



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120847** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2016 09263	(72) Винахідник(и): Кляйн Крістіан (CH), Умана Пабло (CH), Мьосснер Еккехард (CH), Хоссе Ральф (CH), Петерсон Лоренс Бернард (GB), Вікер Лінда (GB)
(22) Дата подання заявки: 04.02.2015	(73) Власник(и): Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2020	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/936,564	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012178137 A1, 27.12.2012 WO 03048334 A2, 12.06.2003 WO 2010085495 A1, 29.07.2010 WO 2012146628 A1, 01.11.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 06.02.2014	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 26.12.2016, Бюл.№ 24	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2020, Бюл.№ 4	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2015/052312, 04.02.2015	

(54) ЗЛИТИЙ БЛОК ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується злитого білка, що містить (I) молекулу імуноглобуліну, яка не має здатності специфічно зв'язуватися з антигеном, і (II) дві мутантні молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), які містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора 1L-2, який має проміжну афінність, у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, полінуклеотиду, що його кодує, вектора, клітини-зазаяїна, способу одержання, фармацевтичної композиції та способу вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

UA 120847 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід в цілому відноситься до злитих білків імуноглобулінів і інтерлейкіну-2 (IL-2). Більш конкретно, винахід відноситься до злитих білків імуноглобулінів і мутантного IL-2, які мають покращенні властивості з точки зору застосування як терапевтичних засобів, наприклад, при лікуванні аутоімунних захворювань та імуноопосередкованих запальних захворювань. Окрім того, даний винахід відноситься до полінуклеотидів, що кодують зазначені злиті білки, і до векторів і клітин-хазяїв, що містять зазначені полінуклеотиди. Винахід відноситься також до способів одержання злитих білків, що запропоновані у винаході, і до способів їх застосування для лікування захворювання.

Передумови створення винаходу

Регуляторні Т-клітини (Treg-клітини) представляють собою специфічні субпопуляції Т-лімфоцитів, які мають вирішальне значення для підтримання ауто толерантності. Ці CD4⁺CD25^{hi}-клітини, що мають супресорну функцію, можуть відрізнятися від ефекторних Т-клітин внутрішньоклітинною експресією фактора транскрипції FOXP3, а також інших клітинних маркерів, таких як CD127^{lo}, CTLA-4⁺, LAP, CD39⁺, PD-1⁺, GARP тощо. FOXP3 має вирішальне значення для диференціювання й функції Treg, і дефіцит і мутації гена FOXP3, як це має місце у scurfy-мишей (миші, гемізиготні за Х-зчепленою мутацією, яка призводить до лімфопроліферативних захворювань), і у пацієнтів зі зчепленим з Х-хромосомою синдромом імунної дисрегуляції, поліендокринопатії, ентеропатії (IPEX), приводять до порушення ауто толерантності й розвитку аутоімунних захворювань в результаті дефіциту або відсутності функції Treg.

З дефіцитом Treg-клітин або функції Treg корелюють аутоімунні відповіді, які проявляються у вигляді діабету типу 1, системного червоного вовчака (SLE), розсіяного склерозу й багатьох інших захворювань. Дані, одержані на тваринних моделях, підтвердили гіпотезу про те, що виникненню зазначених аутоімунних відповідей сприяє порушення здатності Treg-клітин контролювати деструктивну аутоімунну відповідь, в значному ступені внаслідок впливів аутореактивних ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті. Діабет типу 1 представляє собою аутоімунне захворювання, яке виникає після деструкції основної частини β-клітин, які продукують інсулін в підшлунковій залозі. Частота виникнення діабету 1 типу складає ~0,3 % у популяції жителів США і його зустрічальність продовжує зростати в США, Європі й, зокрема, в Скандинавії (приблизно 1 %), і очікується, що протягом наступних 20 років число випадків захворювання збільшиться вдвічі.

Цитокін IL-2 грає основну роль в активації й функції як Treg-клітин, так і ефекторних Т-клітин (Teff). Дефіцит вироблення IL-2 або зниження чутливості до нього приводить головним чином до зниження функції Treg і підвищенню імовірності проявлення аутоімунітету. Оскільки Treg-клітини конститутивно експресують більш високі рівні високоафінного рецептора IL-2 у порівнянні з Teff-клітинами, то низькі дози IL-2 підтримують головним чином Treg-, а не Teff-клітини.

З урахуванням того, що IL-2 впливає, насамперед, на активацію Treg in vitro й in vivo, можна припускати, що терапія на основі застосування в низьких дозах IL-2, який характеризується тривалим часом життя, повинна з високою ймовірністю мати сприятливий вплив на аутоімунні захворювання. В кінці 2013 року було розпочате подвійне сліпе плацебо-контрольоване клінічне випробування IL-2 (Proleukin[®], рекомбінантний людський IL-2) на 200 пацієнтах з діабетом типу 1. У сучасних клінічних дослідженнях продемонстровано, що щоденне застосування пролейкіну в низьких дозах полегшувало деякі ознаки й симптоми хронічної реакції "трансплантат-проти-хазяїна" (GVHD) й індукованого вірусом гепатиту С васкуліту (Koreth та ін., New Engl J Med 365, 2011, сс. 2055-2066, Saadoun та ін., New Engl J Med 365, 2011, сс. 2067-2077). В обох дослідженнях встановлено, що низькі дози Proleukin[®] індукували Treg і підвищували співвідношення Treg:Teff. Однак фармакокінетичні (ФК) властивості Proleukin[®] виявились незадовільними, що не дозволяло оптимальним чином підтримувати низькі постійні рівні IL-2 в організмі людини. Інші вивчені в клінічних дослідженнях методи передбачали розмноження Treg-клітин конкретного індивідуума ex vivo з наступною реінфузією, але цей підхід виявився не дуже вдалим через проблеми з контролем якості.

Таким чином, новий терапевтичний підхід, який відновлює опосередковану природними регуляторними Т-клітинами (Treg) домінуючу імунну толерантність і суттєво мінімізувати будь-які стимулювальні впливи на ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті, може в значному ступені підвищувати можливість лікування пацієнтів, що страждають на аутоімунні захворювання, такими як діабет типу 1, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, хвороба Крона, а також іншими аутоімунними захворюваннями і прозапальними захворюваннями, які мають імунну основу, такими як хронічна реакція "трансплантат-проти-хазяїна", астма, легеневий фіброз, хронічне обструктивне захворювання легенів, серцево-судинними хворобами, такими як

атеросклероз і гострий коронарний синдром, і реакція відторгнення трансплантату, як солідного органу, так і кісткового мозку.

У WO 2009/135615 описано застосування вже відомого мутеїну IL-2 (IL-2 N88R, BAY50-4798, описаного в WO 1999/60128) для терапії або профілактики аутоімунного захворювання.

5 Встановлено, що мутеїн IL-2 має більш високу активність відносно Treg-клітин у порівнянні з IL-2 дикого типу, при цьому він має слабкий вплив на CD8⁺-Т-клітини і NK-клітини. Не описані злиті білки, які містять мутеїн IL-2.

У WO 2010/85495 описані варіанти IL-2, які вибірково стимулюють активність Treg-клітин у порівнянні з нерегуляторними Т-клітинами, призначеними для лікування запальних порушень.

10 Описані варіанти IL-2 містять комбінацію восьми або більшої кількості амінокислотних замінів, які впливають на зв'язування з різними субодинамицями рецептора IL-2.

Злиті білки, які містять IL-2, відповідно до даного винаходу активують переважно людські й нелюдські Treg-клітини, зсуваючи баланс у бік більш високого співвідношення Treg:Teff, і знижують аутоімунну відповідь. Вони мають тривалий період життя, що дозволяє застосовувати зручні схеми дозування, і у них відсутні ефекторні функції, що знижує потенційні побічні дії й негативний вплив на ефективність.

15

Коротке викладення суті винаходу

Одним з об'єктів винаходу є злитий білок, що містить (I) молекулу імуноглобуліну, і (II) дві мутантні молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), які містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до Fc-рецептора, що має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу.

20

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою молекулу імуноглобуліну IgG-класу, насамперед молекулу імуноглобуліну IgG₁-підкласу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою молекулу людського імуноглобуліну. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою моноклональне антитіло. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну не має здатності до специфічного зв'язування з антигеном. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vh3-23. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 9. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vk3-20. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 11. В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 9 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 11. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну не має здатності до специфічного зв'язування з антигеном і містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vh3-23, і містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vk3-20.

30

35

40

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить модифікацію, яка знижує афінність зв'язування молекули імуноглобуліну з Fc-рецептором у порівнянні з відповідною молекулою імуноглобуліну без зазначеної модифікації. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою Fcγ-рецептор, насамперед, людський Fcγ-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою активувальний Fc-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор вибирають з групи, що містить FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89). В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою FcγRIIIa, насамперед, людський FcγRIIIa. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація знижує ефекторну функцію молекули імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена ефекторна функція представляє собою антитіло-зумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація знаходиться в Fc-області, насамперед, в CH2-області зазначеної молекули імуноглобуліну. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотну заміну в положенні 329 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу

45

50

55

60

зазначена амінокислотна заміна представляє собою P329G. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни в положеннях 234 і 235 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені амінокислотні заміни представляють собою L234A і L235A (LALA). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни в положеннях 234, 235 і 329 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G (EU-нумерація) у важких ланцюгах імуноглобуліну.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять амінокислотну мутацію в положенні, що відповідає залишку 88 людського IL-2 (SEQ ID NO: 1). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена амінокислотна мутація представляє собою амінокислотну заміну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена амінокислотна заміна представляє собою N88D. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені молекули IL-2 додатково містять амінокислотну мутацію, яка не змінює афінність зв'язування зазначених молекул IL-2 з рецептором IL-2 у порівнянні з наявними в природних умовах нативним IL-2. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені молекули IL-2 містять амінокислотну мутацію в положенні, яке відповідає залишку 125 людського IL-2. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена амінокислотна мутація представляє собою амінокислотну заміну C125A. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена мутантна молекула IL-2 додатково містить амінокислотну мутацію, яка елімінує сайт О-глікозилювання IL-2 в положенні, що відповідає залишку 3 людського IL-2. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена амінокислотна мутація, яка елімінує сайт О-глікозилювання IL-2 в положенні, що відповідає залишку 3 людського IL-2 представляє собою амінокислотну заміну, вибрану з групи T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K і T3P. В конкретному варіанті здійснення винаходу амінокислотна мутація, яка елімінує сайт О-глікозилювання IL-2 в положенні, що відповідає залишку 3 людського IL-2, представляє собою T3A. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 представляють собою молекули людського IL-2. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність, вибрану з групи SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 і SEQ ID NO: 64, насамперед послідовність SEQ ID NO: 58. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 мають послідовність, вибрану з групи SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 і SEQ ID NO: 64, насамперед послідовність SEQ ID NO: 58. В одному з варіантів здійснення винаходу кожна із зазначених мутантних молекул IL-2 злита на своїй N-кінцевій амінокислоті з C-кінцевою амінокислотою одного з імуноглобулінових важких ланцюгів зазначеної молекули імуноглобуліну, необов'язково через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу кожна із зазначених мутантних молекул IL-2 злита із зазначеною молекулою імуноглобуліну через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить щонайменше 10, насамперед щонайменше 15 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 66).

В конкретному варіанті здійснення винаходу, зазначений злитий білок містить поліпептидні послідовності SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 50. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений злитий білок містить легкий ланцюг імуноглобуліну, що має SEQ ID NO: 19, і злитий поліпептид: важкий ланцюг імуноглобуліну-IL-2, що має SEQ ID NO: 50. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок практично складається з молекули імуноглобуліну, двох мутантних молекул інтерлейкіну-2 (IL-2), що містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, і необов'язково один або декілька пептидних лінкерів. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок практично складається з двох легких ланцюгів імуноглобуліну, що мають SEQ ID NO: 19, і двох злитих поліпептидів: важкий ланцюг імуноглобуліну-IL-2, що мають SEQ ID NO: 50.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини у порівнянні з ефекторними Т-клітинами, насамперед з канонічними $CD4^+$ -Т-клітинами і $CD8^+$ -Т-клітинами. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини у порівнянні з канонічними $CD4^+$ -Т-клітинами пам'яті. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок активує регуляторні Т-клітини щонайменше в 10 разів, щонайменше в 100 разів або щонайменше в 1000 разів в більшому ступені, ніж канонічні $CD4^+$ -Т-клітини пам'яті. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначену активацію визначають шляхом вимірювання рівнів

фосфорилування внутрішньоклітинного STAT, насамперед STAT5. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене вимірювання рівнів фосфорилування внутрішньоклітинного STAT здійснюють за допомогою аналізу методом проточної цитометрії.

У винаході також запропонований полінуклеотид, що кодує злитий білок, відповідно до винаходу. Окрім того, запропонований вектор, насамперед експресійний вектор, що містить полінуклеотид, відповідно до винаходу. Наступним об'єктом винаходу є клітина-хазяїн, що містить полінуклеотид або вектор, відповідно до винаходу. У винаході також запропонований спосіб одержання злитого білка згідно з винаходом, який полягає в тому, що здійснюють стадії, на яких (I) культивують клітину-хазяїна, запропоновану у винаході, в умовах, придатних для експресії злитого білка, і (II) виділяють злитий білок. Запропонований також злитий білок, що містить (I) молекулу імуноглобуліну і (II) дві молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), які містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, одержаний зазначеним способом.

