокислоты, за которым следует положение аминокислоты IL-2, например, K35 представляет собой остаток лизина в положении 35 SEQ ID NO: 2. Замены обозначаются в данном документе однобуквенным аминокислотным кодом, за которым следует положение аминокислоты IL-2, за которым следует замещающий однобуквенный аминокислотный код, например K35A представляет собой замену остатка лизина в положении 35 в SEQ ID NO:2 остатком аланина.

### **Мутеины IL-2**

В данном документе представлены молекулы и мутеины человеческого IL-2, которые в комбинации с агонистами TNFR преимущественно стимулируют регуляторные Т-клетки (Treg). Используемый в данном документе термин "преимущественно стимулирует регуляторные Т-клетки" означает, что мутеин или антитело способствует пролиферации, выживанию, активации и/или осуществлению функции CD3+FoxP3+ Т-клеток по сравнению с CD3+FoxP3- Т-клетками. Способы измерения способности преимущественно стимулировать Treg могут быть измерены посредством проточной цитометрии лейкоцитов периферической крови, в которой наблюдается повышение процентного содержания FOXP3+CD4+ Т-клеток среди всех CD4+ Т-клеток, повышение процентного содержания FOXP3+CD8+ Т-клеток среди всех CD8+ Т-клеток, повышение процентного содержания FOXP3+ Т-клеток по сравнению с NK-клетками и/или более высокое повышение уровня экспрессии CD25 на поверхности FOXP3+ Т-клеток по сравнению с повышением экспрессии CD25 на других Т-клетках. Предпочтительный рост клеток Treg также может быть обнаружен в виде повышенной представленности деметилированной ДНК промотора FOXP3 (т. е. Treg-специфической деметилированной области или TSDR) по сравнению с деметилированными генами CD3 в ДНК, выделенной из цельной крови, как обнаруживается посредством секвенирования при полимеразной цепной реакции (ПЦР) продуктов обработанной бисульфитом геномной ДНК (J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

Молекулы и мутеины IL-2, которые в комбинации с агонистами TNFR преимущественно стимулируют клетки Treg, повышают отношение CD3+FoxP3+ Т-клеток к CD3+FoxP3- Т-клеткам у субъекта или в образце периферической крови на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 900% или по меньшей мере 1000%.

Иллюстративные примеры мутеинов IL-2 включают без ограничения мутеины IL-2, содержащие замену(замены) V91K, N30S, N30D, Y31H, Y31S, K35R, V69A, Q74P, V91K/D20L, D84R/E61Q, V91K/D20A/E61Q/M104T, N88K/M104L, V91H/M104L, V91K/H16E/M104V, V91K/H16R/M104V, V91K/H16R/M104T, V91K/D20A/M104T, V91K/H16E/M104T, V91K/H16E/E61Q/M104T, V91K/H16R/E61Q/M104T, V91K/H16E, V91H/D20A/M104T, H16E/V91H/M104V, V91H/D20A/E61Q/M104T, V91H/H16R/E16Q, V91K/D20A/M104V, H16E/V91H, V91H/D20A/M104V, H16E/V91H/M104T, H16E/V91H/E61Q/M104T, V91K/E61Q/H16E, V91K/H16R/M104L, H16E/V91H/E16Q, V91K/E61Q/H16R, D20W/V91K/E61Q, V91H/H16R, V91K/H16R, D20W/V91K/E61Q/M104T, V91K/D20A, V91H/D20A/E16Q, V91K/D20A/M104L, V91H/D20A, V91K/E61Q/D20A, V91H/M104T, V91H/M104V, V91K/E61Q, V91K/N88K/E61Q/M104T, V91K/N88K/E61Q, V91H/E61Q, V91K/N88K, D20A/H16E/M104T, D20A/M104T, H16E/N88K, D20A/M104V, D20A/M104L, H16E/M104T, H16E/M104V, N88K/M104V, N88K/E61Q, D20A/E61Q, H16R/D20A, D20W/E61Q, H16E/E61Q, H16E/M104L, N88K/M104T, D20A/H16E, D20A/H16E/E16Q, D20A/H16R/E16Q, V91K/D20W, V91A/H16A, V91A/H16D, V91A/H16E, V91A/H16S, V91E/H16A, V91E/H16D, V91E/H16E, V91E/H16S, V91K/H16A, V91K/H16D, V91K/H16S, V91S/H16E, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, N30S, Y31H, K35R, V69A, Q74P, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R и/или E95G в аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2. Молекулы и мутеины IL-2 по настоящему изобретению необязательно содержат замену C125A. Хотя и может быть предпочтительным уменьшение количества дополнительных мутаций в последовательности IL-2 дикого типа, в настоящем изобретении представлены мутеины IL-2, которые также содержат усечения и/или дополнительные вставки, делеции и/или замены в дополнение к замене(заменам) V91K, N30S, N30D, Y31H, Y31S, K35R, V69A, Q74P, V91K/D20L, D84R/E61Q, V91K/D20A/E61Q/M104T, N88K/M104L, V91H/M104L, V91K/H16E/M104V, V91K/H16R/M104V, V91K/H16R/M104T, V91K/D20A/M104T, V91K/H16E/M104T, V91K/H16E/E61Q/M104T, V91K/H16R/E61Q/M104T, V91K/H16E,

V91H/D20A/M104T, H16E/V91H/M104V, V91H/D20A/E61Q/M104T, V91H/H16R/E16Q, V91K/D20A/M104V, H16E/V91H, V91H/D20A/M104V, H16E/V91H/M104T, H16E/V91H/E61Q/M104T, V91K/E61Q/H16E, V91K/H16R/M104L, H16E/V91H/E16Q, V91K/E61Q/H16R, D20W/V91K/E61Q, V91H/H16R, V91K/H16R, D20W/V91K/E61Q/M104T, V91K/D20A, V91H/D20A/E16Q, V91K/D20A/M104L, V91H/D20A, V91K/E61Q/D20A, V91H/M104T, V91H/M104V, V91K/E61Q, V91K/N88K/E61Q/M104T, V91K/N88K/E61Q, V91H/E61Q, V91K/N88K, D20A/H16E/M104T, D20A/M104T, H16E/N88K, D20A/M104V, D20A/M104L, H16E/M104T, H16E/M104V, N88K/M104V, N88K/E61Q, D20A/E61Q, H16R/D20A, D20W/E61Q, H16E/E61Q, H16E/M104L, N88K/M104T, D20A/H16E, D20A/H16E/E16Q, D20A/H16R/E16Q, V91K/D20W, V91A/H16A, V91A/H16D, V91A/H16E, V91A/H16S, V91E/H16A, V91E/H16D, V91E/H16E, V91E/H16S, V91K/H16A, V91K/H16D, V91K/H16S, V91S/H16E, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, N30S, Y31H, K35R, V69A, Q74P, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R и E95G, при условии, что указанные мутеины сохраняют активность, предпочтительно имитирующую Treg. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представлены мутеины IL-2, которые предпочтительно имитируют клетки Treg и содержат аминокислотную последовательность с заменой V91K, N30S, N30D, Y31H, Y31S, K35R, V69A, Q74P, V91K/D20L, D84R/E61Q, V91K/D20A/E61Q/M104T, N88K/M104L, V91H/M104L, V91K/H16E/M104V, V91K/H16R/M104V, V91K/H16R/M104T, V91K/D20A/M104T, V91K/H16E/M104T, V91K/H16E/E61Q/M104T, V91K/H16R/E61Q/M104T, V91K/H16E, V91H/D20A/M104T, H16E/V91H/M104V, V91H/D20A/E61Q/M104T, V91H/H16R/E16Q, V91K/D20A/M104V, H16E/V91H, V91H/D20A/M104V, H16E/V91H/M104T, H16E/V91H/E61Q/M104T, V91K/E61Q/H16E, V91K/H16R/M104L, H16E/V91H/E16Q, V91K/E61Q/H16R, D20W/V91K/E61Q, V91H/H16R, V91K/H16R, D20W/V91K/E61Q/M104T, V91K/D20A, V91H/D20A/E16Q, V91K/D20A/M104L, V91H/D20A, V91K/E61Q/D20A, V91H/M104T, V91H/M104V, V91K/E61Q, V91K/N88K/E61Q/M104T, V91K/N88K/E61Q, V91H/E61Q, V91K/N88K, D20A/H16E/M104T, D20A/M104T, H16E/N88K, D20A/M104V, D20A/M104L, H16E/M104T, H16E/M104V, N88K/M104V, N88K/E61Q, D20A/E61Q, H16R/D20A, D20W/E61Q, H16E/E61Q, H16E/M104L, N88K/M104T, D20A/H16E, D20A/H16E/E16Q, D20A/H16R/E16Q, V91K/D20W, V91A/H16A, V91A/H16D, V91A/H16E, V91A/H16S, V91E/H16A, V91E/H16D, V91E/H16E, V91E/H16S, V91K/H16A, V91K/H16D, V91K/H16S, V91S/H16E, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, N30S, Y31H,

K35R, V69A, Q74P, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R и/или E95G и которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1. В особенно предпочтительных вариантах осуществления такие мутеины IL-2 содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1.

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют с применением стандартных методик, известных из уровня техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательности по Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательностей по Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, поиск по методу сходства по Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин, США), программу для последовательностей Best Fit, описанную в Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, предпочтительно с применением параметров по умолчанию, или посредством просмотра. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за введение гэпа 1; штраф за продолжение гэпа 0,33 и штраф за связывание 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером применимого алгоритма является PILEUP. С помощью PILEUP получают множественное выравнивание последовательностей на основании группы родственных последовательностей с применением последовательных попарных выравниваний. С его помощью также можно построить дерево, с помощью которого видны кластеризационные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение метода последовательного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; способ подобен тому, который описан в Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Применимые параметры PILEUP включают стандартный штраф за введение гэпа 3,00, стандартный штраф за удлинение гэпа 0,10 и оцениваемые концевые гэпы.

Другим примером применимого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*

25:3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особенно применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была создана Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используют несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены значения по умолчанию. Регулируемые параметры устанавливаются со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)= П. С целью выравнивания в заявляемом изобретении предпочтительно использовать эти параметры и BLAST в качестве алгоритма выравнивания. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут регулироваться для повышения чувствительности.

Дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с введением гэпов, о котором сообщается в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. В BLAST с введением гэпов используют показатели замены из BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двух хитов для запуска удлинений без введения гэпов задает удлинению гэта k значение  $10+k$ ;  $X_u$  установлен на 16, и  $X_g$  установлен на 40 для стадии поиска в базе данных и 67 для завершающей стадии алгоритмов. Выравнивания с гэпами запускаются с помощью показателя, соответствующего приблизительно 22 битам.

Хотя участок для введения варианта аминокислотной последовательности может быть определен предварительно, собственно мутация не нуждается в предварительном определении. Например, чтобы оптимизировать характеристики мутации в данном сайте, можно провести случайный мутагенез в кодоне- или участке-мишени и провести скрининг экспрессированного мутеина П-2 в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Хорошо известны методики осуществления мутаций с замещением в заранее заданных сайтах в ДНК с известной последовательностью, например, мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов можно проводить, например, с применением анализов, описанных в данном документе.

Аминокислотные замены обычно представляют собой одиночные остатки; вставки обычно будут составлять порядка от приблизительно одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя допускаются значительно более крупные вставки. Делеции варьируются от приблизительно одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут быть намного больше.

Замены, делеции, вставки или любая их комбинация могут быть использованы для получения конечного производного или варианта. Как правило, эти изменения осуществляются в отношении нескольких аминокислот для сведения к минимуму изменения молекулы, в частности, иммуногенности и специфичности антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах допустимы более крупные изменения. Консервативные замены обычно выполняют в соответствии со

следующей схемой, представленной в таблице 1.