Одним з об'єктів винаходу є фармацевтична композиція, що містить злитий білок, відповідно до винаходу, і фармацевтично прийнятний носій. Винахід відноситься також до злитого білка або фармацевтичної композиції, запропонованого/запропонованої у винаході, для застосування як лікарського засобу, і до застосування для лікування або профілактики аутоімунного захворювання, зокрема, діабету типу 1, розсіяного склерозу (MS), системного червоного вовчак (SLE), запального захворювання кишечника, хвороби Крона або неспецифічного виразкового коліту, більш конкретно діабету типу 1 або реакції "трансплантат-проти-хазяїна" або відторгнення трансплантату. Також запропоновано застосування злитого білка, згідно з винаходом, для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування захворювання в індивідумі, який цього потребує, і спосіб лікування захворювання в індивідумі, який полягає в тому, що зазначеному індивідуму в терапевтично ефективній кількості вводять композицію, яка містить злитий білок, відповідно до винаходу, в фармацевтично прийнятній формі. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене захворювання представляє собою аутоімунне захворювання. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначене аутоімунне захворювання представляє собою діабет типу 1, розсіяний склероз (MS), системний червоний вовчак (SLE), запальне захворювання кишечника, хворобу Крона або неспецифічний виразковий коліт. В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначене аутоімунне захворювання представляє собою діабет типу 1. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначене захворювання представляє собою відторгнення трансплантату або реакцію "трансплантат-проти-хазяїна". В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений індивідум представляє собою ссавця, насамперед людину.

Запропонований також злитий білок, відповідно до винаходу, призначений для застосування для вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активація охоплює індукцію проліферації регуляторних Т-клітин і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор, насамперед фосфорилування STAT5, в регуляторних Т-клітинах. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене застосування представляє собою застосування *in vitro*, і зазначений злитий білок застосовують в концентрації приблизно 10 нг/мл або менше, насамперед приблизно 1 нг/мл або менше. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначене застосування представляє собою застосування *in vivo*, і зазначений злитий білок застосовують в дозі приблизно 100 мкг/кг ваги тіла або менше, насамперед приблизно 25 мкг/кг ваги тіла або менше, більш конкретно приблизно 10 мкг/кг ваги тіла або менше.

У винаході запропонований також спосіб вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*, який полягає в тому, що приводять у контакт зазначені регуляторні Т-клітини зі злитим білком, запропонованим у винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активація охоплює індукцію проліферації регуляторних Т-клітин і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор, насамперед фосфорилування STAT5, в регуляторних Т-клітинах. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений спосіб представляє собою спосіб *in vitro*, і зазначений злитий білок застосовують в концентрації приблизно 10 нг/мл або менше, насамперед приблизно 1 нг/мл або менше. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначений спосіб представляє собою спосіб *in vivo*, і зазначений злитий білок застосовують в дозі приблизно 100 мкг/кг ваги тіла або менше, насамперед приблизно 25 мкг/кг ваги тіла або менше, більш конкретно приблизно 10 мкг/кг ваги тіла або менше.

Короткий опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 – результати очистки злитого білка DP47GS IgG-IL-2 (див. SEQ ID NO: 13, 15, 19).

(А) Профіль елюції, одержаний на стадії афінної хроматографії на білку А. (Б) Профіль елюції, одержаний на стадії гель-фільтрації. Вихід 4 мг/л. (В) Результати аналітичного капілярного електрофорезу в присутності ДСН (система Caliper) кінцевого продукту. Були виявлені наступні смуги: невідновлювальні умови: 7,5 % площі відповідає 111 кДа, 92,5 % площі відповідає 174 кДа; відновлювальні умови: 23,6 % площі відповідає 29 кДа, 23,5 % площі відповідає 67 кДа, 52,9 % площі відповідає 82 кДа. Продукт містив приблизно 7,5 % "половинного IgG". (Г) Результати аналітичної гель-фільтрації кінцевого продукту на колонці TSKgel G3000 SW XL (вміст мономерів: 91 %);

на фіг. 2 - результати очистки злитого білка DP47GS IgG-(IL-2)₂ (див. SEQ ID NO: 17, 19). (А) Профіль елюції, одержаний на стадії афінної хроматографії на білку А. (Б) Профіль елюції, одержаний на стадії гель-фільтрації. Вихід 13 мг/л. (В) Результати аналітичного капілярного електрофорезу в присутності ДСН (система Caliper) кінцевого продукту. Були виявлені наступні смуги: невідновлювальні умови: 2,3 % площі відповідає 172,5 кДа, 97,7 % площі відповідає 185 кДа; відновлювальні умови: 18,3 % площі відповідає 27,3 кДа, 0,6 % площі відповідає 29,2 кДа, 81,1 % площі відповідає 78,3 кДа. (Г) Результати аналітичної гель-фільтрації кінцевого продукту на колонці Супердекс 200 (вміст мономерів: 100 %);

на фіг. 3 - результати очистки злитого білка DP47GS IgG-IL-2 N88D (див. SEQ ID NO: 15, 19, 48). (А) Профіль елюції, одержаний на стадії афінної хроматографії на білку А. (Б) Профіль елюції, одержаний на стадії гель-фільтрації. Вихід 23,7 мг/л. Зібрані фракції виділені рамкою. (В) Результати аналітичного капілярного електрофорезу в присутності ДСН (система Caliper) кінцевого продукту. Були виявлені наступні основні смуги: невідновлювальні умови: 100 % площі відповідає 167,0 кДа; відновлювальні умови: 31,5 % площі відповідає 28,6 кДа, 31,7 % площі відповідає 63,5 кДа, 35,3 % площі відповідає 77,5 кДа. (Г) Результати аналітичної гель-фільтрації кінцевого продукту на колонці TSKgel G3000 SW XL (вміст мономерів 97,3 %);

на фіг. 4 - результати очистки злитого білка DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 50). (А) Профіль елюції, одержаний на стадії афінної хроматографії на білку А. (Б) Профіль елюції, одержаний на стадії гель-фільтрації. Вихід 32,9 мг/л. Зібрані фракції виділені рамкою. (В) Результати аналітичного капілярного електрофорезу в присутності ДСН (система Caliper) кінцевого продукту. Були виявлені наступні основні смуги: невідновлювальні умови: 20,7 % площі відповідає 180,4 кДа, 78,0 % площі відповідає 184,0 кДа; відновлювальні умови: 16,2 % площі відповідає 27,3 кДа, 82,7 % площі відповідає 76,0 кДа. (Г) Результати аналітичної гель-фільтрації кінцевого продукту на колонці TSKgel G3000 SW XL (вміст мономерів 98,3 %);

на фіг. 5 - результати очистки злитого білка DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 52). (А) Профіль елюції, одержаний на стадії афінної хроматографії на білку А. (Б) Профіль елюції, одержаний на стадії гель-фільтрації. Вихід 8,0 мг/л. Зібрані фракції виділені рамкою. (В) Результати аналітичного капілярного електрофорезу в присутності ДСН (система Caliper) кінцевого продукту. Були виявлені наступні основні смуги: невідновлювальні умови: 10,3 % площі відповідає 166,0 кДа, 61,4 % площі відповідає 175,5 кДа, 28,2 % площі відповідає 181,2 кДа; відновлювальні умови: 16,0 % площі відповідає 26,1 кДа, 83,1 % площі відповідає 75,0 кДа. (Г) Результати аналітичної гель-фільтрації кінцевого продукту на колонці TSKgel G3000 SW XL (вміст мономерів 100 %);

на фіг. 6 – дані про експресію CD25 (IL-2RA) і CD122 (IL-2RB) на субпопуляціях CD4⁺-Treg, субпопуляціях NK-клітин і NKT-клітинах. Для визначення субпопуляцій CD4⁺-Treg, NKT-клітин і NK-клітин застосовували маркери клітинної поверхні. Для оптимізації забарвлювання CD25 і CD122 не здійснювали внутрішньоклітинне FOXP3-забарвлювання. (А, Б) Три популяції регуляторних CD4⁺-Т-клітин (Treg): наївні (CD45RA⁺, CD25⁺; пунктирна лінія), клітини пам'яті (CD45RA⁺, CD25⁺; суцільна лінія) і активовані (CD45RA⁺, CD25^{hi}; штрихова лінія). (В, Г) NKT (пунктирна лінія), CD56^{bright} NK-клітини (штрихова лінія), CD56^{intermediate} NK-клітини (суцільна лінія). Сірим кольором позначені результати для контролю ізотипу (IC);

на фіг. 7 - дані про експресію CD25 (IL-2RA) і CD122 (IL-2RB) на CD4⁺- і CD8⁺-субпопуляціях канонічних Т-клітин. Застосовували маркери клітинної поверхні для визначення наївних (CD45RA⁺; пунктирна лінія) і канонічних CD4⁺-Т-клітин пам'яті (CD45RA⁺; суцільна лінія) (А, Б), канонічних CD8⁺-Т-клітин пам'яті (CD45RA⁺; суцільна лінія) і CD45RA⁺-CD8-Т-клітин (комбінація субпопуляцій наївних клітин і TEMRA; TEMRA означає ефекторні клітини пам'яті, переспрямовані на експресію CD45RA; пунктирна лінія) (В, Г). Сірим кольором позначені результати для контролю ізотипу (IC);

на фіг. 8 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові у відповідь на обробку DP47GS IgG-IL-2. Для трьох різних донорів (C4-C6) оцінювали в різні моменти часу впливу різних доз DP47GS IgG-IL-2 на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій CD4⁺-Treg: активовані, клітини пам'яті і

наївні Treg; канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті; CD56^{bright} NK-клітини; ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті; наївні ефекторні CD4⁺-Т-клітини; NK-клітини; NKT-клітини; і наївні ефекторні CD8⁺-Т-клітини + CD45RA⁺-клітини пам'яті;

на фіг. 9 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові в відповідь на обробку DP47GS IgG-(IL-2)₂. Для п'яти різних донорів (N1, N2, C4-C6) оцінювали в різні моменти часу впливу різних доз імунотонікатора DP47GS IgG-(IL-2)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій CD4⁺-Treg: активовані, клітини пам'яті і наївні Treg; канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті; CD56^{bright} – NK-клітини; ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті; наївні ефекторні CD4⁺-Т-клітини; NK-клітини; NKT-клітини; і наївні ефекторні CD8⁺-Т-клітини + CD45RA⁺-клітини пам'яті;

на фіг. 10 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові: порівняння DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂. Результати, одержані для кожної субпопуляції клітин, стандартизували відносно максимального виявленого впливу на кожну субпопуляцію і приблизні величини EC₅₀ для Treg представлені в таблиці 2. (А) стандартизовані результати для DP47GS IgG-IL-2, (Б) стандартизовані результати для DP47GS IgG-(IL-2)₂;

на фіг. 11 – деталізована порівняльна оцінка чутливості до DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂ субпопуляції Treg трьох донорів. На графіках представлені середні значення ± СКО величин MFI (середня інтенсивність флуоресценції) pSTAT5a для трьох донорів. (А) загальна кількість CD3⁺, CD4⁺, FoxP3⁺-Treg, (Б) активовані Treg, (В) Treg пам'яті, (Г) наївні Treg;

на фіг. 12 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові в відповідь на обробку DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂. Для трьох різних донорів (C4-C6) оцінювали в різні моменти часу впливу різних доз DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій CD4⁺-Treg: активовані, клітини пам'яті і наївні Treg; канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті; CD56^{bright} – NK-клітини; ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті; наївні ефекторні CD4⁺-Т-клітини; NK-клітини; NKT-клітини; і наївні ефекторні CD8⁺CD45RA⁺-Т-клітини;

на фіг. 13 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові в відповідь на обробку DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂. Для п'яти різних донорів (C4, C5, C6, N1, N2) оцінювали в різні моменти часу впливу різних доз DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій CD4⁺-Treg: активовані, клітини пам'яті і наївні Treg; канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті; CD56^{bright} – NK-клітини; ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті; наївні ефекторні CD4⁺-Т-клітини; NK-клітини; NKT-клітини; і наївні ефекторні CD8⁺CD45RA⁺-Т-клітини;

на фіг. 14 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові: порівняння DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ і DP47GS IgG-IL-2N88D. Представлені результати для субпопуляцій CD4⁺-Treg (А-В): активованих (А), клітин пам'яті (В) і наївних (Б) Treg; канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті (Г); CD56^{bright} – NK-клітин (Д);