**Таблица 1**

<b>Исходный остаток</b>	<b>Иллюстративные замены</b>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Существенные изменения в функции или иммунологической идентичности выполняют посредством выбора менее консервативных замен, чем показанные в таблице 1. Например, могут быть выполнены замены, которые более существенно влияют на: структуру полипептидного остова в области изменения, например, структуру альфа-спирали или бета-листа; заряд или гидрофобность молекулы на участке-мишени; или основную часть боковой цепи. Замены, которые в целом вызывают наибольшие изменения в свойствах полипептида, представляют собой те, в которых (а) гидрофильный остаток, например серил или треонил, заменен на гидрофобный остаток, например лейцил, изолейцил, фенилаланил, валил или аланил (или заменен им); (б) цистеин или пролин заменен на любой другой остаток (или заменен им); (в) остаток, содержащий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, заменен на электроотрицательный остаток, например глутамил или аспартил (или заменен им); или (д) остаток, содержащий объемную боковую цепь, например фенилаланин, заменен на остаток, не содержащий боковой цепи, например глицин (или заменен им).

Варианты обычно характеризуются такой же качественной биологической

активностью и будут вызывать такой же иммунный ответ, как и встречающийся в природе аналог, хотя варианты также отбирают для модификации характеристик мутеина IL-2 по мере необходимости. В качестве альтернативы вариант может быть сконструирован таким образом, что биологическая активность мутеина IL-2 изменена. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены, как обсуждается в данном документе.

### **Агонисты TNFR**

Суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) представляет собой семейство рецепторов цитокинов, которые образуют тримерные комплексы в плазматической мембране и связываются с факторами некроза опухоли (TNF) с помощью богатого цистеином внеклеточного домена. Некоторые представители семейства TNFR содержат домен смерти и получили название рецепторов смерти.

Агонисты TNFR по настоящему изобретению в комбинации с молекулами и мутеинами IL-2 по настоящему изобретению предпочтительно стимулируют регуляторные Т-клетки (Treg). Агонисты TNFR по настоящему изобретению включают рецептор-1 фактора некроза опухоли (TNFR1); рецептор-2 фактора некроза опухоли (TNFR2); рецептор бета-лимфотоксина (LTBR); OX40; CD40; Fas-рецептор; рецептор-приманка 3; CD27; CD30; 4-1BB; рецептор смерти 1, 2, 3, 4, 5 и 6; RANK, остеопротегрин; рецептор TWEAK; TACI; рецептор BAFF; медиатор проникновения вируса герпеса; рецептор фактора роста нервной ткани; антиген созревания В-клеток; глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок; TROY и рецептор эктодисплазина A2 и антитела-агониста к рецепторам, такие как агонистическое антитело к OX40.

Клетки Treg на исходном уровне экспрессируют несколько различных представителей семейства TNFR, таких как GITR, 4-1BB (CD137), OX40, DR3, TNFR2, при существенно более высоких уровнях по сравнению с другими популяциями иммунных клеток. Экспрессию TNFR на различных субпопуляциях Т-клеток определяли по данным уровня РНК одиночной клетки. Например, уровни TNFR в различных субпопуляциях иммунных клеток можно выделить из данных секвенирования РНК одиночной человеческой клетки, таких как в <http://crc.cancer-pku.cn/index.php>. В некоторых вариантах осуществления агонисты TNFR по настоящему изобретению включают антитело к OX40, антитело к DR3 и TNF. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFR может представлять собой лиганд для представителя TNFR. К таким относятся TNF-альфа; лимфотоксин-бета (TNF- $\beta$ ); OX40L; CD154; FasL; LIGHT; TL1A; CD70; Siva; CD153; лиганд 4-1BB; TRAIL; RANKL; TWEAK; APRIL; BAFF; CAMLG; NGF; BDNF; NT-3; NT-4; лиганд GITR и EDA-A2.

Примеры антител к OX40 включают антитела, описанные в WO2007062245A2, WO2010096418A2, WO2013008171A1, WO2013028231A1, WO2013038191A2, WO2013068563A2, WO2014148895A1, WO2015153513A1, WO2016057667A1, WO2016179517A1, WO2016196228A1 и WO2018112346A1, которые проявляют свою активность в качестве агонистических антител. В некоторых вариантах осуществления

антитела к OX40, которые могут проявлять свою активность в качестве агонистов рецептора OX40, являются применимыми для настоящего изобретения. Примеры антител к рецептору OX40 включают антитела, описанные в WO2003106498A2. Примеры лиганда OX40 включают лиганды, описанные в US5783665A, при этом все вышеуказанные документы включены посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления антитело к OX40 содержит последовательностью тяжелой цепи:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGSK  
KNYADSVKGRFTISRDTSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGYGDYTLDYWGQGT  
LLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9).

В одном варианте осуществления антитело к OX40 содержит последовательность легкой цепи:

DIHMTQSPSSLSASVRDRVTITCRASQYISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFGSGSGTDFSLAISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL  
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10).

В одном варианте осуществления антитело к OX40 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO:9 и легкую цепь под SEQ ID NO:10.

Примеры антител к рецептору смерти 3 (DR3) включают антитела, описанные в WO2011106707A2 и WO2015152430A1. В некоторых вариантах осуществления антитела к DR3, которые могут проявлять свою активность в качестве агонистов рецептора DR3, являются применимыми для настоящего изобретения. Примеры лиганда DR3 включают TNF-подобный белок 1A (TL1A). Все вышеуказанные ссылки включены посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Комбинированные молекулы**

Комбинацию молекулы или мутеина IL-2 и агониста TNFR, описанную в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации или в виде отдельной молекулы. Молекулы или мутеины IL-2 в комбинации с агонистами TNFR, представленными в данном документе, можно конструировать как отдельную молекулярную конструкцию. В некоторых случаях молекулы или мутеины IL-2 и агонисты TNFR по настоящему изобретению можно конструировать в виде отдельной молекулы, например, с Fc-молекулой. В некоторых вариантах осуществления Fc-молекула содержит молекулу или мутеин IL-2 на одном плече и агонист TNFR на другом плече или в качестве слитого белка. В некоторых случаях Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR удлиняет период полужизни в сыворотке крови Fc-связанной молекулы агониста IL-2/TNFR. В некоторых

случаях это осуществляется без повышения риска того, что такое удлинение периода полужизни повысит вероятность или интенсивность побочного эффекта или неблагоприятного события у пациента. Подкожное введение дозы такого мутеина с продленным периодом полужизни в сыворотке крови может обеспечить длительный охват мишени с более низким системным максимальным воздействием ( $C_{max}$ ). Продленный период полужизни в сыворотке крови может обеспечивать более низкий или менее частый режим введения дозы мутеина.

Период полужизни в сыворотке крови молекулы агониста IL-2/TNFR, представленной в данном документе, может быть продлен по сути посредством любого способа, известного из уровня техники. Такие способы включают изменение последовательности молекулы агониста IL-2/TNFR для включения пептида, который связывается с неонатальным Fc $\gamma$ -рецептором или связывается с белком, характеризующимся удлиненным периодом полужизни в сыворотке крови, например, IgG или человеческим сывороточным альбумином. В других вариантах осуществления молекула агониста IL-2/TNFR слита с полипептидом, который придает слитой молекуле удлиненный период полужизни. Такие полипептиды включают Fc IgG или другие полипептиды, которые связываются с неонатальным Fc $\gamma$ -рецептором, человеческим сывороточным альбумином или полипептидами, которые связываются с белком, характеризующимся удлиненным периодом полужизни в сыворотке крови. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR слита с Fc-молекулой IgG.

Части молекулы агониста IL-2/TNFR могут быть слиты с N-концом или C-концом Fc-области IgG.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к димеру, содержащему два Fc-слитых полипептида, полученных путем слияния молекулы или мутеина IL-2 с одной Fc-областью антитела и агониста TNFR с другой областью. Димер можно получить, например, посредством вставки слитого гена, кодирующего слитый белок, в соответствующий вектор экспрессии, экспрессии слитого гена в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, и сборки экспрессируемого слитого белка во многом подобно молекулам антител, после чего между Fc-фрагментами образуются межцепочечные связи с образованием димера.

Термин "полипептид Fc" или "Fc-область", используемый в данном документе, включает нативные и мутеиновые формы полипептидов, полученных из Fc-области антитела, и может представлять собой часть либо слитых белков на основе мутеина IL-2, либо антител к IL-2 по настоящему изобретению. Также включены усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирный участок, который способствует димеризации. В определенных вариантах осуществления Fc-область содержит домен CH2 и CH3 антитела. Наряду с продленным периодом полужизни в сыворотке крови слитые белки, содержащие Fc-фрагменты (и олигомеры, образованные из них), характеризуются преимуществом легкой очистки посредством аффинной хроматографии по сравнению с

колонками с белком А или белком G. Предпочтительные Fc-области получают из IgG человека, который включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В данном документе конкретные остатки в Fc идентифицируются по положению. Все положения Fc основаны на схеме нумерации согласно EU.

Одна из функций Fc-области антитела заключается в том, чтобы сообщать иммунной системе в случае, если антитело связывается со своей мишенью. Эта функция считается «эффекторной функцией». Взаимодействие приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP опосредуются связыванием Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. CDC опосредуется посредством связывания Fc с белками системы комплемента, например C1q.

Подклассы IgG различаются по своей способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 намного превосходит IgG2 и IgG4 в опосредовании ADCC и CDC. Таким образом, в вариантах осуществления, в которых эффекторная функция является нежелательной, предпочтительным является Fc IgG2. Однако известно, что молекулы, содержащие Fc IgG2, являются более сложными в изготовлении и характеризуются менее привлекательными биофизическими свойствами, такими как более короткий период полужизни, по сравнению с молекулами, содержащими Fc IgG1.

Эффекторная функция антитела может быть повышена или снижена посредством введения одной или нескольких мутаций в Fc. В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, содержащие Fc, сконструированный для усиления эффекторной функции (U.S. 7317091 и Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; оба включены в данный документ посредством ссылки во всей полноте). Иллюстративные Fc-молекулы IgG1, характеризующиеся повышенной эффекторной функцией, включают те, которые содержат следующие замены: S239D; S239E; S239K, F241A; V262A; V264D; V264L; V264A; V264S; D265A; D265S; D265V; F296A; Y296A; R301A; I332E; S239D/I332E; S239D/A330S/I332E; S239D/A330L/I332E; S298A/D333A/K334A; P247I/A339D; P247I/A339Q; D280H/K290S; D280H/K290S/S298D; D280H/K290S/S298V; F243L/R292P/Y300L; F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; G236A/S239D/I332E; K326A/E333A; K326W/E333S; K290E/S298G/T299A; K290N/S298G/T299A; K290E/S298G/T299A/K326E или K290N/S298G/T299A/K326E или комбинации любой из вышеуказанных позиций.

Другой способ повышения эффекторной функции белков, содержащих Fc IgG, заключается в снижении фукозилирования Fc. Удаление ядра фукозы из олигосахаридов типа биантенарных комплексов, присоединенных к Fc, привело к значительному повышению эффекторной функции в виде ADCC без изменения связывания антигена или в виде эффекторной функции CDC. Известно несколько способов снижения или устранения фукозилирования молекул, содержащих Fc, например, антител. Они включают

рекомбинантную экспрессию в определенных клеточных линиях млекопитающих, в том числе линию клеток с нокаутом FUT8, вариант линии CHO Lec13, линию клеток гибридомы крысы YB2/0, линию клеток, содержащих малую интерферирующую РНК, специфически нацеливающуюся на ген FUT8, и линию клеток, совместно экспрессирующих  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и  $\alpha$ -маннозидазу Гольджи II. В качестве альтернативы молекула, содержащая Fc, может экспрессироваться в клетке, отличной от клетки млекопитающего, например в растительной клетке, клетке дрожжей или прокариотической клетке, например E. coli.

В определенных вариантах осуществления молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 по настоящему изобретению содержат Fc, сконструированный для снижения эффекторной функции. Иллюстративные Fc-молекулы, характеризующиеся пониженной эффекторной функцией, включают молекулы, содержащие следующие замены: N297A или N297Q (IgG1); L234A/L235A (IgG1); V234A/G237A (IgG2); L235A/G237A/E318A (IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1); L234F/L235E/P331S (IgG1) или S267E/L328F (IgG1).

Известно, что IgG1 человека содержит сайт гликозилирования в N297 (система нумерации согласно EU), и гликозилирование способствует эффекторной функции антител на основе IgG1. Иллюстративная последовательность IgG1 представлена под SEQ ID NO:3:

```
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMNEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:3).
```

Группы мутировали в N297 при попытке получения агликозилированных антител. Мутации сосредотачивали на замене N297 аминокислотами, которые напоминают аспарагин по физико-химической природе, такими как глутамин (N297Q) или аланин (N297A), который имитирует аспарагины без полярных групп.

Используемый в данном документе термин "агликозилированное антитело" или "агликозилированный Fc" относится к статусу гликозилирования остатка в положении 297 Fc. Антитело или другая молекула могут характеризоваться гликозилированием в одном или нескольких других положениях, но все равно могут считаться агликозилированным антителом или агликозилированным Fc-слитым белком.

При попытке создания эффекторно нефункционального Fc IgG1 было обнаружено, что мутация аминокислоты N297 IgG1 человека в глицин, т. е. N297G, обеспечивает гораздо более высокую эффективность очистки и биофизические свойства по сравнению с другими аминокислотными заменами этого остатка. См. пример 8. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержит Fc IgG1 человека, содержащий замену N297G. Fc, содержащий

замену N297G, является применимым в любом контексте, в котором молекула содержит Fc IgG1 человека, и не ограничивается применением в контексте молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. В определенных вариантах осуществления антитело содержит Fc, содержащий замену N297G.

Fc, содержащий Fc IgG1 человека, содержащий мутацию N297G, может также предусматривать дополнительные вставки, делеции и замены. В определенных вариантах осуществления Fc IgG1 человека содержит замену N297G и идентичен на по меньшей мере 90%, идентичен на по меньшей мере 91%, идентичен на по меньшей мере 92%, идентичен на по меньшей мере 93%, идентичен на по меньшей мере 94%, идентичен на по меньшей мере 95%, идентичен на по меньшей мере 96%, идентичен на по меньшей мере 97%, идентичен на по меньшей мере 98% или идентичен на по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:3. В особенно предпочтительном варианте осуществления С-концевой остаток лизина заменен или удален. Аминокислотная последовательность человеческого IgG1, содержащая замену N297G и делецию С-концевого лизина, изложена под SEQ ID NO:4, имеющей следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMNEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ  
ID NO:4).

Было показано, что агликозилированные молекулы, содержащие Fc IgG1, являются менее стабильными, чем гликозилированные молекулы, содержащие Fc IgG1. Fc-область может быть дополнительно сконструирована для повышения стабильности агликозилированной молекулы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот заменены на цистеин с образованием дисульфидных связей в димерном состоянии. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:3, могут быть заменены цистеином. В предпочтительных вариантах осуществления определенные пары остатков являются замещенными, так что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предупреждая скремблирование дисульфидных связей. Предпочтительные пары включают без ограничения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, а также V323C и I332C.

В данном документе предусмотрены Fc-содержащие молекулы, в которых один или несколько остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 заменены цистеином, примеры которых включают остатки, содержащие A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, или замены V323C и I332C.

Дополнительные мутации, которые могут быть внесены в Fc IgG1, включают мутации, облегчающие образование гетеродимера среди Fc-содержащих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована для создания

"выступов" и "впадин", которые облегчают образование гетеродимера из двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при коэкспрессии в клетке. U.S. 7695963. В других вариантах осуществления Fc-область изменена для использования электростатического взаимодействия с целью стимулирования образования гетеродимера, в то же время препятствуя образованию гомодимера двух разных Fc-содержащих полипептидов при коэкспрессии в клетке. WO 09/089004, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Предпочтительные гетеродимерные Fc включают те, в которых одна цепь Fc содержит замены D399K и E356K, а другая цепь Fc содержит замены K409D и K392D. В других вариантах осуществления одна цепь Fc содержит замены D399K, E356K и E357K, а другая цепь Fc содержит замены K409D, K392D и K370D.

В определенных вариантах осуществления Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR содержит линкер между Fc и мутеином или молекулой IL-2 и/или линкер между Fc и агонистом TNFR. Из уровня техники известно множество различных линкерных полипептидов, которые можно использовать в контексте Fc-связанной молекулы агониста IL-2/TNFR. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR содержит одну или несколько копий пептида, состоящего из GGGGS (SEQ ID NO:5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) между Fc и мутеином IL-2. В некоторых вариантах осуществления полипептидная область между Fc и молекулой или мутеином IL-2 и/или Fc и областями агониста TNFR содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7). Как показано в данном документе, линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) гликозилируются при экспрессии в соответствующих клетках, и такое гликозилирование может способствовать стабилизации белка в растворе и/или при введении *in vivo*. Таким образом, в определенных вариантах осуществления слитый белок на основе мутеина IL-2 содержит гликозилированный линкер между Fc-областью и областью мутеина IL-2.

С-концевая часть Fc и/или аминоконцевая часть молекулы или мутеина IL-2 может содержать одну или несколько мутаций, которые приводят к изменению профиля гликозилирования Fc-связанной молекулы агониста IL-2/TNFR при экспрессии в клетках млекопитающих. В определенных вариантах осуществления Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR дополнительно содержит замену T3, например, T3N или T3A. Fc-связанная молекула агониста IL-2/TNFR может дополнительно содержать замену S5, такую как S5T.

Ковалентные модификации Fc-связанных молекул агониста IL-2/TNFR включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций вводят в молекулу путем проведения реакции между определенными аминокислотными остатками и органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с определенными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Цистеинильные остатки чаще всего реагируют с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с образованием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватизируются за счет реакции с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки дериватизируются за счет реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку это средство является относительно специфическим для гистидильной боковой цепи. Также применим пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация этими средствами имеет эффект изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидозфиреы, такие как метилпиколиминидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфо кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина требуется, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого  $pK_a$  функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также epsilon-аминогруппой аргинина.

Можно проводить специфическую модификацию тирозильных остатков, при этом особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют N-ацетилимидизол и тетранитрометан соответственно. Тирозильные остатки иодируют с применением  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ , чтобы получить меченые белки для использования в радиоиммуноанализе, при этом подходит описанный выше способ с хлорамином T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$ ), где R и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания антигенсвязывающих белков с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью для применения в различных способах. Обычно используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, сложные гомобифункциональные имидоэфиры, в том числе сложные дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, дают фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные сшивки в присутствии света. В качестве альтернативы для иммобилизации белков применяют реакционноспособные водонерастворимые матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Глутаминовые и аспарагиновые остатки часто дезамидируют до соответствующих глутаминовых и аспартильных остатков соответственно. В качестве альтернативы эти остатки дезамидируют в умеренно кислых условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериновых или треониновых остатков, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации мутеина П-2, молекулы на основе мутеина П-2 и Fc-слитого белка или антитела к П-2, включенных в объем настоящего изобретения, предусматривает изменение паттерна гликозилирования белка. Как известно из уровня техники, паттерны гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, от присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, связанных с гликозилированием, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма-хозяина, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к

присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также может применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования к мутеину IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антителу к IL-2 можно удобно осуществлять посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять добавлением одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в исходную последовательность или заменой на них (в случае сайтов O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, посредством мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях таким образом, что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

Другим средством повышения количества углеводных фрагментов в мутеине IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Эти процедуры являются предпочтительными по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для обеспечения N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида связывания сахар(сахара) может(могут) быть присоединен(-ы) к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, как, например, к группам цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, как, например, к группам серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, как, например, к остаткам фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 года, и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном мутеине IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения, представляющего собой трифторметансульфоновую кислоту, или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативного отщепления углеводных фрагментов на полипептидах можно достичь посредством применения целого ряда эндо- и экзо-гликозидаз, которые описаны в

Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем применения соединения туникамицина, которое описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование N-гликозидных связей с белком.

Другой тип ковалентной модификации молекулы агониста IL-2/TNFR включает связывание белка с различными небелковыми полимерами, в том числе без ограничения различными полиолами, такими как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, посредством способа, указанного в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, аминокислотные замены могут быть осуществлены в различных положениях в молекуле агониста IL-2/TNFR с целью облегчения добавления полимеров, таких как PEG. Таким образом, варианты осуществления по настоящему изобретению включают пегилированную молекулу агониста IL-2/TNFR. Такие пегилированные белки могут характеризоваться повышенным периодом полужизни и/или сниженной иммуногенностью по сравнению с их непегилированными формами.

#### **Полинуклеотиды, кодирующие молекулы агониста IL-2/TNFR**

Объемом настоящего изобретения охвачены нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы агониста IL-2/TNFR. В аспектах настоящего изобретения предусмотрены варианты полинуклеотидов (например, вследствие вырождения), которые кодируют аминокислотные последовательности, описанные в данном документе.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие аминокислотным последовательностям, описанным в данном документе, для применения в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве поисковых последовательностей для поиска в базе данных, могут быть получены посредством "обратной трансляции" из аминокислотных последовательностей. Хорошо известную процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей мутеины IL-2 и молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. Олигонуклеотиды, которые определяют требуемые концы комбинации фрагментов ДНК, используют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз для облегчения вставки амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в вектор экспрессии. Методики ПЦР описаны в Saiki et al., Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; и PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. Термин "выделенная нуклеиновая кислота", представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого

нуклеиновая кислота была выделена, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативно с матрицы или химически, таких как ПЦР-продукты, молекулы cDNA или, например, олигонуклеотиды, понятно, что нуклеиновые кислоты, образующиеся в результате таких процессов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции на основе нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновые кислоты практически свободны от загрязняющего эндогенного материала. Молекулу нуклеиновой кислоты предпочтительно получают из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз, в практически чистой форме и в количестве или концентрации, позволяющих идентифицировать, манипулировать и восстанавливать составляющие ее нуклеотидные последовательности с помощью стандартных биохимических способов (таких как способы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно предусмотрены и/или сконструированы в виде открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут быть представлены 5'- или 3'-концами открытой рамки считывания, где то же самое не мешает манипуляции или экспрессии кодирующей области.

Мутеины IL-2 в соответствии с настоящим изобретением обычно получают посредством сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей молекулу агониста IL-2/TNFR, с применением кассетного или ПЦР-мутагенеза или других методик, широко известных из уровня техники, с получением ДНК, кодирующей вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в культуре клеток, как это описано в данном документе. Однако молекулу агониста IL-2/TNFR можно получить посредством синтеза *in vitro* с применением стандартных методик. Варианты обычно демонстрируют ту же качественную биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, например экспансию Treg, хотя также могут быть выбраны варианты, которые характеризуются модифицированными характеристиками, как будет более подробно описано ниже.

Специалистам в данной области будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода каждая молекула агониста IL-2/TNFR по настоящему изобретению кодируется особенно большим количеством нуклеиновых кислот, каждая из которых входит в объем настоящего изобретения и может быть получена с применением стандартных методик. Таким образом, идентифицировав конкретную аминокислотную последовательность, специалисты в данной области могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот с помощью простой модификации последовательности одного или нескольких кодонов таким путем, который не приводит к изменению

аминокислотной последовательности кодируемого белка.

Настоящее изобретение также относится к системам и конструкциям экспрессии в форме плазмид, векторов экспрессии, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как указано выше. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим такие системы или конструкции экспрессии.

Как правило, векторы экспрессии, применяемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазмид, а также для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления такие последовательности, совокупно называемые "фланкирующими последовательностями", как правило, будут включать одну или несколько из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или несколько энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей подлежащий экспрессии полипептид, и элемент селектируемого маркера. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Необязательно вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т. е. олигонуклеотидную молекулу, расположенную на 5'- или 3'-конце кодирующей последовательности молекулы агониста IL-2/TNFR; олигонуклеотидную последовательность, которая кодирует полигистидин (такую как гексагистидин: НННННН (SEQ ID NO: 8)) или другую "метку", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Как правило, эта метка слита с полипептидом при экспрессии полипептида, и она может служить в качестве средства для его аффинной очистки или выявления из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, посредством колоночной хроматографии с применением антител к метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно, впоследствии метка может быть удалена с применением различных способов, таких как применение определенных пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т. е. из того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т. е. из вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (т. е. комбинацией фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована посредством механизма клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах по настоящему изобретению, можно получать любым из нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Как правило, применяемые в данном документе фланкирующие последовательности будут предварительно идентифицированы с помощью картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и, следовательно, могут быть выделены из соответствующего источника, представляющего собой ткань, с применением подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В таком случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с применением способов, описанных в данном документе, которые служат для синтеза и клонирования нуклеиновых кислот.