на фіг. 15 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях людських клітин периферійної крові в відповідь на обробку обома кон'югатами, і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂. Для десяти різних донорів оцінювали в різні дні впливу DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ у широкому діапазоні доз (≥6 log) на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій клітин: (А) Treg пам'яті, (Б) наївні Treg, (В) CD56^{bright} – NK-клітини, (Г) все NK-клітини, (Д) центральні CD4⁺-Т-клітини пам'яті, (Е) ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті, (Ж) наївні CD4⁺-Т-клітини, (З) центральні CD8⁺-Т-клітини пам'яті, (І) ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті, (ДО) наївні CD8⁺-Т-клітини, (Л) Темра [RA⁺-Teff-клітини пам'яті] CD8⁺-Т-клітини, (М) NKT-клітини і (Н) CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD56⁺-Т-клітини. Все результати представлені у вигляді середніх значень ± СОС (стандартна помилка середнього) (n=10 донорів);

на фіг. 16 – порівняння впливів in vitro DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ на людські NK-клітини і CD8⁺-Т-клітини. PBMC з організму здорових донорів (n=10) культивували з щільністю 5×10⁶ клітин/лунку планшетів з U-подібним дном в присутності 50 нг/мл DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (незафарбовані символи) або DP47GS IgG-(IL-2)₂ (зафарбовані сірим кольором символи) протягом 6 днів, після чого кількісно оцінювали число клітин за допомогою проточної цитометрії. Впливу на NK-клітини кількісно оцінювали на CD56^{dim} – і CD56^{bright} – NK-клітинах (А). Впливу на CD8⁺-Т-клітини проілюстровані на панелі (Б). Результати представлені у вигляді медіанних значень ± міжквартильний інтервал, статистичні відмінності визначали із застосуванням U-критерію Манна-Уїтні;

на фіг. 17 – порівняння впливів in vivo DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ на несучих стовбурові CD34⁺-клітини гуманізованих мишей. Через 10-12 тижнів після приживлення трансплантованих стовбурових CD34⁺-клітин мишей обробляли двічі на тиждень наповнювачем

(DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ або DP47GS IgG-(IL-2)₂. Максимальне збільшення кількостей людських Treg і NK-клітин в крові було виявлено після 3 обробок, результати представлені на панелі (А) для Treg і на панелі (Б) для NK-клітин. Результати представлені у вигляді медіанних значень \pm міжквартильний інтервал; наповнювач (n=21), IgG-(IL-2N88D)₂ (n=22) і IgG-(IL-2)₂ (n=24);

на фіг. 18 – порівняння впливів *in vivo* DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ на виживання несучих стовбурові CD34⁺-клітини гуманізованих мишей. Через 10-12 тижнів після приживлення трансплантованих стовбурових CD34⁺-клітин мишей обробляли двічі на тиждень наповнювачем (DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ або DP47GS IgG-(IL-2)₂ до тих пор, поки серйозність реакції людський ксенотрансплантат проти хазяїна не досягала заздалегідь визначеного рівня (втрата ваги $\geq 15\%$), що потребує виключення тварин з дослідження. Результати представлені на графіках у вигляді кривих виживаності Каплана-Мейєра, збудованих за допомогою програми GraphPad Prism для наповнювача (n=7), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=12) і DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=13);

на фіг. 19 – порівняння впливів *in vivo* DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ на Treg, NK-клітини і CD8⁺-Т-клітини в організмі несучих стовбурові CD34⁺-клітини гуманізованих мишей. Через 10-12 тижнів після приживлення трансплантованих стовбурових CD34⁺-клітин мишей обробляли двічі на тиждень наповнювачем (DP47GS IgG, без IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ або DP47GS IgG-(IL-2)₂ до тих пір, поки серйозність реакції людський ксенотрансплантат проти хазяїна не досягала заздалегідь визначеного рівня (втрата ваги $\geq 15\%$), що потребує виключення тварин з дослідження, після чого проводили аналіз крові відносно індивідуальних субпопуляцій людських клітин. Результати оцінки кількості людських Treg, NK-клітин і CD8⁺-клітин в крові представлені у вигляді % відносно кількості людських CD45⁺-клітин. Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС для наповнювача (n=6), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=9) або DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=9);

на фіг. 20 – результати оцінки індукції pSTAT5a Treg в крові мавп циномоглус у відповідь на DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Для трьох здорових донорів (C1-C3) одночасно оцінювали впливи максимальної дози (20 нг/мл) DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a в Treg. (А) Ідентифікацію субпопуляцій CD4⁺CD25⁺-Treg: наївних Treg (CD45RA⁺FOXP3⁺), Treg пам'яті (CD45RA⁺FOXP3⁺) і активованих (CD45RA⁺FOXP3^{hi}) здійснювали за допомогою метода проточної цитометрії із застосуванням стратегії, основаної на застосуванні дискримінаційного вікна для FOXP3 (у-ось) і CD45RA (х-ось). На панелі (Б) представлені дані про рівень забарвлювання поверхні CD25⁺-клітин в субпопуляціях Treg до стимуляції. На панелі (В) представлені pSTAT5a-відповіді для субпопуляцій CD4⁺CD25⁺-Treg: субпопуляцій активованих клітин, клітин пам'яті і наївних клітин для кожної з трьох мавп циномоглус (C1-C3);

на фіг. 21 – дані об активації pSTAT5a канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті в крові мавп циномоглус в відповідь на обробку DP47GS IgG-(IL-2)₂ або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Індукцію pSTAT5a в канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітинах пам'яті аналізували з використанням тих самих стимульованих (20 нг/мл) зразків крові трьох мавп-донорів, зазначених в описі до фіг. 11. (А) результати ідентифікації канонічних ефекторних CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁺-Т-клітин пам'яті, яку здійснювали за допомогою метода проточної цитометрії із застосуванням стратегії, основаної на застосуванні дискримінаційного вікна для CD45RA по у-осі і CD25 по х-осі. На панелі (Б) представлені pSTAT5a-відповіді для всіх ефекторних CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁺-Т-клітин пам'яті. На панелі (В) представлені pSTAT5a-відповіді для ефекторних Т-клітин пам'яті, які являлись також CD25⁺-клітинами. На панелі (Г) представлені pSTAT5a-відповіді для ефекторних Т-клітин пам'яті, які являлись також CD25⁺-клітинами;

на фіг. 22 – дані про індукцію pSTAT5a в субпопуляціях Т-клітин периферійної крові мавп циномоглус в відповідь на обробку DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Для двох здорових дорослих донорів оцінювали впливу різних доз (0,03-300 нг/мл) DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a. Представлені результати для наступних субпопуляцій CD4⁺-Treg (А-В): активовані (А), клітини пам'яті (В) і наївні (Б) Treg і канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті (Г). Для обох мавп були одержані схожі результати і для ілюстрації впливів DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ наведені результати для одного донора;

на фіг. 23 – одержані на мишах дані, які свідчать про те, що DP47GS IgG-IL-2 мав більш високі фармакокінетичні (ФК) характеристики у порівнянні з DP47GS IgG-(IL-2)₂, у той час як характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ находились на проміжному рівні. (А) дані для NOD- і NOD.scid-мишей, яким вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції (i.v.) 0,3 мг/кг DP47GS IgG-IL-2 або 0,3 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2)₂. (Б) дані для NOD.scid.IL2R $\alpha^{-/-}$ -мишей, яким вводили i.v. 0,1

мг/кг DP47GS IgG-IL-2, 0,3 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2)₂ або 0,1 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Людський IL-2 оцінювали у зразках сироватки в зазначені моменти часу за допомогою аналізу на основі захоплення з використанням МАТ;

на фіг. 24 – дані, що свідчать про те, що рівні й CD25, й FoxP3 підвищуються в мишиних Treg після обробки Proleukin[®], DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. BALB/с-мишей обробляли Proleukin[®] (20000 і 100000 МЕ/мишу, n=3), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300 або 1500 МЕ/мишу, n=3), оброблених наповнювачем мишей включали як нестимульовані контролю (n=4). Через 24 год. після обробки оцінювали рівні CD25 і FOXP3 в Treg селезінки. Для всіх чотирьох молекул, що містять IL-2 були виявлені залежні від дози вимірювання рівнів CD25 на клітинній поверхні (А) і залежні від дози вимірювання рівнів внутрішньоклітинного FoxP3 (Б). Дані представлені у вигляді середніх значень ± СКО, чорні стовпчики відповідають найбільшій застосовній дозі, а сірі стовпчики відповідають найбільш низькій дозі;

на фіг. 25 – результати оцінки ФК-характеристик DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂ в організмі здорових дорослих "біологічно наївних" мавп циномогус. (А): дані для тварин, яким вводили внутрішньовенно (i.v.) DP47GS IgG-IL-2 у вигляді короткочасної болюсної ін'єкції в дозах 10, 25 і 100 мкг/кг (n=2 на дозу). (Б): дані для тварин, яким вприскували i.v. DP47GS IgG-(IL-2)₂ у вигляді короткочасної болюсної ін'єкції в дозах 10 і 25 мкг/кг (n=2 на дозу). Людський IL-2 оцінювали в зразках сироватки в зазначені моменти часу за допомогою аналізу на основі захоплення з використанням МАТ;

на фіг. 26 – дані, що свідчать про те, що DP47GS IgG-IL2 має залежну від дози дію на мавп циномогус, збільшуючи кількість регуляторних Т-клітин. Вимірювання кількості регуляторних CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клітин (Treg) в цільній крові в день 7 після обробки представлені у вигляді (А) абсолютної кількості Treg-клітин на мм³ цільної крові і (Б) кратності вимірювання кількості Treg-клітин. Все дані представлені у вигляді середніх значень ± СКО. Незабарвлені стовпчики: DP47GS IgG-IL-2 (n=6); затінені стовпчики: наповнювач (n=3);

на фіг. 27 – залежності впливів від часу і низьких доз DP47GS IgG-IL-2 на рівні Treg-клітин в організмі мавп циномогус. (А) вимірювання в залежності від часу кратності збільшення рівнів Treg-клітин після введення DP47GS IgG-IL-2 в дозі 2 або 6 мкг/кг (n=4 і 6 відповідно). (Б) вимірювання в залежності від часу абсолютних кількостей Treg-клітин в крові після введення DP47GS IgG-IL-2 в дозі 2 або 6 мкг/кг (n=4 і 6 відповідно). Все дані представлені у вигляді середніх значень ± СКО;

на фіг. 28 – дані, що свідчать про те, що введення одноразової дози пролейкіну стимулює короткочасну залежну від дози Treg-відповідь у мавп циномогус. (А) вимірювання кількостей Treg-клітин в периферійній крові після однократного введення пролейкіну в дозі від 3×10⁴ до 3×10⁵ МЕ/кг. (Б) вимірювання рівнів pSTAT5a Treg після однократного введення пролейкіну в дозі від 3×10⁴ до 3×10⁵ МЕ/кг. Дані представлені у вигляді середніх значень ± СКО;

на фіг. 29 – дані, що свідчать про те, що низька доза DP47GS IgG-IL-2 є більш ефективною, ніж висока доза Proleukin[®] з точки зору індукції Treg у мавп циномогус. Нормальних здорових мавп циномогус (групи по n=5) обробляли DP47GS IgG-IL-2 в низькій дозі або пролейкіном у високій дозі і аналізували вимірювання кількості регуляторних Т-клітин в день 10. У дні 0 і 7, вводили DP47GS IgG-IL-2 в дозі 16800 МЕ/кг (12 мкг/кг). Обробку пролейкіном (200000 МЕ/кг) здійснювали SC 3 рази на тиждень (MWF), вводячи загалом 5 доз. Результати представлені у вигляді середніх значень ± СКО для (А) вимірювання загальної кількості Treg-клітин на мм³ крові, (Б) кратності вимірювання кількості Treg-клітин, і (В) вимірювання відношення кількості Treg до кількості канонічних CD4⁺FOXP3⁺-клітин. Незабарвлені стовпчики відповідають обробці IL-2, а затінені стовпчики відповідають обробці наповнювачем як контролю;

на фіг. 30 – дані, що свідчать про те, що рівень фосфорильованого STAT5 в цільній крові, одержані ex vivo, є чутливим біомаркером активації за допомогою DP47GS IgG-IL-2 Treg-клітин in vivo. Через один і три дні після введення in vivo одноразової низької дози DP47GS IgG-IL-2 (12 мкг/кг) здоровим мавпам циномогус (n=5), збирали зразки цільної крові й відразу ж без стимуляції аналізували відносно фосфорильованого STAT5 (pSTAT5a). У кожній мавпи брали кров у день 0 перед обробкою, вимірювали кількість pSTAT5a (затінені стовпчики) й індивідуальні результати застосовували для оцінки кратності вимірювання після обробки (незабарвлені стовпчики). Представлені: (А) кратність вимірювання pSTAT5a в Treg-клітинах в дні 1 і 3, (Б) кратність вимірювання рівнів pSTAT5a в канонічних CD4⁺CD45⁺-Т-клітинах пам'яті, і (В) кратність вимірювання STAT5a в наївних Т-клітинах. Дані представлені у вигляді середніх значень ± СКО;

на фіг. 31 – дані, що свідчать про те, що рівень фосфорильованого STAT5 в цільній крові, одержаний ex vivo, є чутливим біомаркером активації Treg-клітин in vivo за допомогою DP47GS