Вне зависимости от того, известна ли вся или только часть фланкирующей последовательности, ее можно получить с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с помощью подходящего зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности от того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, то фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, можно выделить из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность и даже другой ген или гены. Выделение может быть выполнено посредством расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с применением очистки на агарозном геле, хроматографии на колонке Qiagen® (Чатсворт, штат Калифорния, США) или других способов, известных специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели будет очевиден для рядового специалиста в данной области.

Как правило, точка начала репликации представляет собой часть тех векторов экспрессии для прокариотических клеток, которые приобретаются в коммерческих источниках, и такая точка начала помогает амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайт точки начала репликации, то его можно химически синтезировать на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, штат Массачусетс, США) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, и различные источники вирусного происхождения (например, SV40, вирус полиомы, аденовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусы, такие как HPV или BPV) подходят для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент точки начала репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (например, точка начала репликации SV40 часто используется только потому, что она также содержит промотор ранних генов вируса).

Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в 3'-направлении относительно конца кодирующей полипептид области и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в

прокариотических клетках представляет собой фрагмент с высоким содержанием G-C, за которым следует последовательность поли-T. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести в коммерческих источниках в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением способов синтеза нуклеиновых кислот, описываемых в данном документе.

Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой в селективной среде для культивирования. Типичные гены маркеров отбора кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину, в случае прокариотических клеток-хозяев; (б) восполняют ауксотрофные недостаточности у клетки; или (с) обеспечивают необходимые питательные вещества, не доступные из комплексной или определенной среды. Специфические селективируемые маркеры представляют собой ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев можно также с успехом применять ген устойчивости к неомицину.

Для амплификации гена, который будет экспрессироваться, можно применять другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, которые требуются для продуцирования белка, крайне важного для роста или выживания клеток, многократно повторяются в тандеме в хромосомах последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают гены дигидрофолатредуктазы (DHFR) и тимидинкиназы, не содержащие промоторов. Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия давления отбора, где только лишь трансформанты адаптированы к выживанию вследствие присутствия в векторе гена селективируемого маркера. Давление отбора устанавливают посредством культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация средства для отбора в среде последовательно увеличивается, приводя таким образом к амплификации как селективируемого гена, следовательно, так и гена, который кодирует требуемый полипептид, такой как молекула агониста IL-2/TNFR. В результате с амплифицированной ДНК синтезируются повышенные количества полипептида.

Сайт связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции mRNA, и для него характерно наличие последовательности Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательности Козак (эукариоты). Как правило, этот элемент расположен в направлении 3'-конца относительно промотора и в направлении 5'-конца относительно кодирующей последовательности полипептида, подлежащего экспрессии. В определенных вариантах осуществления одна или несколько кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES), что позволяет осуществлять трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, если в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, можно манипулировать с различными пре- или пропоследовательностями для улучшения гликозилирования или выхода. Например, можно изменять сайт расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавлять пропоследовательности, которые также могут воздействовать на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или несколько дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в сайте расщепления пептидазой, присоединенных к аминоконцу. В качестве альтернативы, применение некоторых сайтов расщепления ферментами может приводить к получению слегка усеченной формы требуемого полипептида, если фермент осуществляет разрезание в такой области в пределах зрелого полипептида.

Векторы экспрессии и векторы для клонирования по настоящему изобретению будут, как правило, содержать промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей молекулу агониста  $\text{IL-2/TNFR}$ . Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т. е. в 5'-направлении) стартового кодона структурного гена (как правило, в пределах приблизительно 100-1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы подразделяют на два класса: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы запускают повышенные уровни транскрипции с ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторое изменение в условиях культивирования, как, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы приводят к постоянной транскрипции гена, с которым они функционально связаны, т. е. они осуществляют незначительную регуляцию экспрессии гена или такая регуляция отсутствует. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами.

Также из уровня техники хорошо известны промоторы, подходящие для применения с дрожжевыми клетками-хозяевами. Дрожжевые энхансеры предпочтительно применяют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы генов, кодирующих белки теплового шока, и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без

ограничения: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-концевом длинном повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промоторные и регуляторные последовательности из гена металлотионина, Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42), и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731) или промотор tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также представляют интерес следующие области транскрипционного контроля животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, активная в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротейна, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, активная в олигодендроцитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи-2 миозина, активная в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, активная в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Энхансерную последовательность можно вставлять в вектор для повышения транскрипции ДНК у высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК длиной обычно приблизительно 10-300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Энхансеры являются относительно независимыми от ориентации и положения, они были обнаружены в положениях в направлении как 5'-конца, так и 3'-конца относительно транскрипционной единицы. Известны некоторые энхансерные последовательности, полученные из генов млекопитающих (например, генов глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Как правило, обычно применяют энхансер из вируса. Известные из уровня техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса

полиомы и энхансеры аденовируса представляют собой иллюстративные энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может находиться в векторе как в направлении 5'-, так и 3'-конца относительно кодирующей последовательности, как правило, он расположен в 5'-сайте относительно промотора. Последовательность, кодирующую соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), можно встроить в вектор экспрессии для обеспечения внеклеточной секреции молекулы агониста IL-2/TNFR. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых должно продуцироваться белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, включают следующие: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846.

Вектор может содержать один или несколько элементов, облегчающих экспрессию, когда вектор интегрирован в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) и область прикрепления к матрице (MAR). MAR опосредуют структурную организацию хроматина и могут изолировать интегрированный вектор от эффекта "положения". Таким образом, MAR особенно применимы, когда вектор используется для создания стабильных трансфектантов. Из уровня техники известен ряд природных и синтетических нуклеиновых кислот, содержащих MAR, например патенты США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать все требуемые фланкирующие последовательности или не содержать их. Если одна или несколько из фланкирующих последовательностей, описанных в данном документе, еще не присутствует в векторе, то их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области.

После того, как вектор был сконструирован и в надлежащий сайт вектора была вставлена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу агониста IL-2/TNFR, полный вектор может быть встроен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектором экспрессии выбранной клетки-хозяина можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию,

микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ отчасти будет зависеть от применяемого типа клетки-хозяина. Данные способы и другие подходящие способы широко известны специалисту в данной области и изложены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

При культивировании в соответствующих условиях клетка-хозяин синтезирует молекулу агониста IL-2/TNFR, которая впоследствии может быть выделена из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует ее в среду) или непосредственно из продуцирующей ее клетки-хозяина (если она не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые требуются или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость фолдинга в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), и любые клеточные линии, используемые в системе экспрессии, известной из уровня техники, могут быть использованы для получения рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению. В целом, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным вектором экспрессии, который содержит ДНК, кодирующую требуемую молекулу агониста IL-2/TNFR. Среди клеток-хозяев, которые могут быть использованы, находятся прокариоты, дрожжи или клетки высших эукариот. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. К клеткам высших эукариот относятся клетки насекомых и хорошо известные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию COS-7 клеток почки обезьян (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клетки HeLa, клеточные линии ВНК (ATCC CRL 10) и клеточную линию CV1/EBNA, полученную из клеточной линии почки африканской зеленой мартышки CV1 (ATCC CCL 70), как описано McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки человека A431, клетки человека Colo205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культуры первичной ткани *in vitro*, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Необязательно клеточные линии млекопитающих, такие как HepG2/3B, KB, NIH 3T3 или S49, например, могут быть использованы для экспрессии полипептида, когда желательно использовать полипептид в различных анализах трансдукции сигнала или репортерных анализах.

В качестве альтернативы полипептид можно получить в низших эукариотах, таких как дрожжи, или в прокариотах, таких как бактерии. Подходящие дрожжи включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluyveromyces*, *Candida* или любой штамм дрожжей, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой бактериальный штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Если полипептид получают в дрожжах или бактериях, может быть желательно модифицировать продуцируемый ими полипептид, например, посредством фосфорилирования или гликозилирования соответствующих сайтов с получением функционального полипептида. Такие ковалентные присоединения могут быть выполнены с применением известных химических или ферментативных способов.

Полипептид также может быть получен посредством функционального связывания выделенной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с подходящими контрольными последовательностями в одном или нескольких векторах экспрессии насекомых и с применением системы экспрессии насекомых. Материалы и способы для систем экспрессии бакуловирус/клетка насекомого коммерчески доступны в форме набора, например, от Invitrogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США (набор MaxVac®), и такие способы хорошо известны из уровня техники, как описано в Summers and Smith, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Бесклеточные системы трансляции также можно применять для получения полипептидов с использованием РНК, полученных из конструкций нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную с по меньшей мере одной последовательностью для регуляции экспрессии, представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяина".

Также включены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из иллюстративных молекул агониста IL-2/TNFR, описанных в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-часть и молекула агониста IL-2/TNFR кодируются в одной открытой рамке считывания, необязательно с линкером, кодируемым между Fc-областью и молекулой агониста IL-2/TNFR.

В другом аспекте в данном документе представлены векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеуказанную молекулу агониста IL-2/TNFR, функционально связанные с промотором.

В другом аспекте в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеуказанную молекулу агониста IL-2/TNFR. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*, или может представлять собой эукариотическую клетку, такую как клетка

млекопитающего. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO).

В другом аспекте в данном документе представлены способы получения молекулы агониста IL-2/TNFR. Способы предусматривают культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых осуществляется экспрессия с промотора, функционально связанного с молекулой на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка. Затем из указанной культуры выделяют молекулу на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка. Молекула на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка может быть выделена из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

#### **Фармацевтические композиции**

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество молекулы агониста IL-2/TNFR вместе с фармацевтически эффективными разбавителями, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. В определенных вариантах осуществления мутеин IL-2 находится в объеме контекста молекулы на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Предпочтительно материалы для составления являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество молекулы агониста IL-2/TNFR, содержащей терапевтическую молекулу, например, молекулу на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модифицирования, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и

разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (как например, натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В определенных вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и требуемой дозы. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления основные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящими средой-носителем или носителем могут быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными иллюстративными средами-носителями. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции на основе мутеина II-2 или антитела к II-2 могут быть подготовлены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, характеризующейся требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной массы или водного раствора. Дополнительно, в определенных вариантах осуществления продукт на основе мутеина II-2 или антитела к II-2 может быть составлен в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных

веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы могут быть выбраны композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для участка введения. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, используют буферы.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут быть представлены в форме апиrogenного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемую композицию на основе молекулы агониста IL-2/TNFR в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой композицию на основе молекулы агониста IL-2/TNFR составляют в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого надлежащим образом. В определенных вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия увеличения времени пребывания в системном кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств можно применять для введения молекулы агониста IL-2/TNFR.

Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, в том числе составы, включающие композиции на основе молекулы агониста IL-2/TNFR в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области известны методики составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут включать сложные полиэферы, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский

патент № EP 058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксималяную кислоту (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации заявок на европейские патенты №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. В случае если композицию лиофилизируют, то стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

В аспектах по настоящему изобретению представлены составы на основе самобуферизирующейся молекулы агониста IL-2/TNFR, которые можно применять в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах осуществления представлены композиции на основе молекулы агониста IL-2/TNFR, в частности фармацевтические молекулы на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка, которые содержат в дополнение к композиции на основе молекулы агониста IL-2/TNFR, одно или несколько вспомогательных веществ, таких как иллюстративно описанные в данном разделе и в других разделах данного документа. При этом вспомогательные вещества могут применяться в настоящем изобретении для самых разнообразных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, как, например, регулирование вязкости, и/или способов по настоящему изобретению для повышения эффективности, и/или стабилизации таких составов и способов во избежание деградации и ухудшения качества, например, вследствие стрессовых воздействий, возникающих во время производства, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него.

Доступны различные объяснения, касающиеся стабилизации белка, а также материалов для составления и способов, применимых в этом отношении, как, например, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91

(1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", в RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, особенно в частях, относящихся к вспомогательным веществам и связанным с ними способам, для составов на основе самобуферизирующегося белка в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для применения на животных и/или людях.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения можно использовать соли, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Хорошо известно, что ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, путем связывания денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, за счет этого, предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка.

Разновидности ионов существенно отличаются по своим влияниям на белки. Был разработан ряд категориальных рангов ионов и их влияния на белки, которые можно применять при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Один пример представляет собой ряд Гофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряде Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно применять в составах на основе молекулы агониста IL-2/TNFR в соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению в качестве объемообразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден при лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств таблетки.

Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин пригоден в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и, для обсуждаемых в данном документе целей, полиэтиленгликоль (PEG) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой применимые стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физической и химической деградации. Полиолы также пригодны для регулирования тоничности составов.

В число полиолов, применимых в выбранных вариантах осуществления настоящего изобретения, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности массы в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность массы. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, обусловленных замерзанием-оттаиванием, во время транспортировки или при получении нерасфасованного продукта в способе производства. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для применения в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные молекулы, такие как сахароза, которая гидролизуется до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG применим для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и в этом отношении может применяться в настоящем изобретении.

Варианты осуществления составов на основе молекулы агониста IL-2/TNFR дополнительно предусматривают поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются при физическом перемешивании, например, возникающем при транспортировке и манипуляциях с продуктом.

Для предотвращения, сведения к минимуму или уменьшения адсорбции на поверхности традиционно применяются поверхностно-активные вещества. Применимые в этом отношении поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и сорбитанполиэтоксилатов и полксамер 188.

Поверхностно-активные вещества также обычно используются для контроля

конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество, как правило, стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты подвержены окислительной деградации и зачастую при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять осторожно, и при их применении их следует использовать в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует использовать в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов на основе молекулы агониста IL-2/TNFR дополнительно предусматривают один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предупреждения окислительной деградации белков. К числу применимых в данном отношении антиоксидантов относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в составах на основе терапевтического белка в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. В данном отношении EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстанавливающие средства, в частности, такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении, среди прочего, выбраны для устранения или достаточной степени уменьшения возможности повреждения белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и которые необходимы для образования координационных комплексов в белках, как, например, цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут использоваться для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы  $\text{Ca}^{+2}$  (не более 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$  могут дестабилизировать  $\text{ghDNase}$ . Аналогичным образом,  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может дестабилизироваться за счет ионов  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$

и  $\text{Fe}^{+2}$ , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов  $\text{Al}^{+3}$ .

Варианты осуществления составов на основе молекулы агониста IL-2/TNFR дополнительно предусматривают один или несколько консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного отбора из того же контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности или срока применения лекарственного продукта. Широко применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты давно применяются с низкомолекулярными препаратами для парентерального введения, разработка составов на основе белков, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты практически всегда оказывают дестабилизирующее действие (способствуют агрегации) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозовых составах на основе белков. На сегодняшний день большинство лекарственных средств на основе белка были составлены только для однократного применения. Однако, если возможно получать многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и улучшении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многоразовых шприцев-ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде шприцев-ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный--двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол.

При составлении и разработке составов с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены молекулы агониста IL-2/TNFR или Fc-слитые белки молекул агониста IL-2/TNFR в лиофилизированных составах. Высушенные сублимацией продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать разбавителем, содержащим консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При использовании жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (приблизительно 18-24 месяца). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Составы на основе молекулы агониста IL-2/TNFR, как правило, будут разработаны для конкретных путей и способов введения, для конкретных вводимых доз и частот введения, для конкретных средств лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биологической доступности и способности сохранения в организме помимо прочего. Таким образом, составы могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая без ограничения пероральный, ушной, глазной, ректальный, и вагинальный, и парентеральный пути, включая внутривенную и внутриартериальную инъекции, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. Настоящее изобретение также предусматривает наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. Каждый набор по настоящему изобретению может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей молекулу агониста IL-2/TNFR, подлежащей применению, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники поймет, что соответствующие уровни дозировки для лечения будут варьироваться в зависимости, отчасти, от доставляемой молекулы, показания для применения молекулы агониста IL-2/TNFR, пути введения и размера (веса тела, поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления клиницист может подбирать дозу и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может варьироваться в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг или больше в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных вариантах осуществления доза может варьироваться в диапазоне от 0,5 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг, необязательно от 2,5 мкг/кг до приблизительно 50 мкг/кг.

Терапевтически эффективное количество молекулы агониста IL-2/TNFR предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, к повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или к предупреждению нарушения или недееспособности вследствие поражения заболеванием.

Фармацевтические композиции можно вводить с применением устройства медицинского назначения. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224;

4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, которые все включены в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая

### **Способы лечения аутоиммунных или воспалительных нарушений**

В определенных вариантах осуществления молекулу агониста IL-2/TNFR по настоящему изобретению применяют для лечения аутоиммунного или воспалительного нарушения. В предпочтительных вариантах осуществления применяют молекулу на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка.

Нарушения, которые особенно поддаются лечению мутеином IL-2 или антителом к IL-2, раскрытыми в данном документе, включают без ограничения воспаление, аутоиммунное заболевание, atopические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилозирующий спондилоартрит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориазический артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилоартрит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, дерматомиозит, псориазический артрит, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, atopический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (SLE), тяжелую миастению, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, глютеновую болезнь, рассеянный склероз (MS), астму, COPD, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, GVHD, отторжение трансплантата, повреждение почек, васкулит, индуцированный гепатитом C, самопроизвольное прерывание беременности и т. д.

В предпочтительных вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное нарушение представляет собой системную красную волчанку (SLE), реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом C, диабет I типа, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, самопроизвольное прерывание беременности,

атопические заболевания и воспалительные заболевания кишечника, в том числе язвенный колит, глютеновую болезнь.

В другом варианте осуществления пациента, у которого имеется аутоиммунное или воспалительное нарушение или имеется риск его возникновения, подвергают лечению с помощью молекулы агониста IL-2/TNFR (например, молекулы агониста IL-2/TNFR, раскрытой в данном документе, такой как молекула на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка, раскрытая в данном документе) и осуществляют контроль ответа пациента на лечение. Отслеживаемой реакцией пациента может быть любой обнаружимый или измеримый ответ пациента на лечение или любая комбинация таких ответов. Например, реакция может представлять собой изменение физиологического состояния пациента, такое как температура тела или лихорадка, аппетит, потливость, головная боль, тошнота, усталость, чувство голода, жажда, ясность ума и т. п. В качестве альтернативы ответ может представлять собой изменение количества типа клеток или продукта гена (например, белка, пептида или нуклеиновой кислоты), например, в образце периферической крови, взятом у пациента. В одном варианте осуществления схема лечения пациента изменяется, если у пациента наблюдается обнаружимый или измеримый ответ на лечение или если такой ответ превышает определенный порог. Изменение может заключаться в снижении или повышении частоты введения доз, или снижении или повышении количества молекулы агониста IL-2/TNFR, вводимого в дозе, или "перерыве" от введения дозы (т. е. временном прекращении лечения либо на определенный период времени, либо до тех пор, пока лечащий врач не примет решение, что лечение следует продолжать, или пока контролируемый ответ пациента не укажет, что лечение необходимо или можно возобновить), или прекращении лечения. В одном варианте осуществления ответ представляет собой изменение температуры пациента или уровней CRP. Например, ответ может представлять собой повышение температуры тела пациента или повышение уровня CRP в образце периферической крови, или и то, и другое. В одном конкретном варианте реализации изобретения лечение пациента уменьшают, приостанавливают или прекращают, если температура тела пациента увеличивается во время лечения по меньшей мере на 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2° или 2,5° C. В другом конкретном варианте реализации изобретения лечение пациента уменьшают, приостанавливают или прекращают, если концентрация CRP в образце периферической крови пациента увеличивается в течение лечения по меньшей мере на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5 или 2 мг/мл. Другие реакции пациента, которые можно отслеживать и использовать при принятии решения об изменении, уменьшении, приостановке или прекращении лечения, включают развитие или ухудшение состояния синдрома повышенной проницаемости капилляров (гипотонию и сердечно-сосудистую нестабильность), нарушение функции нейтрофилов (например, приводящее к обнаружимому развитию или обострению инфекции или представляющее собой их), тромбоцитопению, тромботическую ангиопатию, реакции в месте инъекции, васкулит (например, васкулит, индуцированный вирусом гепатита С) или воспалительные

симптомы или заболевания. Дополнительные реакции пациента, которые можно отслеживать и использовать при принятии решения об изменении, уменьшении, увеличении, приостановке или прекращении лечения, включают повышение количества НК-клеток, клеток Treg, FOXP3<sup>-</sup> CD4 T-клеток, FOXP3<sup>+</sup> CD4 T-клеток, FOXP3<sup>-</sup> CD8 T-клеток или эозинофилов. Повышение этих типов клеток может быть обнаружено, например, в виде повышения количества таких клеток в единице периферической крови (например, выраженное в виде повышения количества клеток в миллилитре крови) или в виде повышения процентного содержания такого типа клеток по сравнению с другим типом клеток или клеток в образце крови. Другой реакцией пациента, которую можно контролировать, является повышение количества молекулы агониста IL-2/TNFR, связанной с клеточной поверхностью на CD25<sup>+</sup> клетках, в образце периферической крови пациента.

### **Способы экспансии клеток Treg**

Молекулу агониста IL-2/TNFR или молекулу на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка можно применять для экспансии клеток Treg в организме субъекта или образце. В данном документе предусмотрены способы повышения отношения Treg к нерегуляторным T-клеткам. Способ предусматривает приведение популяции T-клеток в контакт с эффективным количеством молекулы агониста IL-2/TNFR или молекулы на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка. Отношение может быть измерено путем определения отношения CD3<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> клеток к CD3<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> клеткам в популяции T-клеток. Типичная частота Treg в крови человека составляет 5-10% от общего количества CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T-клеток, однако при заболеваниях, перечисленных выше, это процентное содержание может быть ниже или выше. В предпочтительных вариантах осуществления процентное содержание Treg повышается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 900% или по меньшей мере 1000%. Максимальная кратность повышения Treg может варьироваться в зависимости от конкретных заболеваний; однако максимальная частота Treg, которая может быть получена при лечении мутеином IL-2, составляет 50% или 60% от общего числа CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T-клеток. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят молекулу агониста IL-2/TNFR или молекулу на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка, при этом отношение регуляторных T-клеток (Treg) к нерегуляторным T-клеткам в периферической крови субъекта повышается.

Поскольку молекула агониста IL-2/TNFR и молекула на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитых белков и другие комбинации IL-2 и TNFR предпочтительно приводят к экспансии Treg по сравнению с другими типами клеток, они также являются применимыми для повышения отношения регуляторных T-клеток (Treg) к естественным клеткам-киллерам (NK) и/или отношению Treg к цитотоксическим T-клеткам (Tcon) в

периферической крови субъекта. Отношение может быть измерено путем определения отношения CD3+FOXP3+ клеток к CD16+ и/или CD56+ лимфоцитам, которые являются CD19- и CD3-. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что молекула агониста IL-2/TNFR и молекула на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка, и комбинации IL-2 и TNFR не только предпочтительно приводят к экспансии Treg по сравнению с другими типами клеток, но и также снижают уровни других типов клеток, включая Tcon, например, CD4+ и/или CD8+ Tcon, и/или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления уровни Tcon, например, CD4+ и/или CD8+ Tcon, и/или NK-клеток являются ниже, чем уровни этих клеток после введения IL-2 отдельно. В некоторых вариантах осуществления уровень снижения составляет 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или больше. В некоторых вариантах осуществления уровни Tcon, например, CD4+ и/или CD8+ Tcon, и/или NK-клеток являются ниже, чем уровни на исходном уровне (например, контроль в примере 2 и на фигуре 6). В некоторых вариантах осуществления уровень снижения составляет 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или больше.