IgG-IL-2 при його застосуванні в низькій дозі. Через один-сім днів після введення *in vivo* одноразової низької дози DP47GS IgG-IL-2 здоровим мавпам циномолгус, збирали зразки цільної крові і відразу ж без стимуляції аналізували відносно фосфорильованого STAT5 (pSTAT5a). У кожної мавпи брали кров у день 0 перед обробкою для визначення нестимульованих рівнів pSTAT5a і проводили порівняння з ними для визначення змін рівнів pSTAT5a після обробки. (А) Рівні pSTAT5a Treg-клітин до і після обробки DP47GS IgG-IL-2 в дозі 2 мкг/кг (n=4). (Б) Рівні pSTAT5a Treg-клітин до і після обробки DP47GS IgG-IL-2 в дозі 6 мкг/кг (n=6). Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО;

на фіг. 32 – дані, що свідчать про те, що рівень Ki-67 в цільній крові мавп циномолгус, одержаний *ex vivo*, є маркером індукованої DP47GS IgG-IL-2 проліферації Т-клітин *in vivo*. Для мавп циномолгус, оброблених DP47GS IgG-IL-2 в дозах 2 і 6 мкг/кг як зазначено в описі до фіг. 14, здійснювали також *ex vivo* моніторинг змін рівнів внутрішньоклітинного маркера Ki-67 для оцінки ступеню проліферації *in vivo*. Здійснювали кількісну оцінку проценту клітин, що знаходяться в нормальному стаціонарному стані в клітинному циклі (Ki-67⁺) в день 0 перед обробкою і потім здійснювали щоденно моніторинг протягом наступних 7-11 днів. Представлені: (А) % Ki-67⁺ для Treg-клітин, (Б) Ki-67⁺ для канонічних CD4⁺CD45⁻-Т-клітин пам'яті/ефекторних Т-клітин і (В) % Ki-67⁺ для наївних CD4⁺CD45RA⁺-Т-клітин. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО;

на фіг. 33 – залежності від часу і низької дози впливів DP47GS IgG-(IL-2)₂ на рівні Treg в організмі наївних здорових мавп циномолгус. (А) залежність від часу вимірювання абсолютних кількостей Treg після введення 6 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2)₂. (Б) залежність від часу змін pSTAT5a Treg-клітин після обробки, (В) залежність від часу змін кратності збільшення Treg-клітин і (Г) порівняння кратності змін кількості Treg-клітин у оброблених DP47GS IgG-IL-2 мавп (незабарвлені стовпчики, 2-36 мкг/кг) і оброблених DP47GS IgG-(IL-2)₂ мавп (затінений стовпчик, 6 мкг/кг). Все дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО (n=4-6);

на фіг. 34 – залежності від часу і дози впливів DP47GS IgG-(IL-2)₂ при його застосуванні в дуже низьких дозах на рівні Treg в організмі наївних здорових мавп циномолгус. (А) залежність від часу змін кратності збільшення Treg після введення DP47GS IgG-(IL-2)₂ в дозі 0,7 і 2 мкг/кг, (Б) залежність від часу змін pSTAT5a Treg-клітин, виміряних в день 0 перед обробкою і в дні 1-4 після обробки, (В) залежність від часу змін pSTAT5a Teff/тет-клітин. Все дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО (n=3 для 0,7 мкг/мл і n=8 для 2 мкг/кг);

на фіг. 35 – порівняння залежностей від дози впливів DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂ і їх здатності збільшувати кількість Treg в цільній крові мавп циномолгус. Все дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО (n=3-6);

на фіг. 36 – результати застосування технології секвенування наступного покоління (NGS) застосовували для аналізу специфічного для субпопуляції Т-клітин деметилювання ДНК фактору транскрипції FOXP3 й імуносупресорної молекули CTLA-4. Аналізували зразки крові дорослих біологічно наївних мавп циномолгус до і після обробки оптимальною дозою DP47GS IgG-IL-2 (25 мкг/кг, n=4) і DP47GS IgG-(IL-2)₂ (6 мкг/кг, n=4). Субпопуляції CD4⁺-Т-клітин виділяли за допомогою BD FACSAria з РВМС цільної крові і застосовували по 100000 клітин на субпопуляцію для генспецифічного деметилювання ДНК. Для обох обробок були одержані схожі результати, і дані, одержані на оброблених DP47GS IgG-(IL-2)₂ мавпах представлені для FOXP3 на верхній панелі і для CTLA-4 на нижній панелі (n=4, середнє значення \pm СКО);

на фіг. 37 – результати оцінки ФК-характеристик DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в організмі нормальних здорових біологічно наївних мавп циномолгус. (А) результати, одержані для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, який вводили внутрішньовенно (iv) шляхом короточасної болюсної ін'єкції в дозах 30 і 100 мкг/кг (n=2 на дозу). (Б) результати, одержані для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, який вводили шляхом підшкірної ін'єкції (sc) в об'ємі 0,2 мл в бічну область спини в дозах 30 і 100 мкг/кг (n=2 на дозу). Людський IL-2 оцінювали в зразках плазми в зазначені моменти часу за допомогою аналізу захоплення, оснований на застосуванні моноклонального антитіла. (В) Як біомаркера експозиції IL-2 проводили вимірювання розчинного CD25 в плазмі після ін'єкції IgG-(IL-2N88D)₂ в дозах 30 і 100 мкг/кг; рівні sCD25 циномолгус вимірювали за допомогою аналізу захоплення на основі МАт до людського sCD25, відносно якого відомо, що воно вступає в перехресну реакцію з sCD25 циномолгус. Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС (n=4);

на фіг. 38 – залежності від часу і дози впливів *in vivo* DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на Treg в організмі наївних здорових мавп циномолгус. Представлені залежності від часу змін абсолютної кількості ($\times 10^6$ /мл крові) загальних Treg, CD4⁺-Treg пам'яті, наївних CD4⁺-Treg і CD8⁺FOXP3⁺-Treg після ін'єкції (А) 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ або (Б) 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂. Представлені залежності від часу змін Treg у вигляді % від CD4⁺- або CD8⁺-Т-клітин для

загальних Treg, CD4⁺-Treg пам'яті, наївних CD4⁺-Treg і CD8⁺FOXP3⁺-Treg після ін'єкції 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (В) або 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (Г). Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС (n=4);

на фіг. 39 - залежності від часу і дози впливів *in vivo* DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на лімфоцити в організмі наївних здорових мавп циномогус. Вимірювання в залежності від часу ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті представлені у вигляді % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин після ін'єкції 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ або 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (А). Вимірювання в залежності від часу ефекторних CD4⁺CD25^{hi}-Т-клітин пам'яті представлені у вигляді % від кількості ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті після ін'єкції 100 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ або 30 мкг/кг DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (Б). Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС (n=4);

на фіг. 40 – дані, що свідчать про те, що рівень pSTAT5a в цільній крові, одержаний *ex vivo*, є чутливим біомаркером активації IL-2 *in vivo*. Через 1-11 днів після введення *in vivo* одноразової дози DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ мавпам циномогус збирали зразки цільної крові і відразу ж без стимуляції аналізували відносно pSTAT5a. У кожній мавпи брали зразки крові в день 0 перед обробкою для визначення нестимульованих рівнів pSTAT5a, які порівнювали для визначення змін рівнів pSTAT5a після обробки. (А) pSTAT5a (MFI, максимальна середня інтенсивність флуоресценції) до і після обробки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) pSTAT5a до і після обробки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СОС для зазначених субпопуляцій клітин;

на фіг. 41 – одержані *ex vivo* дані, що свідчать про те, що забарвлювання CD25 на поверхні клітин в цільній крові є чутливим біомаркером активації IL-2 *in vivo*. Через 1-14 днів після введення *in vivo* одноразової дози DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ мавпам циномогус збирали зразки цільної крові і відразу ж без стимуляції аналізували відносно CD25 на поверхні зазначених типів клітин. У кожній мавпи брали зразки крові в день 0 перед обробкою для визначення нестимульованих рівнів CD25, з якими проводили порівняння для визначення змін рівнів CD25 після обробки. (А) забарвлювання CD25 (максимальна MFI, середня інтенсивність флуоресценції) до і після обробки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) забарвлювання CD25 до і після обробки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СОС для зазначених субпопуляцій клітин;

на фіг. 42 – одержані *ex vivo* дані, що свідчать про те, що забарвлювання внутрішньоклітинного Ki-67 в цільній крові є чутливим біомаркером проліферації клітин після активації IL-2 *in vivo*. Через 1-14 днів після введення *in vivo* одноразової дози DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ мавпам циномогус збирали зразки цільної крові і відразу ж без стимуляції аналізували відносно внутрішньоклітинного Ki-67 в зазначених типах клітин. У кожній мавпи брали зразки крові в день 0 перед обробкою для визначення нестимульованих рівнів Ki-67⁺-клітин, з якими проводили порівняння для визначення змін % Ki-67⁺-клітин після обробки. (А) забарвлювання Ki-67 (% від Ki-67⁺-клітин) до і після обробки 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (Б) забарвлювання Ki-67 (% від Ki-67⁺-клітин) до і після обробки 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС для зазначених субпопуляцій клітин;

на фіг. 43 – підсумкове порівняння впливів *in vivo* IL-2 на Treg циномогус. Представлено максимальне збільшення загальних Treg у вигляді % від CD4⁺-Т-клітин для пролейкіну, IgG-IL-2, IgG-(IL-2)₂ і IgG-(IL-2N88D)₂; для цілей порівняння все дози *in vivo* виражені в пмолях/кг. Пролейкін вводили 3 рази на тиждень (MWF (понеділок/середа/п'ятниця)) протягом 2 тижнів, а які містять IL-2 злиті білки вводили у вигляді одноразової ін'єкції. Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС; пролейкін (n=5), IgG-IL-2 (n=6), IgG-(IL-2)₂ (n=6) і IgG-(IL-2N88D)₂ (n=4);

на фіг. 44 – дані, що свідчать про те, що IL-2 в високих дозах індукує еозинофілію у мавп циномогус. Здійснювали моніторинг вимірювання кількості еозинофілів в крові при проведенні всіх тестів, як з використанням пролейкіну, так й імунокон'югатів IL-2. Еозинофілія була виявлена в період з 7 по 14 день після обробки пролейкіном у високій дозі (2 \times 10⁵ МЕ/кг, 3 рази на тиждень протягом 2 тижнів) або високими дозами DP47GS IgG-IL-2, але не DP47GS IgG-(IL-2)₂ або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Вихідні кількості еозинофілів, позначені незабарвленими кружками, показані на графіку в положенні, що відповідає дозі IL-2, рівній 0, їх визначали двічі, один разів при тестуванні молекули IL-2 дикого типу і один разів при тестуванні DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО;

на фіг. 45 – дані, що свідчать про те, що обробка *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 пригнічує у мишей гіперчутливість уповільненого типу, індуковану еритроцитами баранів (DTH). Все дані представлені для індивідуальних мишей, оброблених наповнювачем (відповідь 100 %), IgG-IL-2

(4000 МЕ/мишу) або мишиним CTLA-4-Ig як позитивного контролю (200 мкг/мишу). (А) результати для NOD-мишей і (Б) для C57BL/6-мишей. Величини DTH-відповідей в день чотири представлені у вигляді вимірювання маси лапи у порівнянні з неімунізованими мишами (Δ маси лапи). Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО;

5 на фіг. 46 – Дані, що свідчать про те, що обробка *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 (4000 МЕ/мишу) пригнічує відповіді у вигляді мишачого антитіла IgG-класу на KLH у (А) C57BL/6-мишей через 21 день після імунізації і (Б) у NOD-мишей через сім днів після імунізації. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm СКО.

Докладний опис винаходу

10 Визначення

Поняття, застосовні в даному описі, мають значення, загальноприйнятні в даній галузі, якщо нижче спеціально не зазначено інше.

В контексті даного опису поняття "злитий білок" відноситься до зливої молекули поліпептиду, яка містить молекулу імуноглобуліну і молекулу IL-2, де компоненти злитого білка зчеплені один з іншим за допомогою пептидних зв'язків або безпосередньо, або через пептидні лінкери. Слід відзначити, що індивідуальні пептидні ланцюги компонента злитого білка, що представляє собою імуноглобулін, можуть бути зв'язані нековалентно, наприклад, за допомогою дисульфідних зв'язків.

Поняття "злиті" відноситься до компонентів, які зчеплені пептидними зв'язками або 20 безпосередньо, або за допомогою одного або декількох пептидних лінкерів.

Поняття "специфічне зв'язування" означає, що зв'язування є вибірковим відносно антигену і його можна відрізнити від небажаних або неспецифічних взаємодій. Здатність імуноглобуліну зв'язуватися зі специфічним антигеном можна визначати або за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), або за допомогою інших методик, відомих спеціалісту в 25 даній галузі, наприклад, за допомогою метода поверхневого плазмонного резонансу (SPR) (здійснюючи аналіз за допомогою пристрою BIAcore) (Liljeblad та ін., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329) і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одному з варіантів здійснення винаходу ступінь зв'язування імуноглобуліну з невідповідним білком складає менше приблизно 10 % від зв'язування імуноглобуліну з антигеном, при оцінці, 30 наприклад, за допомогою SPR. В деяких варіантах здійснення винаходу імуноглобулін, який зв'язується з антигеном, характеризується константою дисоціації (K_D), що складає ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

Поняття "афінність" або "афінність зв'язування" відноситься до сумарної сили всіх 35 нековалентних взаємозв'язків між індивідуальним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і її партнером зі зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не зазначене інше, то в контексті даного опису поняття "афінність зв'язування" відноситься до властивості компонентам зв'язувальної пари (наприклад, антитіла і антигену) афінності зв'язування, що відображає взаємодію за типом 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y можна, як правило, 40 характеризувати за допомогою константи дисоціації (K_D), яка представляє собою відношення констант швидкості реакції дисоціації і асоціації (k_{off} і k_{on} відповідно). Так, еквівалентні афінності можуть відповідати різним константам швидкості, якщо співвідношення констант швидкості залишається таким самим. Афінність можна оцінювати загальноприйнятними методами, відовими в даній галузі, включаючи представлені в даному описі. Конкретним методом 45 вимірювання афінності є поверхневий плазмонний резонанс (SPR).

Поняття "знижене зв'язування", наприклад, знижене зв'язування з Fc-рецептором або рецептором IL-2, відноситься до зниження афінності відповідної взаємодії, при оцінюванні, наприклад, за допомогою SPR. Слід зауважити, що поняття охоплює також зниження афінності до нуля (або нижче межі виявлення аналітичного метода), тобто повну відсутність взаємодії. І 50 навпаки, поняття "підвищене зв'язування" відноситься до підвищення афінності зв'язування для відповідної взаємодії.

В контексті даного опису поняття "антигенна детермінанта" є синонімом поняття "антиген" і відноситься до сайту (наприклад, ділянки, що складається з суміжних амінокислот, або конформаційної конфігурації, що складається з різних областей несуміжних амінокислот) на 55 поліпептидній макромолекулі, з якою зв'язується антитіло з утворенням комплексу антитіло-антиген. Придатні антигенні детермінанти можна виявити, наприклад, на поверхні клітин, молекул, що знаходяться у вільному стані в сироватці крові і/або у позаклітинному матриксі (ECM).

В контексті даного опису поняття "одноланцюгова" відноситься до молекули, яка містить 60 амінокислотні мономери, лінійно зчеплені пептидними зв'язками.

В контексті даного опису поняття "антитіло" застосовують в його найбільш широкому сенсі й відноситься до різних структур антитіл, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, за умови, що вони мають потрібну

антигензв'язувальну активність.
Поняття "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Прикладами фрагментів антитіл є (але, не обмежуючись тільки ними) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерні антитіла (діабоді), лінійні антитіла, молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv) і однодоменні антитіла.

Поняття "молекула імуноглобуліну" відноситься до білка, який має структуру антитіла, яке зустрічається в природних умовах. Наприклад, імуноглобуліни класу IgG представляють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою приблизно 150000 Да, що складаються із двох легких ланцюгів і двох важких ланцюгів, зв'язаних дисульфідними мостиками. В напрямку від N-кінця до C-кінця кожного важкого ланцюгу містить варіабельну область (VH), яку називають також варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за якою розташовані три константні домени (CH1, CH2 та CH3), які називають також константною областю важкого ланцюга. Аналогічно до вказаного, в напрямку від N-кінця до C-кінця кожний легкий ланцюг містить варіабельну область (VL), яку називають також варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за якою розташовані три константні домени (CH1, CH2 і CH3), які називають також константною областю важкого ланцюга. Аналогічно до цього, в напрямку від N-кінця до C-кінця кожний легкий ланцюг імуноглобуліну містить варіабельну область (VL), яку називають також варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким розташований константний домен легкого ланцюга (CL), який називають також константною областю легкого ланцюга. Важкий ланцюг імуноглобуліну може відноситися до одного з п'яти класів, позначених як α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) або μ (IgM), деякі з яких додатково підрозділяють на підкласи, наприклад, γ₁ (IgG₁), γ₂ (IgG₂), γ₃ (IgG₃), γ₄ (IgG₄), α₁ (IgA₁) і α₂ (IgA₂). Легкий ланцюг імуноглобуліну може відноситися до одного з двох типів, позначених як каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотної послідовності її константного домена. Імуноглобулін, як правило, складається з двох молекул Fab і Fc-домена, які з'єднані через шарнірну область імуноглобуліну.

В контексті даного опису поняття "Fab-фрагмент" відноситься до фрагменту імуноглобуліну, що містить VL-домен і константний домен легкого ланцюга (CL) і VH-домен і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга.

Поняття "клас" антитіла або імуноглобуліну відноситься до типу константного домена або константної області, який/яка міститься в його важкому ланцюзі. Існує п'ять основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, а деякі з них можна додатково підрозділяти на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам імуноглобулінів, позначають як α, δ, ε, γ і μ відповідно.

Поняття "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга імуноглобуліну або антитіла, який бере участь у зв'язуванні імуноглобуліну або антитіла з антигеном. Однак імуноглобулін, що входить в злитий білок, що запропонований в даному винаході, може містити варіабельні області, які не зумовлюють антигензв'язувальну специфічність. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL відповідно) імуноглобуліну або антитіла, як правило, мають схожі структури, при цьому кожний домен містить чотири консервативних каркасних ділянки (FR) і три гіперваріабельних ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt та ін., Kuby Immunology, 6-ое вид., вид-во W.H. Freeman and Co., 2007, з. 91). Для забезпечення специфічності зв'язування антигену може бути достатньо одного VH- або VL-домена.

Поняття "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" в контексті даного опису відноситься до кожної з ділянок варіабельного домена імуноглобуліну або антитіла, послідовності яких є гіперваріабельною, і/або які утворюють структури у вигляді петель ("гіперваріабельні петлі"). Як правило, нативні чотирьохланцюгові антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). HVR, як правило, містять амінокислотні залишки з гіперваріабельних петель і/або з "визначальних комплементарних ділянок" (CDR), останні відрізняються найбільш вираженою варіабельністю послідовності і/або беруть участь в розпізнаванні антигенів. Наведені як приклади гіперваріабельні петлі охоплюють амінокислотні залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia і Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917). Наведені як приклади CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3)

охоплюють амінокислотні залишки 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 і 95-102 H3 (Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Окрім CDR1, присутнього в VH, CDR, як правило, містять амінокислотні залишки, які утворюють гіперваріабельні петлі. CDR містять також "визначальні специфічність залишки" або "SDR", які представляють собою залишки, які контактують з антигеном. SDR знаходяться всередині областей CDR, позначених як скорочені-CDR або a-CDR. Наведені як приклади a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 і a-CDR-H3) охоплюють амінокислотні залишки 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35B H1, 50-58 H2 і 95-102 H3 (див. Almagro і Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, сс. 1619-1633). Якщо не зазначено інше, то залишки в HVR й інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки в FR) в контексті даного опису нумерують згідно з Кеботом зі співавторами, вище (позначають як "нумерація Кебота").

Поняття "каркасна ділянка" або "FR" відноситься до залишків варіабельних доменів, що відрізняються від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домена, як правило, представлені чотирма FR-доменами: FR1, FR2, FR3 і FR4. Таким чином, послідовності HVR і FR, як правило, розташовані в VH (або VL) в наступному порядку: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Людський імуноглобулін" представляє собою імуноглобулін, який має амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності імуноглобуліну, який продукується в організмі людини або в людській клітині, або походить з нелюдського джерела, який застосовує спектри людських імуноглобулінів або інші кодувальні людський імуноглобулін послідовності. Із зазначеного визначення людського імуноглобуліну спеціально виключений гуманізований імуноглобулін, що містить нелюдські антигензв'язувальні залишки.

В контексті даного опису поняття "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, одержаного з популяції практично гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, які входять в популяцію є ідентичними і/або зв'язуються з одним і тим самим епітопом, за виключенням можливих варіантів антитіл, які, наприклад, містять наявні в природних умовах мутації або мутації, що виникають в процесі одержання препарату моноклональних антитіл, зазначені варіанти, як правило, присутні в міnorних кількостях. На противагу до препаратів поліклональних антитіл, які, як правило, охоплюють різні антитіла, мішенню яких є різні детермінанти (епітопи), мішенню кожного моноклонального антитілу з препарату моноклональних антитіл є одна детермінанта на антигені. Таким чином, прикметник "моноклональний" відноситься до характеристики антитіла, яка вказує на одержання з практично гомогенної популяції антитіл, і його не слід розглядати як вимогу, яка обмежує одержання антитіла за допомогою будь-якого конкретного методу. Наприклад, моноклональні антитіла, призначені для застосування згідно з даним винаходом, можна одержувати різними методиками, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) метод гібридом, методи рекомбінантної ДНК, методи фагового дисплея і методи, що охоплюють застосування трансгенних тварин, що містять весь локус людського імуноглобуліну або його частину, зазначені методи й інші, наведені як приклад, методи створення моноклональних антитіл представлені в даному описі.

В контексті даного опису поняття "Fc-домен" або "Fc-область" застосовують для визначення С-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної області. Під поняття підпадають Fc-області, які мають нативну послідовність і варіанти Fc-областей. Fc-область IgG містить CH2-домен IgG і CH3-домен IgG. "CH2-домен" Fc-області людського IgG, як правило, простягається від амінокислотного залишку, розташованого приблизно в положенні 231, до амінокислотного залишку, розташованого приблизно в положенні 340. В одному з варіантів здійснення винаходу до CH2-домену приєднаний вуглеводний ланцюг. В контексті даного опису CH2-домен може представляти собою CH2-домен, що має нативну послідовність або варіант CH2-домена. "CH3-домен" містить сегмент із залишків С-кінцевих відносно CH2-домена в Fc-області (тобто, починаючи з амінокислотного залишку, розташованого приблизно в положенні 341, до амінокислотного залишку, розташованого приблизно в положенні 447 IgG). В контексті даного опису CH3-ділянка може представляти собою що має нативну послідовність CH3-домен або варіант CH3-домена (наприклад, CH3-домен з інтродукованою "випуклістю" ("виступ") в одному ланцюзі й відповідною інтродукованою "порожниною" ("западина") в іншому ланцюзі; див. US № 5821333, спеціально включений в даний опис як посилання). Зазначені варіанти CH3-доменів можна застосовувати для посилення гетеродимеризації двох неідентичних важких ланцюгів імуноглобуліну, відповідно до зазначеного в даному описі методу. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-область важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або

від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак С-кінцевий лізин (Lys447) Fc-області може або бути присутнім, або може бути відсутнім. Якщо в даному описі спеціально не зазначено інше, то нумерацію амінокислотних залишків в Fc-області або константної області здійснювали відповідно до системи нумерації EU, яку називають також EU-індексом, описаної у Kabat та ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Поняття "ефекторні функції" відноситься до видів біологічної активності, притаманних Fc-області імуноглобуліну, які варіюються залежно від ізотипу імуноглобуліну. Прикладами ефекторних функцій імуноглобулінів є: здатність зв'язуватися з C1q і комплементзалежна цитотоксичність (CDC), здатність зв'язуватися з Fc-рецептором, антитіло-зумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC), антитіло-зумовлений клітиннозалежний фагоцитоз (ADCP), секреція цитокінів, опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентувальними клітинами, знижувальна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, В-клітинного рецептора); і активація В-клітин.

"Активувальний Fc-рецептор" представляє собою Fc-рецептор, який після взаємодії з Fc-областю імуноглобуліну викликає процес передачі сигналів, які стимулюють несучу рецептор клітину відносно здійснення ефекторних функцій. Активувальні Fc-рецептори охоплюють FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89). Конкретним активувальним Fc-рецептором є людський FcγRIIIa (див. UniProt, реєстраційний № P08637 (версія 141)).

В контексті даного опису поняття "інтерлейкін-2" або "IL-2", якщо не зазначено інше, відноситься до будь-якого нативного IL-2 з будь-якої застосовної як джерело хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людина) і гризуни (наприклад, миші й щури). Під поняття підпадає непроцесований IL-2, а також будь-яка форма IL-2, одержана в результаті процесингу в клітині. Під поняття підпадають також наявні в природних умовах варіанти IL-2, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. Наведена як приклад амінокислотна послідовність людського IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Непроцесований людський IL-2 додатково містить розташований на N-кінці сигнальний пептид, який складається з 20 амінокислот, який відсутній в зрілій молекулі IL-2.

Під "нативним IL-2", який позначають також як "IL-2 дикого типу", мають на увазі наявний в природних умовах IL-2. Послідовність молекули нативного людського IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Для цілей даного винаходу під поняття дикий тип підпадають також форми IL-2, які містять одну або декілька амінокислотних мутацій, які не змінюють зв'язування з рецептором IL-2 у порівнянні з наявним в природних умовах нативним IL-2, наприклад, заміну цистеїну в положенні, що відповідає залишку 125 людського IL-2, на аланін. В деяких варіантах здійснення винаходу IL-2 дикого типу для цілей даного винаходу містить амінокислотну заміну C125A (див. SEQ ID NO: 3).

В контексті даного опису поняття "CD25" або «α-субодиниця рецептора IL-2», якщо не зазначено інше, відноситься до будь-якої нативної форми CD25 з будь-якої застосовної як джерело хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людина) і гризуни (наприклад, миші й щури). Під це поняття підпадає "повнорозмірна" непроцесована форма CD25, а також будь-яка форма CD25, одержана в результаті процесингу в клітині. Під поняття підпадають також наявні в природних умовах варіанти CD25, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. В деяких варіантах здійснення винаходу CD25 представляє собою людську форму CD25. Як приклад амінокислотна послідовність людської форми CD25 (з сигнальною послідовністю, Avi-міткою і His-міткою) представлена в SEQ ID NO: 25.