Предполагается, что молекула агониста IL-2/TNFR или молекула на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка может проявлять терапевтический эффект в отношении заболевания или нарушения у пациента без значительного повышения отношения Treg к нерегуляторным Т-клеткам или NK-клеткам в периферической крови пациента. Терапевтический эффект может быть обусловлен локализованной активностью молекулы агониста IL-2/TNFR или молекулы на основе агониста IL-2/TNFR и Fc-слитого белка в участке воспаления или возникновения аутоиммунной реакции.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры, как фактические, так и гипотетические, приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

#### **Пример 1. Комбинированный агонизм TNFR и IL-2R стимулирует экспансию клеток Treg**

Для определения эффектов стимуляции TNFR и IL-2R мононуклеарные клетки периферической крови человека метили с помощью CellTrace™ Violet и обрабатывали с помощью различных агонистов TNFR (антитела к OX40, антитела к DR3, TNF) вместе с IL-2 и анализировали через 4 дня. Клетки, стимулированные с помощью антитела к CD3, демонстрируют стабильную пролиферацию и служат в качестве положительного контроля для анализа. Стимуляция с помощью IL2 или контрольного IgG не приводила к какому-либо ослаблению интенсивности окрашивания CTV. Пролиферация отсутствовала с какой-либо из указанных агонистов TNFR в отдельности. Комбинированная стимуляция с применением антитела к OX40 и IL2 приводила к пролиферации клеток Treg, что видно по ослаблению интенсивности окрашивания CTV.

PBMC от здоровых людей-доноров метили с помощью CellTrace™ Violet (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в среде x-vivo 15 (Lonza). Реагенты получали от следующих поставщиков: TNF (R&D systems),

антитело к DR3 (Biolegend) и антитело к OX40 (содержащее последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO:9 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO:10). Образцы анализировали на проточном цитометре Symphony (BD biosciences) и данные анализировали с помощью программного обеспечения Flojo.

На фигуре 1 показана пролиферация Treg при стимуляции посредством IL-2 в комбинации с агонистом TNFR (антитело к OX40, рекомбинантный TNF или антитело к DR3). (A) PBMC, меченные CellTrace™ Violet (CTV), стимулировали с использованием указанных реагентов в течение 4 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии. Гистограммы размещены в следующем порядке (снизу вверх): нестимулированные, стимулированные с помощью 1 мкг/мл антитела к CD3, 20 ЕД/мл IL-2, IgG, агониста TNFR (антитела к OX40, рекомбинантного TNF, антитела к DR3), агониста TNFR с IL-2. Гистограммы гейтировали по клеткам Treg (CD4+Foxp3+). Только на графиках с положительным контролем к CD3 и комбинацией агониста TNFR (антитела к OX40, рекомбинантного TNF и антитела к DR3) была продемонстрирована пролиферация Treg. На фигуре 2 показаны гистограммы для PBMC, стимулированных антителом к OX40 и IL-2. На фигуре 3 показаны гистограммы для PBMC, стимулированных TNF и IL-2. На фигуре 4 показаны гистограммы для PBMC, стимулированных антителом к DR3 и IL-2. На фигуре 5 показаны гистограммы для PBMC, стимулированных GITR и IL-2.

#### **Пример 2. Исследования in vivo: комбинированный агонизм TNFR и IL-2R стимулирует экспансию клеток Treg**

Мышам C57/Bl6 (n=6) вводили 1 мг/кг мутеина на основе мышинового IL-2, антитела к OX40 или антитела к OX40-IL2, и селезенку, лимфатические узлы и легкие отбирали в день 4 (n=3) или в день 15 (n=3). Иллюстративные примеры молекул, сконструированные для данного исследования, показаны на фигуре 6. Молекулу #3 использовали в данном документе для определенных исследований. Мышей, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контроля. Исследовали эффекты указанных обработок в отношении частоты возникновения указанной популяции клеток. Treg идентифицировали в качестве CD4+Foxp3+, активированные Т-клетки в качестве CD4+Foxp3-CD25+, активированные CD8 в качестве CD8+CD44+ и NK/ILC в качестве CD4-CD8-NK1.1+. Результаты являются репрезентативными для двух независимых экспериментов. Данные показаны в виде кратности экспансии по сравнению с контролем (значение задано как 1).

Результаты показаны на фигуре 7. Обработка с использованием только IL2 приводила к экспансии клетки Treg в некоторых тканях; однако также наблюдали повышение частоты встречаемости CD4 и CD8 клеток, а также NK-клеток. Обработка с использованием антитела к OX40 также приводила к экспансии Treg в том же масштабе по сравнению с IL2 без существенного влияния на другие типы иммунных клеток. Введение слитого антитела к OX40-IL2 приводило к существенно более высокой кратности экспансии клеток Treg по сравнению с IL2 и антителом к OX40 отдельно с минимальным влиянием на другие клетки. Кроме того, экспансия клеток Treg, опосредованная слитым антителом к OX40-IL2, сохранялась в течение более длительного

времени по сравнению с другими видами обработки, демонстрируя эффект, превышающий аддитивный, в отношении PL2 или OX40 отдельно как в ткани селезенки, так и в ткани легкого.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерная молекула человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащая полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агонист рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), выбранный из группы, состоящей из антитела к OX40, антитела к DR3 и TNF.

2. Химерная молекула человеческого IL-2 по п. 1, где полипептид человеческого IL-2 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1.

3. Химерная молекула человеческого IL-2 по любому из предыдущих пунктов, где полипептид человеческого IL-2 представляет собой мутеин полипептида человеческого IL-2, при этом указанный мутеин IL-2 характеризуется по меньшей мере одной мутацией, выбранной из V91K, N30S, N30D, Y31H, Y31S, K35R, V69A, Q74P, V91K/D20L, D84R/E61Q, V91K/D20A/E61Q/M104T, N88K/M104L, V91H/M104L, V91K/H16E/M104V, V91K/H16R/M104V, V91K/H16R/M104T, V91K/D20A/M104T, V91K/H16E/M104T, V91K/H16E/E61Q/M104T, V91K/H16R/E61Q/M104T, V91K/H16E, V91H/D20A/M104T, H16E/V91H/M104V, V91H/D20A/E61Q/M104T, V91H/H16R/E16Q, V91K/D20A/M104V, H16E/V91H, V91H/D20A/M104V, H16E/V91H/M104T, H16E/V91H/E61Q/M104T, V91K/E61Q/H16E, V91K/H16R/M104L, H16E/V91H/E16Q, V91K/E61Q/H16R, D20W/V91K/E61Q, V91H/H16R, V91K/H16R, D20W/V91K/E61Q/M104T, V91K/D20A, V91H/D20A/E16Q, V91K/D20A/M104L, V91H/D20A, V91K/E61Q/D20A, V91H/M104T, V91H/M104V, V91K/E61Q, V91K/N88K/E61Q/M104T, V91K/N88K/E61Q, V91H/E61Q, V91K/N88K, D20A/H16E/M104T, D20A/M104T, H16E/N88K, D20A/M104V, D20A/M104L, H16E/M104T, H16E/M104V, N88K/M104V, N88K/E61Q, D20A/E61Q, H16R/D20A, D20W/E61Q, H16E/E61Q, H16E/M104L, N88K/M104T, D20A/H16E, D20A/H16E/E16Q, D20A/H16R/E16Q, V91K/D20W, V91A/H16A, V91A/H16D, V91A/H16E, V91A/H16S, V91E/H16A, V91E/H16D, V91E/H16E, V91E/H16S, V91K/H16A, V91K/H16D, V91K/H16S, V91S/H16E, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, N30S, Y31H, K35R, V69A, Q74P, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R и/или E95G, и предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки.

4. Химерная молекула человеческого IL-2 по п. 3, дополнительно содержащая замену в положении C125A.

5. Fc-слитый белок, содержащий Fc, полипептид человеческого IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, и агонист рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), выбранный из группы, состоящей из антитела к OX40,

антитела к DR3 и TNF.

6. Fc-слитый белок по п. 5, где антитело к OX40 представляет собой антитело к OX40, где антитело к OX40 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO:9, аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO:10 или как последовательность тяжелой цепи антитела под SEQ ID NO:9, так и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO:10.

7. Fc-слитый белок по п. 5 или п. 6, где Fc представляет собой Fc человеческого IgG1.

8. Fc-слитый белок по п. 7, где Fc человеческий IgG1 содержит одну или несколько мутаций, приводящих к изменению эффекторной функции указанного Fc, при этом человеческий IgG1 содержит замену N297G.

9. Fc-слитый белок по любому из пп. 5-8, предусматривающий замену или делецию C-концевого лизина в указанном Fc человеческого IgG.

10. Fc-слитый белок по п. 9, где C-концевой лизин в указанном Fc человеческого IgG удален.

11. Fc-слитый белок по любому из пп. 5-10, где линкер соединяет части Fc и полипептида человеческого IL-2 в указанном белке.

12. Fc-слитый белок по любому из пп. 5-10, где линкер соединяет части Fc и агониста рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) в указанном белке.

13. Fc-слитый белок по п. 11 или п. 12, где линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7).

14. Fc-слитый белок по любому из пп. 5-13, где первый линкер соединяет части Fc и полипептида человеческого IL-2 указанного белка, и второй линкер соединяет части Fc и агониста рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) в указанном белке.

15. Fc-слитый белок по п. 14, где первый линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7), и второй линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7).

16. Fc-слитый белок по любому из пп. 5-15, где химерная молекула IL-2 дополнительно предусматривает добавление, замену или делецию аминокислоты, приводящие к изменению профиля гликозилирования указанного Fc-слитого белка при экспрессии в клетках млекопитающих, при этом добавление, замена или делеция, приводящие к изменению профиля гликозилирования, представляют собой замену T3N, T3A или S5T.

17. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая химерную молекулу человеческого IL-2 по любому из пп. 1-4.

18. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-слитый белок по любому из пп. 5-16.

19. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 17 или п. 18, функционально связанную с промотором.

20. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 17-19.

21. Способ получения химерной молекулы человеческого IL-2, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п. 20 в условиях, при которых осуществляется экспрессия с указанного промотора, и сбор химерной молекулы человеческого IL-2 из указанной культуры.

22. Способ получения Fc-слитого белка, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п. 20 в условиях, при которых осуществляется экспрессия с указанного промотора, и сбор Fc-слитого белка из указанной культуры.

23. Способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в популяции Т-клеток или в периферической крови субъекта, предусматривающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством химерной молекулы человеческого IL-2 по любому из пп. 1-4 или Fc-слитого белка по любому из пп. 5-15.

24. Способ по п. 23, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3-клеткам повышается.

25. Способ по п. 24, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается на по меньшей мере 50%.

26. Способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к естественным клеткам-киллерам (NK) в периферической крови субъекта, предусматривающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством химерной молекулы человеческого IL-2 по любому из пп. 1-4 или Fc-слитого белка по любому из пп. 5-15.

27. Способ по п. 26, где повышается отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19-лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16.

28. Способ по п. 27, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается на по меньшей мере 50%.

29. Способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, при этом указанный способ предусматривает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества химерной молекулы человеческого IL-2 по любому из пп. 1-4 или Fc-слитого белка по любому из пп. 5-15.

30. Способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием по п. 29, где введение приводит к ослаблению по меньшей мере одного симптома заболевания.

31. Способ по п. 30, где отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта повышается после введения.

32. Способ по п. 30, где отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта остается по сути неизменным после введения.