В контексті даного опису поняття "високоафінний рецептор IL-2" відноситься до гетеротримерної форми рецептора IL-2, що складається з рецепторної γ-субодиниці (яка відома також як загальна γ-субодиниця цитокінового рецептора, γ_c, або CD132), рецепторної β-субодиниці (відомої також як CD122 або p70) і рецепторної α-субодиниці (відомої також як CD25 або p55). На противагу цьому, поняття "рецептор IL-2 з проміжною афінністю" або рецептор IL-2βγ відноситься до рецептору IL-2, який охоплює тільки γ-субодиницю і β-субодиницю, але не містить α-субодиниці (див., наприклад, огляд Olejniczak і Kasprzak, *Med Sci Monit* 14, 2008, RA179-189). Амінокислотні послідовності людських CD122 і CD132 (злитих з Fc-областю за допомогою His-мітки), які служать як приклади, представлені в SEQ ID NO: 21 і 23 відповідно.

Під "регуляторною Т-клітиною" або "Treg-клітиною" мають на увазі спеціалізований тип CD4⁺-Т-клітини, яка може пригнічувати відповіді інших Т-клітин (ефекторних Т-клітин). Treg-клітини відрізняються здатністю експресувати α-субодиницю рецептора IL-2 (CD25) і фактор транскрипції forkhead box P3 (FOXP3) (Sakaguchi, *Annu Rev Immunol* 22, 2004, сс. 531-562), і вони грають вирішальну роль в індукції і підтриманні периферійної ауто толерантності до антигенів, включаючи ті антигени, які експресуються пухлинами.

Під "канонічними CD4⁺-Т-клітинами" мають на увазі CD4⁺-Т-клітини, відмінні від регуляторних Т-клітин. канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті відрізняються тем, що вони експресують CD4, CD3, але не експресують FOXP3. "канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті" представляють собою субпопуляцію канонічних CD4⁺-Т-клітин, які додатково відрізняються тем, що не експресують CD45RA на відміну від "канонічних наївних CD4⁺-Т-клітин", які експресують CD45RA.

Під "вибірковою активацією Трег-клітин" мають на увазі активацію Трег-клітин практично без супутньої активації інших субпопуляцій Т-клітин (таких як CD4⁺-Т-клітини-хелпери, цитотоксичні CD8⁺-Т-клітини, NK-Т-клітини) або природні клітини-кілери (NK)). Методи ідентифікації та розрізнення цих типів клітин описані в прикладах. Активація може охоплювати індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор (що вимірюють, наприклад, шляхом оцінки фосфорильованого STAT5a), індукцію проліферації (що вимірюють, наприклад, шляхом оцінки Ki-67) і/або активацію, яка підвищує регуляцію експресії маркерів (таких, наприклад, як CD25).

Поняття "пептидний лінкер" відноситься до пептиду, що містить одну або декілька амінокислот, як правило, приблизно 2-20 амінокислот. Пептидні лінкери відомі в даній галузі й зазначені в даному описі. Прийнятні неімуногенні пептидні лінкери охоплюють, наприклад, пептидні лінкери (G₄S)_n, (SG₄)_n або G₄(SG₄)_n. "n" звичайно означає число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4.

Поняття "модифікація" відноситься до будь-якої маніпуляції, яка торкається пептидного каркасу (наприклад, амінокислотну послідовність), або до пост-трансляційних модифікацій (наприклад, глікозилювання) поліпептиду.

Поняття "модифікація по типу "knob-into-hole" (забезпечення взаємодії по типу "виступ в западину") відноситься до модифікації в поверхні розділу між двома важкими ланцюгами імуноглобуліну в СН3-домени, при якій I) в СН3-домени одного важкого ланцюга амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, що має більший об'єм бічного ланцюга, створюючи тем самим випуклість ("виступ") на поверхні розділу в СН3-домени одного важкого ланцюга, яка може поміщатися в порожнину ("западину") в поверхні розділу СН3-домени іншого важкого ланцюга, і II) в СН3-домени іншого важкого ланцюга амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, що має менший об'єм бічного ланцюга, створюючи тим самим порожнину ("западину") в поверхні розділу другого СН3-домени, в яку може поміщатися випуклість ("виступ") на поверхні розділу першого СН3-домени. В одному з варіантів здійснення винаходу "модифікація knob-into-hole" охоплює амінокислотну заміну Т366W і необов'язково амінокислотну заміну S354C в одному з важких ланцюгів антитіла й амінокислотні заміни Т366S, L368A, Y407V і необов'язково Y349C в іншому одному з важких ланцюгів антитіла. Технологія "knob-into-hole" описана, наприклад, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway та ін., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 і у Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15. Як правило, метод полягає в тому, що інтродукують випуклість ("виступ") на поверхню розділу першого поліпептиду і відповідну порожнину ("западину") в поверхні розділу другого поліпептиду, так, щоб випуклість могла поміщатися в порожнину, полегшуючи утворення гетеродимера та перешкоджаючи утворенню гомодимера. Випуклості створюють шляхом заміни амінокислот з невеликими бічними ланцюгами на поверхні розділу першого поліпептиду на амінокислоти з більш крупними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин або триптофан). Компенсувальні порожнини ідентичного або подібного розміру, ніж випуклості, створюють в поверхні розділу другого поліпептиду шляхом заміни амінокислот з крупними бічними ланцюгами на амінокислоти з бічними ланцюгами меншого розміру (наприклад, аланін або треонін). Інтродукція двох залишків цистеїну в положенні S354 та Y349 відповідно, призводить до утворення дисульфідного мостика між двома важкими ланцюгами антитіла в Fc-області, яке додатково стабілізує димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

Амінокислотна "заміна" означає заміну в поліпептиді одної амінокислоти на іншу амінокислоту. В одному з варіантів здійснення винаходу амінокислоту замінюють на іншу амінокислоту, що має схожі структурні й/або хімічні властивості, наприклад, здійснюють консервативні амінокислотні заміни. "Консервативні" амінокислотні заміни можна здійснювати на основі схожості в полярності, полярності, заряді, розчинності, гідрофобній, гідрофільній та/або амфіпатичній структурі залишків. Наприклад, до неполярних (гідрофобних) амінокислот відносяться аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан та метіонін; до полярних нейтральних амінокислот відносяться гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін та глутамін; до позитивно заряджених (основних) амінокислот відносяться аргінін, лізин та гістидин; та до негативно заряджених (кислотних) амінокислот відносяться аспарагінова кислота та глутамінова кислота. Неконсервативні заміни повинні призводити до обміну представника одного з цих класів на представника іншого класу. Наприклад, амінокислотні заміни можуть призводити також до заміни однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, що має

інші структурні та/або хімічні властивості, наприклад, заміну амінокислоти з однієї групи (наприклад, полярну) на іншу амінокислоту з іншої групи (наприклад, основну). Амінокислотні заміни можна створювати, використовуючи генетичні або хімічні методи, добре відомі в даній галузі. Генетичні методи можуть охоплювати сайтспрямований мутагенез, ПЛР, синтез генів тощо. Мають на увазі, що можна використовувати методи зміни групи бічного ланцюга амінокислоти за допомогою методів, відмінних від методів генетичної інженерії, таких як хімічна модифікація. В контексті даного опису можна застосовувати різні позначення однієї та тієї ж самої амінокислотної заміни. Наприклад, заміну проліну в положенні 329 важкого ланцюга імуноглобуліну на гліцин можна позначати як 329G, G329, G₃₂₉, P329G або Pro329Gly.

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" відносно поліпептидної референс-послідовності визначають як процент амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам в поліпептидній референс-послідовності, після вирівнювання послідовностей та інтродукції при необхідності прогалін для досягнення максимального відсотку ідентичності послідовностей, та при цьому будь-які консервативні заміни не враховують при оцінюванні ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз для визначення процента ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які знаходяться в компетенції спеціаліста в даній галузі, наприклад, з використанням публічно доступних комп'ютерних програм, таких як програма BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі можуть визначати відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. Однак для цілей даного винаходу величину % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують з використанням призначеної для порівняння послідовностей комп'ютерної програми ALIGN-2. Призначена для порівняння послідовностей комп'ютерна програма ALIGN-2 розроблена фірмою Genentech, Inc., і вихідний код поміщений на зберігання разом з документацією для користувача в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Програма ALIGN-2 представляє собою публічно доступну програму фірми Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія, або її можна компілювати з вихідного коду. Програму ALIGN-2 можна компілювати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову версію UNIX V4.0D. В програмі ALIGN-2 всі параметри для порівняння послідовностей є заданими і не повинні змінюватися. В ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотних послідовностей для дано амінокислотної послідовності А відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б (що іншими словами можна позначати як те, що дана амінокислотна послідовність А має або відрізняється визначеним % ідентичності амінокислотної послідовності відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б), розраховують наступним чином:

$$100 \times \text{частка } X/Y,$$

де Х означає кількість амінокислотних залишків, оцінених програмою порівняльного аналізу послідовностей ALIGN-2 як ідентичні збіги при порівняльному аналізі послідовностей А і Б за допомогою зазначеної програми, і де Y означає загальну кількість амінокислотних залишків в Б. Повинно бути очевидним, що, коли довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності Б, то % ідентичності амінокислотної послідовності А відносно амінокислотної послідовності Б не повинний бути рівним % ідентичності амінокислотної послідовності Б відносно амінокислотної послідовності А. Якщо спеціально не зазначено інше, то в контексті даного опису все величини % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують відповідно до процедури, описаної в останньому з попередніх параграфів, за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

Поняття "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота", яке застосовують взаємозаміно в контексті даного опису, відноситься до полімерів нуклеотидів будь-якої довжини й охоплює ДНК і РНК. Нуклеотиди можуть представляти собою дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди, модифіковані нуклеотиди або основи й/або їх аналоги, або будь-який субстрат, який можна включати в полімер за допомогою ДНК- або РНК-полімераз або за допомогою реакції синтезу. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди та їх аналоги. В послідовності нуклеотидів можуть бути присутніми сполуки, що не відносять до нуклеотидів. Полінуклеотид може містити модифікацію(і), створену(і) після синтезу, таку(і) як кон'югація з міткою.

Під нуклеїновою кислотою або полінуклеотидом, що має нуклеотидну послідовність, яка, наприклад, на 95 % "ідентична" нуклеотидній референс-послідовності, що запропонована в даному винаході, мають на увазі нуклеотидну послідовність полінуклеотиду, ідентичну

референс-послідовності за виключенням того, що полінуклеотидна послідовність може охоплювати аж до 5 точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів нуклеотидної референс-послідовності. Іншими словами, для одержання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, яка ідентична щонайменше на 95 % нуклеотидній референс-послідовності, аж до 5 % нуклеотидів в референс-послідовності можна вилучати шляхом делеції або замінити на інший нуклеотид, або аж до 5 % нуклеотидів від загальної кількості нуклеотидів в референс-послідовності можна вбудовувати в референс-послідовність. Ці вимірювання референс-послідовності можуть мати місце в положеннях на 5'- або 3'-кінці нуклеотидної референс-послідовності або в іншому положенні між цими кінцевими положеннями, і їх вбудовують або індивідуально між залишками в референс-послідовності, або їх вбудовують в референс-послідовність у вигляді однієї або декількох суміжних груп. На практиці рішення питання про те, чи є ідентичною конкретна полінуклеотидна послідовність щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидної послідовності, що запропонована в даному винаході, можна вирішити, як правило, з використанням відомих комп'ютерних програм, наприклад, зазначених вище для поліпептидів (наприклад, ALIGN-2).

В контексті даного опису поняття "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка має здатність збільшувати кількість іншої нуклеїнової кислоти, з якою вона пов'язана. Поняття охоплює вектор у вигляді здатної до самореплікації структури нуклеїнової кислоти, а також вектор, включений в геном клітини-хазяїна, в яку він інтродукований. Деякі вектори мають здатність забезпечувати експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. В контексті даного опису зазначені вектори позначають як "експресійні вектори".

В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" застосовують взаємозаміно, і вони відносяться до клітин, в які інтродукована екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство зазначених клітин. Клітини-хазяї охоплюють "трансформанти" і "трансформовані клітини", які охоплюють первинні трансформовані клітини, а також виведене з них потомство, незалежно від кількості пересівів. Потомство може не бути строго ідентичним батьківській клітині за складом нуклеїнових кислот, а може нести мутації. Під дане поняття підпадає мутантне потомство, яке має таку ж саму функцію або біологічну активність, що і відібрана шляхом скринінгу або селекції вихідна трансформована клітина. Клітина-хазяїн представляє собою будь-який тип клітинної системи, яку можна застосовувати для створення злитих білків, запропонованих у даному винаході. Клітини-хазяї охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) вирощувані клітини, наприклад, вирощувані клітини ссавців, такі як CHO-клітини, BHK-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, YO-клітини мієломи, P3 × 63-клітини мишачої мієломи, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридами, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин, але також клітини, що знаходяться в трансгенній тварині, трансгенній рослині або вирощуваній тканині рослини або тварини.