33. Способ по любому из пп. 29-32, где воспалительное или аутоиммунное

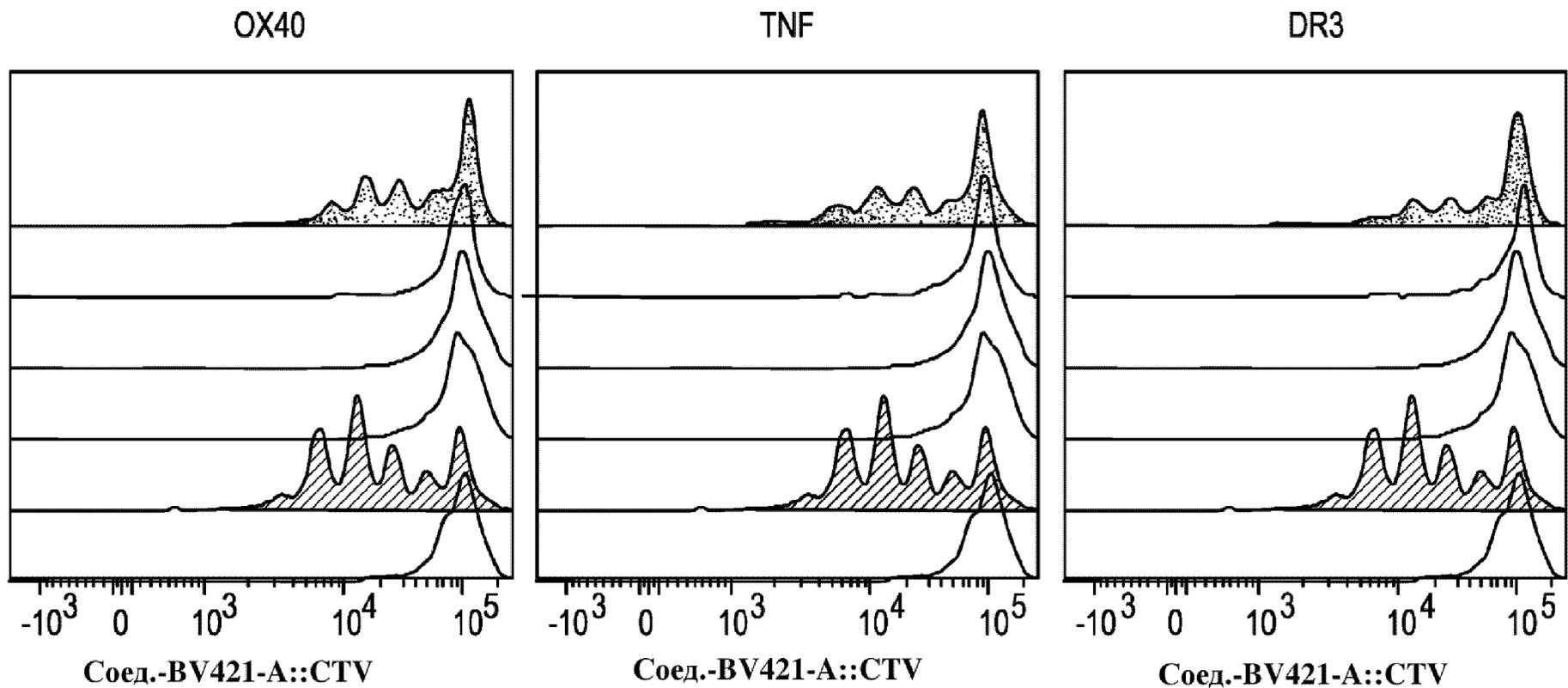
заболевание представляет собой воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилозирующий спондилоартрит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный реактивный артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилоартрит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (SLE), тяжелую миастению, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, глютеновую болезнь, рассеянный склероз (MS), астму, COPD, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, GVHD, отторжение трансплантата, повреждение почек, васкулит, индуцированный гепатитом С или самопроизвольное прерывание беременности.

34. Способ по любому из пп. 29-32, где воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку (SLE), реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом С, диабет I типа, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, самопроизвольное прерывание беременности, атопические заболевания и воспалительные заболевания кишечника, в том числе язвенный колит, глютеновую болезнь.

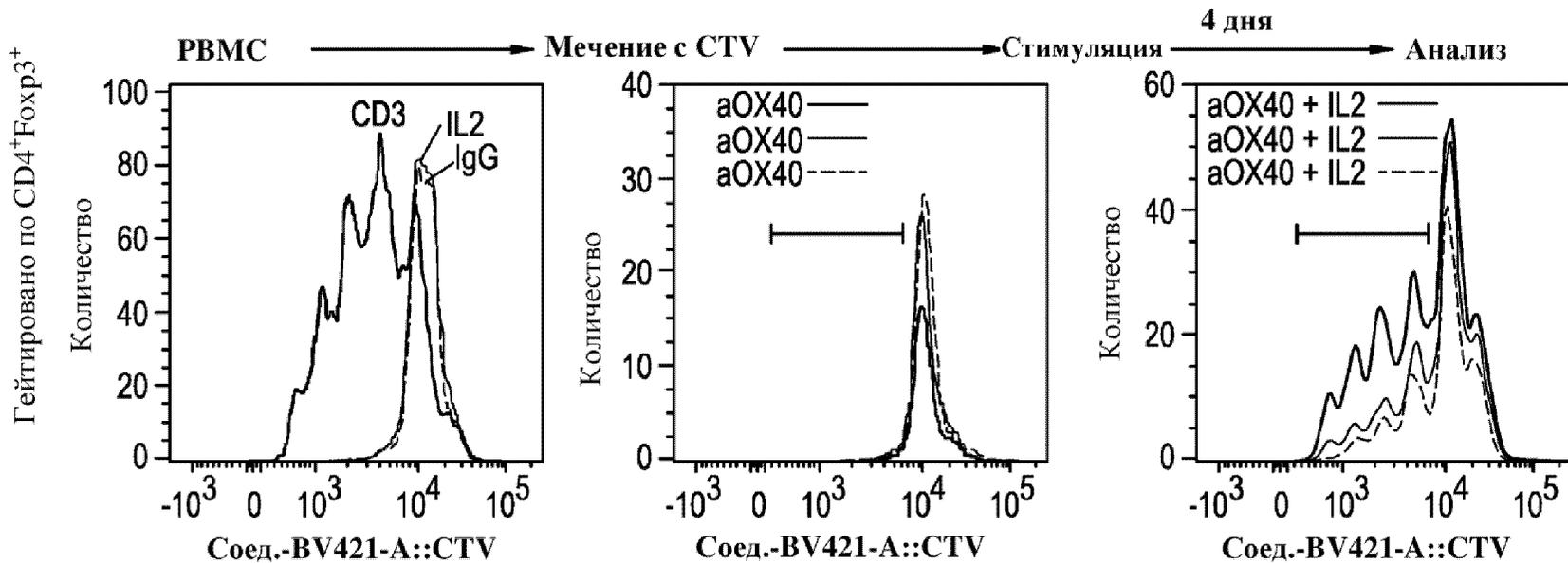
35. Способ по любому из пп. 29-32, где воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом С, диабет I типа, диабет II типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, очаговую алопецию, атеросклероз, псориаз, отторжение трансплантированного органа, синдром Шегрена, болезнь Бехчета, самопроизвольное прерывание беременности, атопические заболевания, астму или воспалительные заболевания кишечника.

По доверенности

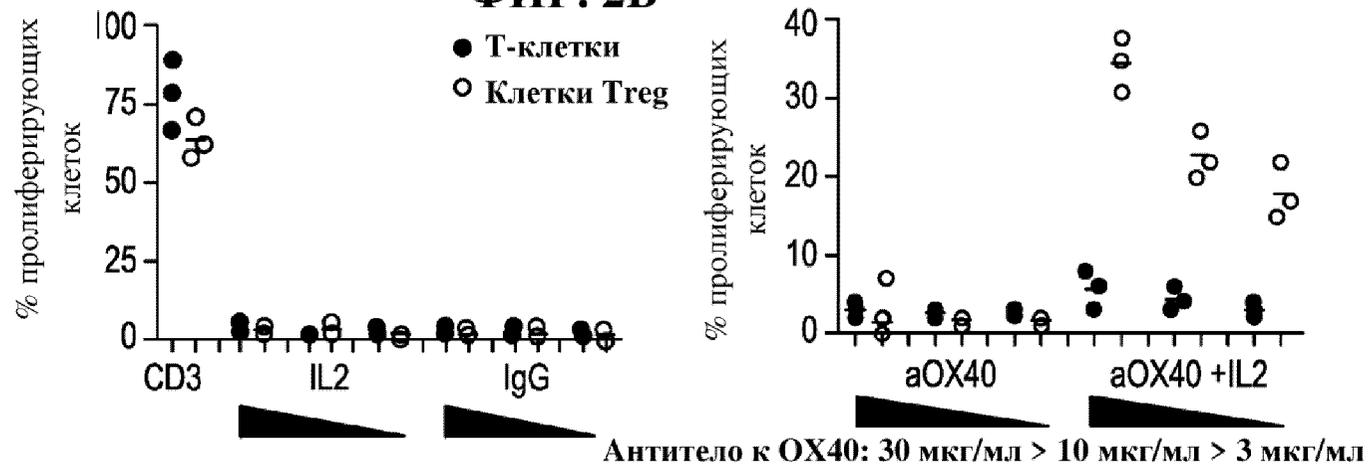
**ФИГ. 1**



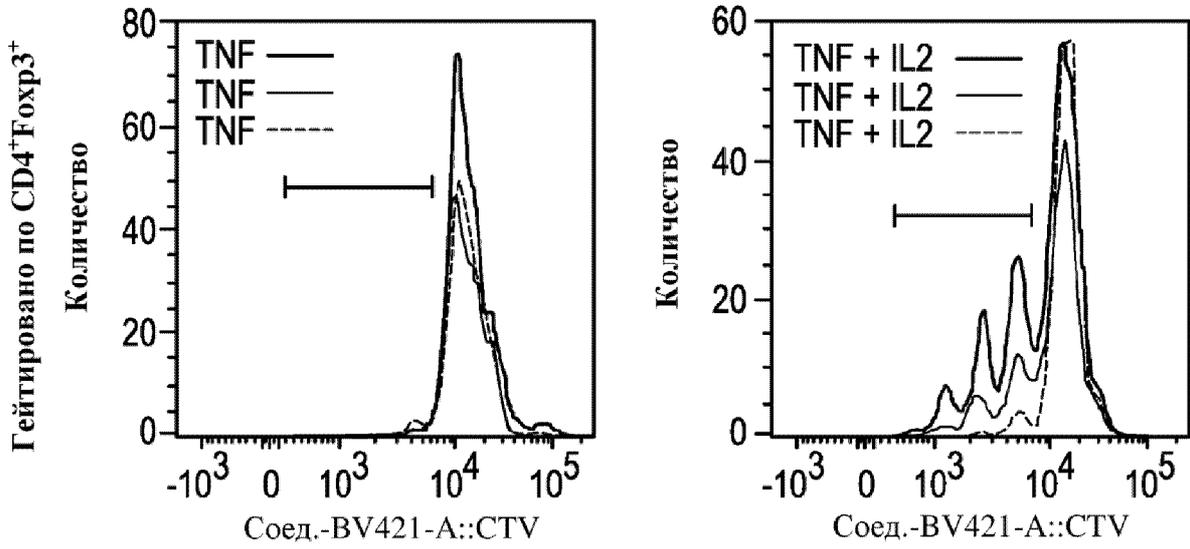
**ФИГ. 2А**



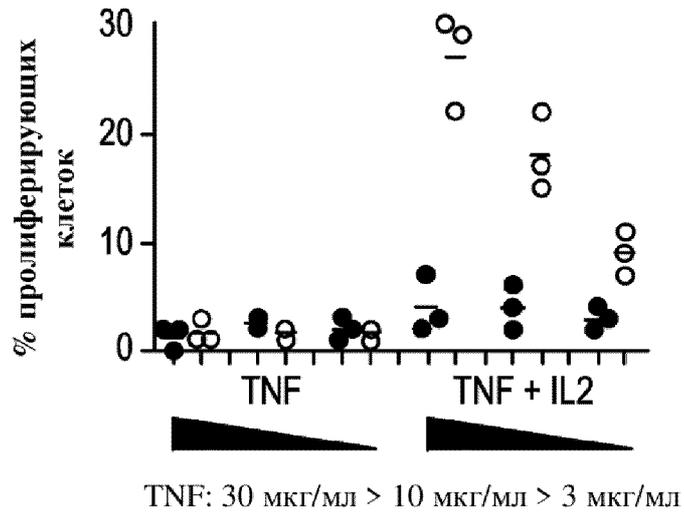
**ФИГ. 2В**



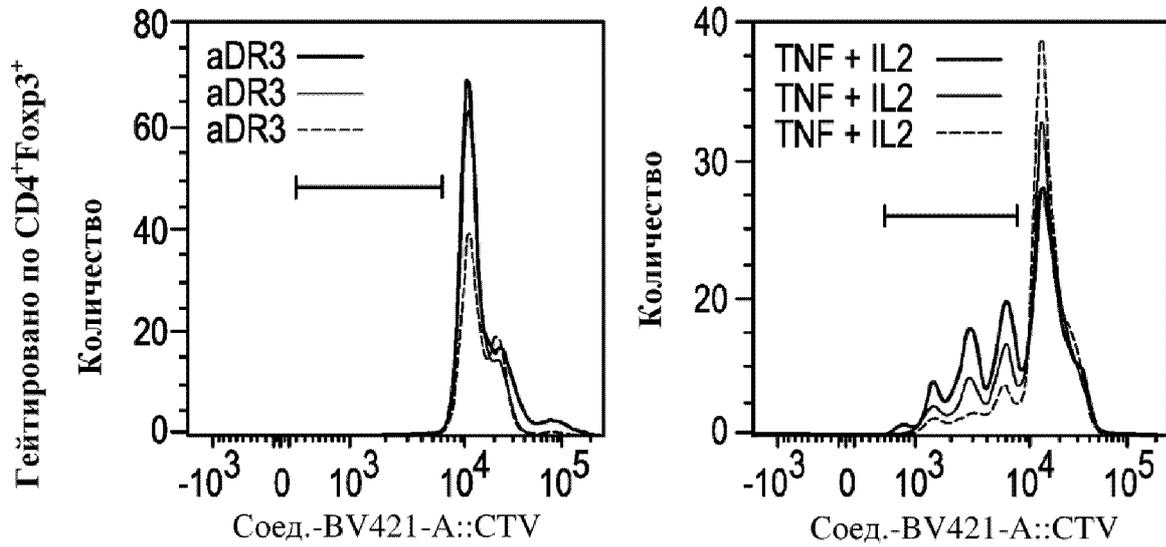
ФИГ. 3А



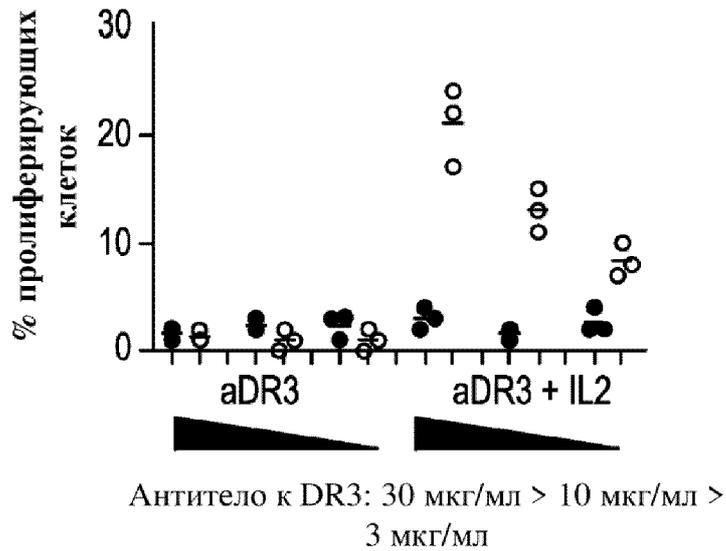
ФИГ. 3В



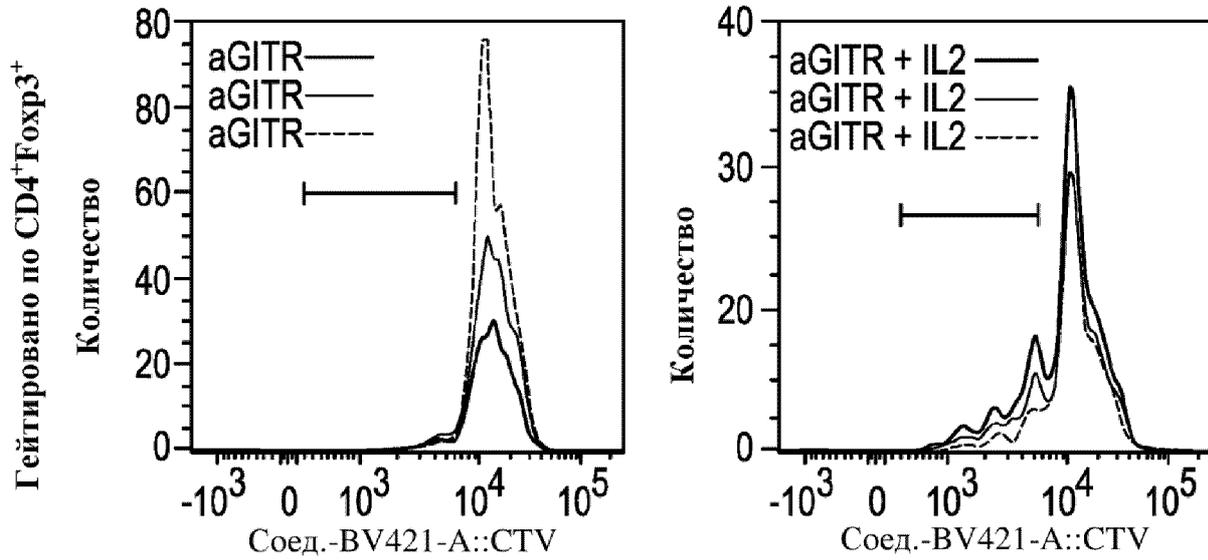
ФИГ. 4А



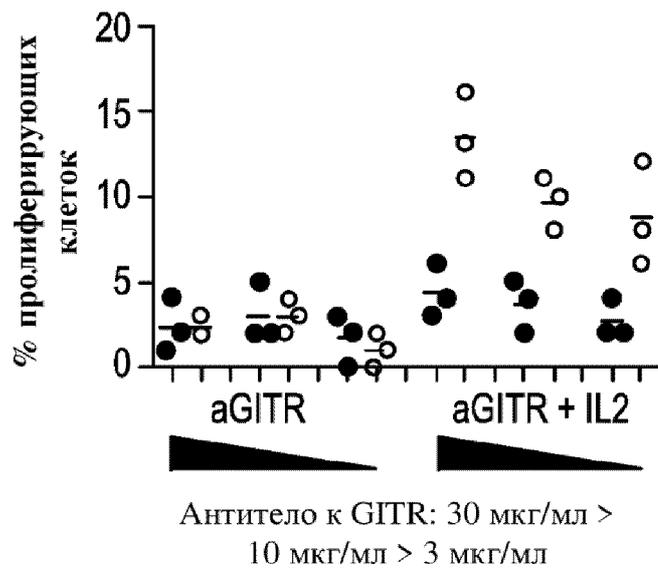
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А

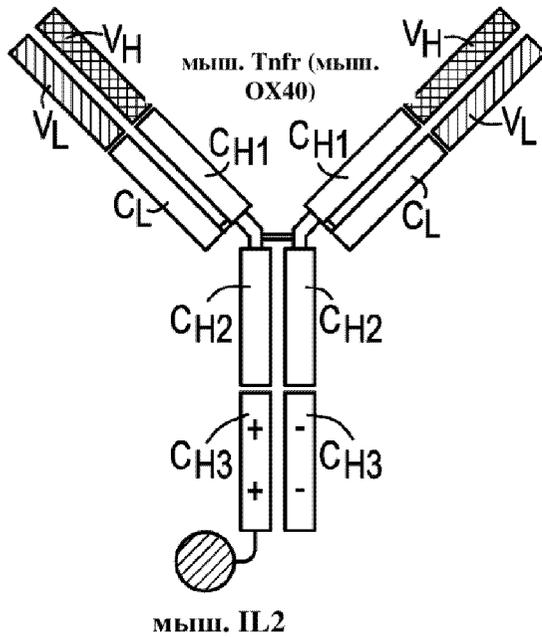


ФИГ. 5В



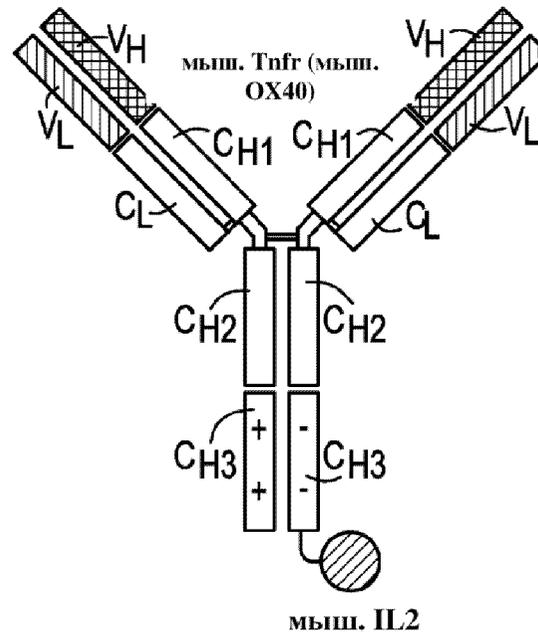
## ФИГ. 6

№ 1 ат. к мыш. OX40 мыш. IgG2  
LALA-PG  
(+)-мыш. IL2 + ат. к мыш. OX40  
мыш. IgG2  
LALA-PG(-) + ат. к мыш. OX40 LC  
SST224615



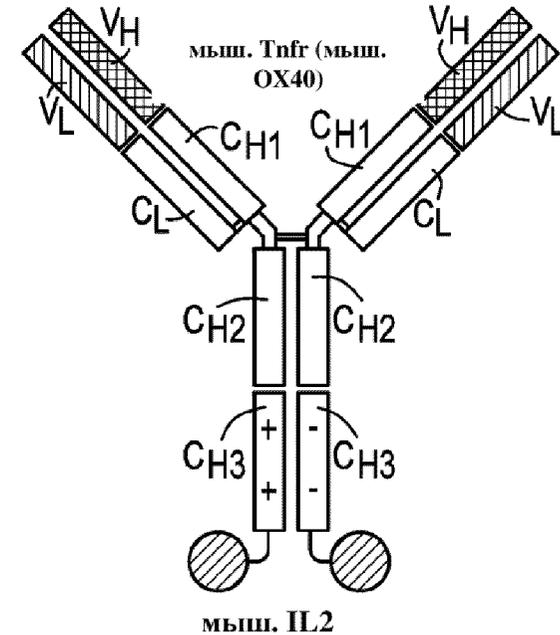
[мыш. Tnfrsf4 OX86-новая VH,  
мыш. IgG2a LALA-PG KK, мыш. IL2(21-  
169, T23A, P71T, C160A)] + [OX86-новая,  
muIgG2a LALA-PG DD] + [OX86-новая  
LC]

№ 2 ат. к мыш. OX40 мыш. IgG2 LALA-PG  
(-)-мыш. IL2 + ат. к мыш. IgG2 OX40  
мыш. IgG2  
LALA-PG(+) + ат. к мыш. OX40 LC  
SST224616



[мыш. Tnfrsf4 OX86-новый VH,  
мыш. IgG2a LALA-PG DD, мыш. IL2(21-  
169, T23A, P71T, C160A)] + [OX86-новая,  
мыш. IgG2a LALA-PG KK] + [OX86-новая  
LC]

№ 3 ат. к мыш. OX40 мыш. IgG2  
LALA-PG-  
мыш. IL2 + ат. к мыш. OX40 LC  
SST224617



[мыш. Tnfrsf4 OX86-новый VH,  
мыш. IgG2a LALA-PG, мыш. IL2(21-169,  
T23A, P71T, C160A)] + [OX86-новая,  
мыш. IgG2a LALA-PG DD] + [OX86-  
новая LC]

**ФИГ. 7**