Поняття "ефективна кількість" агенту відноситься до кількості, необхідної для досягнення фізіологічного вимірювання в клітині або тканині, в яку його вводять.

"Терапевтично ефективна кількість" агенту, наприклад, фармацевтичної композиції, означає кількість, ефективну в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення потрібного терапевтичного або профілактичного результату. Агент в терапевтично ефективній кількості, наприклад, елімінує, знижує, уповільнює, мінімізує або попереджає небажані дії захворювання.

"Індивідуум" або "суб'єкт" представляє собою ссавця. Ссавці представляють собою (але, не обмежуючись тільки ними) свійських тварин (наприклад, корови, вівці, кішки, собаки і коні), приматів (наприклад, люди і примати окрім людини, такі як мартини), кроликів і гризунів (наприклад, миші і щури). Переважно індивідуум або суб'єкт представляє собою людину.

Поняття "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, в якій він забезпечує біологічну активність діючої речовини, яка входить до його складу, яка повинна мати ефективність, і яка не містить додаткових компонентів, які мають неприйнятну токсичність для індивідуума, якому слід вводити композицію.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта в фармацевтичній композиції, що відрізняється від діючої речовини, який є нетоксичним для індивідуума. Фармацевтично прийнятні носії охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

В контексті даного опису поняття "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "процес лікування") відноситься до клінічного втручання з метою вимірювання природного перебігу хвороби в індивідуума, який підлягає лікуванню, і його можна здійснювати або для профілактики або в процесі розвитку клінічної патології. Необхідними діями лікування є (але, не обмежуючись тільки ними) попередження виникнення або рецидиву хвороби, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків хвороби,

попередження метастазів, зниження швидкості розвитку хвороби, полегшення або тимчасове послаблення хворобливого стану і ремісія або покращення прогнозу. В деяких варіантах здійснення винаходу антитіла, запропоновані у винаході, застосовують для затримки розвитку хвороби або уповільнення прогресування хвороби.

5 Поняття "аутоімунне захворювання" відноситься до незлоякісного захворювання або порушення, що виникає у власних тканинах пацієнта й спрямованого проти власних тканини. Приклади аутоімунних захворювань або порушень включають (але, не обмежуючись тільки ними) запальні відповіді, такі як шкіряні запальні захворювання, включаючи псоріаз і дерматит (наприклад, atopічний дерматит); відповіді, асоційовані з запальними захворюваннями

10 кишкового тракту (такі як хвороба Крона і неспецифічний виразковий коліт); дерматит; алергійні стани, такі як екзема і астма; ревматоїдний артрит; системний червоний вовчак (SLE) (включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) вовчаковий нефрит, шкіряний вовчак); цукровий діабет (наприклад, цукровий діабет типу 1 або інсулінозалежний цукровий діабет); розсіяний склероз і юнацький діабет.

15 Злиті білки, запропоновані у винаході
У винаході запропоновані нові злиті білки імуноглобулін-IL-2, які мають найбільш переважні властивості для застосування в терапевтичних методах, представлених в даному описі.

Першим об'єктом даного винаходу є злитий білок, що містить (I) молекулу імуноглобуліну і (II) дві мутантні молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), що мають амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок практично складається з молекули імуноглобуліну, двох мутантних молекул інтерлейкіну-2 (IL-2), що мають амінокислотну мутацію, знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів.

Як продемонстровано в розділі "Приклади", несподіваним чином було встановлено, що злитий білок, що містить дві молекули IL-2, має суттєво більш високу ефективність і селективність відносно активації регуляторних Т-клітин у порівнянні з відповідним злитим білком, що містять одну молекулу IL-2. Окрім того, тільки злитий білок, що містить дві (на відміну від який містить тільки одну) мутантні молекули IL-2 зі зниженою здатність до зв'язування з рецептором IL-2, який має проміжну афінність, зберігає значну стимулювальну активність відносно регуляторних Т-клітин.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою молекулу імуноглобуліну IgG-класу, насамперед молекулу імуноглобуліну IgG₁-підкласу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою людську молекулу імуноглобуліну, тобто вона містить повністю людські варіабельні й константні області. Наведена як приклад послідовність константної області людського IgG₁ представлена в SEQ ID NO: 8. Молекула імуноглобуліну IgG-класу містить (I) дві легкі ланцюги імуноглобуліну, кожна з яких містить у напрямку від N- до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга (VL) і константний домен легкого ланцюга (CL), і (II) два важкі ланцюги імуноглобуліну, кожен з яких містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен важкого ланцюга (VH), константний домен 1 важкого ланцюга (CH1), шарнірну область імуноглобуліну, CH2-домен і CH3-домен. Два останніх домени утворюють частину Fc-області молекули імуноглобуліну. Два важкі ланцюги димеризовані в Fc-області.

В одному з варіантів злитого білка, згідно з винаходом, кожна із зазначених двох молекул мутантного IL-2 злита на своїй N-кінцевій амінокислоті з C-кінцевою амінокислотою одного з імуноглобулінових важких ланцюгів зазначеної молекули імуноглобуліну, необов'язково через пептидний лінкер. Злиття двох (ідентичних) молекул IL-2 з важкими ланцюгами імуноглобуліну полегшує одержання злитого білка, дозволяючи уникати утворення небажаних побічних продуктів і дозволяючи усувати необхідність в модифікаціях, які посилюють гетеродимеризацію неідентичних важких ланцюгів, таких як модифікація "knob-into-hole".

В деяких варіантах злитого білка, згідно з винаходом, зазначені дві мутантні молекули IL-2 злити із зазначеною молекулою імуноглобуліну через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу кожна із зазначених двох мутантних молекул IL-2 злита із зазначеною молекулою імуноглобуліну через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу кожна із зазначених двох мутантних молекул IL-2 злита на своїй N-кінцевій амінокислоті з C-кінцевою амінокислотою одного з імуноглобулінових важких ланцюгів зазначеної молекули імуноглобуліну через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу кожна із зазначених мутантних молекул IL-2 злита із зазначеною молекулою імуноглобуліну через

пептидний лінкер, що має ідентичну амінокислотну послідовність. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить щонайменше 10 амінокислот. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить щонайменше 15 амінокислот. Не прив'язуючись до конкретної теорії, можна вважати, що пептидний лінкер такої довжини може забезпечувати гнучкість для оптимального зв'язування мутантних молекул IL-2 з рецептором IL-2, насамперед з високоафінним (гетеротримерним) рецептором IL-2. В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 66). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер має довжину 15 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер має амінокислотну послідовність $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 66). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер складається з 15 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер складається з амінокислотної послідовності $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 66).

Злиття молекул IL-2 з молекулою імуноглобуліну забезпечує сприятливі фармакокінетичні властивості, включаючи тривалий час напівжиття в сироватці (внаслідок рециркуляції через зв'язування з FcRn і завдяки тому, що молекулярний розмір в достатньому ступені перевищує пороговий для ниркової фільтрації), у порівнянні з вільним (незлитим) IL-2. Окрім того, присутність молекули імуноглобуліну може полегшувати також очистку злитих білків, наприклад, з використанням афінної хроматографії на білку А. Важно зауважити, що, як продемонстровано в розділі "Приклади", злитий білок, що містить дві мутантні молекули IL-2 з пониженою афінністю до зв'язування з рецептором IL-2, який має проміжну афінність, має більш тривалий час напівжиття в сироватці, ніж відповідний злитий білок, що містить дві молекули IL-2 дикого типу. Злиття з молекулою імуноглобуліну, тобто з наявним в природних умовах типом молекули, може також мінімізувати токсичність злитого білка шляхом утворення антитіл до лікарського засобу.

Хоча присутність молекули імуноглобуліну, насамперед Fc-області молекули імуноглобуліну, має сприятливий вплив на фармакокінетичні характеристики злитого білка, вона може призводити в той самий час до небажаного спрямованого впливу злитого білка на клітини, що експресують Fc-рецептори, а не на переважні клітини, які несуть рецептор IL-2. Окрім того, втягнення Fc-рецепторів може приводити до вивільнення (прозапальних) цитокінів і небажаної активації різних імунних клітин, що відрізняються від регуляторних Т-клітин. З цієї причини зазначена молекула імуноглобуліну, яка входить у злитий білок, відповідно до винаходу, містить модифікацію, яка знижує афінність зв'язування молекули імуноглобуліну з Fc-рецептором у порівнянні з відповідною молекулою імуноглобуліну без зазначеної модифікації. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою Fc γ -рецептор, насамперед, людський Fc γ -рецептор. Афінність зв'язування з Fc-рецепторами можна легко визначити, наприклад, за допомогою ELISA або поверхневого плазмонного резонансу (SPR), застосовуючи стандартний інструментарій, такий як пристрій BIAcore (фірма GE Healthcare), а самі Fc-рецептори можна одержувати за допомогою рекомбінантної експресії. Конкретний ілюстративний і наведений як приклад варіант вимірювання афінності зв'язування описаний нижче. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу афінність зв'язування з Fc-рецептором вимірюють за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, застосовуючи пристрій BIACORE® T100 (фірма GE Healthcare), при 25°C використовуючи ліганд (Fc-рецептор), іммобілізований на CM5-чипах. В цілому, метод полягав у наступному: біосенсорні чипи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, фірма GE Healthcare) активували за допомогою гідрохлориду N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS) відповідно до інструкцій виробника. Рекомбінантний ліганд розводили 10мМ ацетатом натрію, рН 5,5 до концентрації 0,5-30 мкг/мл перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 10 мкл/хв. для досягнення рівня зв'язування злитого білка, що відповідає приблизно 100-5000 одиниць відповіді (RU). Після ін'єкції ліганда ін'єкували 1М етаноламін для блокади непрореагованих груп. Для кінетичних вимірювань ін'єкували трьох-п'ятикратні серійні розведення антитіла (діапазон від ~0,01 до 300нМ) в буфері HBS-EP+ (фірма GE Healthcare, 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЕДТК, 0,05 % сурфактанту P20, рН 7,4) при 25°C зі швидкістю потоку приблизно 30-50 мкл/хв. Швидкість реакції асоціації (k_{on}) і реакції дисоціації (k_{off}) розраховували з використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (програма оцінки BIACORE® T100, версія 1.1.1) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації і дисоціації. Константу рівноваги реакції дисоціації (K_D) розраховували у вигляді відношення k_{off}/k_{on} (див., наприклад, Chen та ін., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Альтернативно до цього, афінність зв'язування антитіл з Fc-рецепторами можна оцінювати, застосовуючи клітинні лінії, які, як відомо,

експресують конкретні Fc-рецептори, наприклад, NK-клітини, що експресують FcγIIIa-рецептор.

В одному з варіантів здійснення винаходу модифікація охоплює одну або декілька амінокислотних мутацій, які знижують афінність зв'язування імуноглобуліну з Fc-рецептором. В одному з варіантів здійснення винаходу амінокислотна мутація представляє собою амінокислотну заміну. Як правило, одна або декілька однакових амінокислотних мутацій присутні в кожному з двох важких ланцюгів імуноглобуліну. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена амінокислотна мутація знижує афінність зв'язування імуноглобуліну з Fc-рецептором щонайменше в 2 рази, щонайменше в 5 разів або щонайменше в 10 разів. У варіантах здійснення винаходу, в яких було присутніми більше однієї амінокислотної мутації, що знижує афінність зв'язування імуноглобуліну з Fc-рецептором, комбінація цих амінокислотних мутацій могла знижувати афінність зв'язування імуноглобуліну з Fc-рецептором щонайменше в 10 разів, щонайменше в 20 разів або навіть щонайменше в 50 разів. В одному з варіантів здійснення винаходу для зазначеної молекули імуноглобуліну характерно менше 20 %, переважно менше 10 %, більш переважно менше 5 % від афінності зв'язування з Fc-рецептором, характерної для відповідної молекули імуноглобуліну без зазначеної модифікації.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою активувальний Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор вибирають з групи, що містить FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89). В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор представляє собою Fcγ-рецептор, більш конкретно рецептор FcγRIIIa, FcγRI або FcγRIIa. Переважно знижується афінність зв'язування з кожним з цих рецепторів. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений Fc-рецептор представляє собою FcγIIIa, насамперед, людський FcγIIIa. Згідно з деякими варіантам здійснення винаходу знижується також афінність зв'язування з компонентом системи комплементу, зокрема, афінність зв'язування з C1q. Згідно з одним з варіантів здійснення винаходу не знижується афінність зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn). Практично таке же саме зв'язування з FcRn, тобто зберігання афінності зв'язування молекули імуноглобуліну із зазначеним рецептором, досягають, коли молекула імуноглобуліну характеризується афінністю зв'язування з FcRn, що складає більш ніж приблизно 70 % від афінності зв'язування з FcRn немодифікованої форми молекули імуноглобуліну. Молекули імуноглобуліну, що входять у злиті білки, запропоновані у винаході, можуть характеризуватися афінністю, що складає більш ніж приблизно 80 % і навіть більше ніж приблизно 90 % від зазначеної афінності.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація, яка знижує афінність зв'язування молекули імуноглобуліну з Fc-рецептором, знаходиться в Fc-області, насамперед, в CH2-області, молекули імуноглобуліну. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотну заміну в положенні 329 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена амінокислотна заміна представляє собою P329A або P329G, насамперед P329G. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни в положеннях 234 і 235 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені амінокислотні заміни представляють собою L234A і L235A (LALA). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотну заміну в положенні 329 (EU-нумерація) важких ланцюгів антитіла і додаткову амінокислотну заміну в положенні, вибраному з положень 228, 233, 234, 235, 297 і 331 важких ланцюгів імуноглобуліну. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу додаткова амінокислотна заміна представляє собою S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D або P331S. У переважному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни в положеннях P329, L234 і L235 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну. У більш переважному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G (LALA P329G) у важких ланцюгах імуноглобуліну. Зазначена комбінація амінокислотних замін найбільш ефективно елімінує зв'язування Fcγ-рецептора з людським імуноглобуліном IgG-класу, що описано в публікації PCT WO 2012/130831, яка повністю включена в даний опис як посилання. В публікації PCT WO 2012/130831 описані також методи одержання зазначеного модифікованого імуноглобуліну і методи визначення його властивостей, таких як зв'язування Fc-рецептора або ефекторні функції.

Імуноглобуліни, які містять модифікації у важких ланцюгах імуноглобуліну, можна одержувати шляхом амінокислотної делеції, заміни, інсерції або модифікації, застосовуючи генетичні або хімічні методи, добре відомі в даній галузі. Генетичні методи можуть представляти собою сайтспрямований мутагенез кодувальної послідовності ДНК, ПЛР, синтез

генів тощо. Правильні нуклеотидні заміни можна підтверджувати, наприклад, секвенуванням.

Імуноглобуліни або антитіла, які містять модифікації, які знижують зв'язування з Fc-рецептором, як правило, мають знижені ефекторні функції, насамперед зниженою ADCC, у порівнянні з відповідними немодифікованими імуноглобулінами або антитілами. Так, в одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація, яка знижує афінність зв'язування молекули імуноглобуліну з Fc-рецептором, знижує ефекторну функцію молекули імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена ефекторна функція представляє собою антитіло-зумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC). В одному з варіантів здійснення винаходу ADCC знижується до рівня, що складає менше 20 % від ADCC, індукованої відповідною молекулою імуноглобуліну без зазначеної модифікації. Ефекторну функцію імуноглобуліну або антитіла можна оцінювати за допомогою методів, відомих в даній галузі. Приклади аналізів *in vitro* для оцінки ADCC-активності молекули, яка представляє інтерес, описані в US № 5500362; у Hellstrom та ін., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 і Hellstrom та ін., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann та ін., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно до цього, можна застосовувати методи аналізу, не основані на вимірюванні радіоактивності (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності ACTI™ для проточної цитометрії (фірма CellTechnology, Inc. Маунтин-В'ю шт. Каліфорнія); і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (фірма Promega, Медисон, шт. Вісконсин)). Цінними ефекторними клітинами для таких аналізів є моноклеарні клітини периферійної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність відповідної молекули можна оцінювати *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, наприклад, описаній у Clynes та ін., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656. В деяких варіантах здійснення винаходу знижується також зв'язування молекули імуноглобуліну з компонентом системи комплементу, зокрема, з C1q. Таким чином, можна знижувати також комплементзалежну цитотоксичність (CDC). Аналізи зв'язування C1q можна здійснювати для вирішення питання про те, чи має імуноглобулін здатність зв'язуватися з C1q і, відповідно, чи має він CDC-активність (див., наприклад, аналіз зв'язування C1q і C3с за допомогою ELISA, описаний в WO 2006/029879 і WO 2005/100402). Для аналізу активації комплементу можна здійснювати CDC-аналіз (див., наприклад, Gazzano-Santoro та ін., J Immunol Methods 202, 1996, з.163; Cragg та ін., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 і Cragg і Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

Окрім молекул імуноглобуліну, описаних вище і в публікації PCT WO 2012/130831, імуноглобуліни зі зниженою здатністю зв'язуватися з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією охоплюють також імуноглобуліни із заміною в Fc-області одного або декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (US № 6737056). Зазначені Fc-мутанти охоплюють Fc-мутантів із замінами в двох або більшій кількості амінокислотних положень 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий Fc-мутант "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (US № 7332581).

Імуноглобуліни IgG₄-підкласу мають знижену афінність зв'язування з Fc-рецепторами і зниженими ефекторними функціями у порівнянні з IgG₁-імуноглобулінами. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну, яка входить у злитий білок, відповідно до винаходу, представляє собою імуноглобулін IgG₄-підкласу, насамперед людський імуноглобулін IgG₄-підкласу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений імуноглобулін IgG₄-підкласу містить амінокислотні заміни в Fc-області в положенні S228 (EU-нумерація), зокрема, амінокислотну заміну S228P. Для додаткового зниження його афінності зв'язування з Fc-рецептором і/або його ефекторної функції в одному з варіантів здійснення винаходу зазначений імуноглобулін IgG₄-підкласу містить амінокислотну заміну в положенні L235 (EU-нумерація), зокрема, амінокислотну заміну L235E. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначений імуноглобулін IgG₄-підкласу містить амінокислотну заміну в положенні P329 (EU-нумерація), зокрема, амінокислотну заміну P329G. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений імуноглобулін IgG₄-підкласу містить амінокислотні заміни в положеннях S228, L235 і P329 (EU-нумерація), зокрема, амінокислотні заміни S228P, L235E і P329G. Такі модифіковані імуноглобуліни IgG₄-підкласу і їх здатності зв'язуватися з Fc-рецепторами описані в публікації PCT WO 2012/130831, повністю включеній в даний опис як посилання.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну представляє собою моноклональне антитіло. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну не має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном, насамперед не має здатність специфічно зв'язуватися з людським

антигеном. Відсутність здатності до специфічному зв'язування зазначеної молекули імуноглобуліну з антигеном (тобто відсутність будь-якого зв'язування, яке можна відрізнити від неспецифічної взаємодії) можна визначати, наприклад, за допомогою ELISA або поверхнево плазмонного резонансу, зазначеного в даному описі. Зазначена молекула імуноглобуліну є найбільш цінною, наприклад, для подовження часу напівжиття в сироватці злитого білка, для якого не потрібний спрямований вплив на конкретну тканину.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vh3-23. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, яка щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 9. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vk3-20. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга, яка щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 11. В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 9 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 11. Молекули імуноглобулінів, які містять зазначені послідовності варіабельних областей, не мають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном, насамперед людським антигеном. У них відсутня здатність зв'язуватися зі здоровими тканинами, а також PBMC, вони не мають множинної реактивності і для них не характерно неспецифічне накопичення *in vivo* за даними візуалізації (дані не представлені). Послідовності варіабельних областей повністю ґрунтуються на послідовностях людських зародкових ліній за виключенням того, що в CDR3 важкого ланцюга інтродукована послідовність GSG для створення незв'язувального імуноглобуліну.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять амінокислотну мутацію в положенні, що відповідає залишку 88 людського IL-2 (SEQ ID NO: 1). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена амінокислотна мутація представляє собою амінокислотну заміну. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена амінокислотна заміна вибирають з групи N88D, N88R, N88I і N88G. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена амінокислотна заміна представляє собою N88D. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 представляють собою людські молекули IL-2. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність SEQ ID NO: 60 (IL-2 N88D). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять тільки одну амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 не містять амінокислотну мутацію, яка змінює афінність мутантної молекули IL-2 до високоафінного рецептора IL-2 у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять тільки одну амінокислотну мутацію, яка змінює афінність мутантної молекули IL-2 до рецептору IL-2 у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу.

В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 додатково містять амінокислотну заміну в положенні, що відповідає залишку 125 людського IL-2. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена амінокислотна заміна представляє собою C125A. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність SEQ ID NO: 62 (IL-2 N88D з амінокислотною заміною C125A). В альтернативному варіанті цистеїн в положенні 125 можна замінити на іншу нейтральну амінокислоту, таку як серин, треонін або валін, одержуючи C125S IL-2, C125T IL-2 або C125V IL-2 відповідно, як описано в U.S. № 4518584. Як зазначено в цьому патенті, можна також виключати N-кінцевий залишок аланіну в IL-2, одержуючи в результаті такі мутанти, як des-A1 C125S або des-A1 C125A. Альтернативно або додатково молекула IL-2 може охоплювати мутацію, в результаті якої метіонін, який, як правило, присутній в природних умовах в положенні 104 людського IL-2 дикого типу, замінений на нейтральну амінокислоту, таку як аланін (див. U.S. № 5206344). Такі модифікації в людському IL-2 можуть надавати додаткові переваги, такі як підвищена експресія або стабільність.

Мутантні молекули IL-2, що входять у злитий білок, відповідно до винаходу, можуть представляти собою також неглікозильовані молекули IL-2. Наприклад, елімінація сайту О-глікозилювання в молекулі IL-2 дозволяє одержувати більш гомогенний продукт при експресії

злитого білка в клітинах ссавців, таких як клітини CHO або HEK. Так, в деяких варіантах здійснення винаходу мутантні молекули IL-2 додатково містять модифікацію, яка елімінує сайт О-глікозилювання IL-2 в положенні, що відповідає залишку 3 людського IL-2. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація, яка елімінує сайт О-глікозилювання IL-2 в положенні, що відповідає залишку 3 людського IL-2, представляє собою амінокислотну заміну. Прикладами амінокислотних заміни є T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K і T3P. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена модифікація представляє собою амінокислотну заміну T3A. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність SEQ ID NO: 64 (IL-2 T3A N88D).

В конкретному варіанті здійснення винаходу мутантні молекули IL-2 містять амінокислотні заміни T3A, N88D і C125A. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність SEQ ID NO: 58 (IL-2 T3A N88D C125A).

В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування злитого білка, згідно з винаходом, з рецептором IL-2 β знижують щонайменше в 1,5 рази, переважно щонайменше в 2 рази або щонайменше в 3 рази у порівнянні з зв'язуванням відповідного злитого білка, який містить дві молекули IL-2 дикого типу, з рецептором IL-2 β . В одному з варіантів здійснення винаходу злитий білок, відповідно до винаходу, зв'язується з рецептором IL-2 β з константою афінності (K_D), яка перевищує щонайменше в 2 рази величину K_D відповідного злитого білка який містить дві молекули IL-2 дикого типу, за даними вимірювань методом SPR при 25°C. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений рецептор IL-2 β представляє собою людський зазначений рецептор IL-2 β . В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування злитого білка, згідно з винаходом, з рецептором IL-2 α приблизно дорівнює зв'язуванню відповідного злитого білка, який містить дві молекули IL-2 дикого типу, з рецептором IL-2 α . В одному з варіантів здійснення винаходу злитий білок, відповідно до винаходу, зв'язується рецептором IL-2 α з константою афінності (K_D), яка приблизно дорівнює величині K_D відповідного злитого білка який містить дві молекули IL-2 дикого типу, за даними вимірювань методом SPR при 25°C. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений рецептор IL-2 α представляє собою людський рецептор IL-2 α . Метод оцінки афінності зв'язування з рецептором IL-2 β або рецептором IL-2 α за допомогою SPR представлений в даному описі. Згідно з одним з варіантів здійснення винаходу афінність зв'язування (K_D) вимірюють за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, застосовуючи пристрій BIACORE® T100 (фірма GE Healthcare), при 25°C із застосуванням рецепторів IL-2, іммобілізованих на CM5-чипах або сенсibilізованих стрептавідином чипах. Константу афінності (K_D) розраховують у вигляді відношення k_{off}/k_{on} (див., наприклад, Chen та ін., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

Конкретним об'єктом винаходу є злитий білок, що містить (I) молекулу імуноглобуліну IgG₁-підкласу, яка містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G (EU-нумерація) у важких ланцюгах імуноглобуліну, і (II) дві мутантні молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), які містять амінокислотну заміну N88D, кожна з яких злита на N-кінцевій амінокислоті з C-кінцевою амінокислотою одного з важких ланцюгів імуноглобуліну через пептидний лінкер. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну і зазначені молекули IL-2 є людськими. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 9 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 11. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу, кожна із зазначених молекул IL-2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). В ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений злитий білок містить поліпептидну послідовність, ідентичну щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % послідовності SEQ ID NO: 50, і поліпептидну послідовність, ідентичну щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % послідовності SEQ ID NO: 19.

Як продемонстровано в прикладах, злитий білок, відповідно до винаходу, вибірково активує регуляторні Т-клітин (тобто практично без супутньої активації інших субпопуляцій Т-клітин і/або природних клітин-кілерів (NK-клітин). Так, один з об'єктів винаходу відноситься до злитого білка, що містить молекулу імуноглобуліну і дві мутантні молекули IL-2, де зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини у порівнянні з ефекторними Т-клітинами і NK-клітинами, насамперед у порівнянні з канонічними CD4⁺-Т-клітинами, CD8⁺-Т-клітинами і NK-клітинами. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок активує регуляторні Т-клітини щонайменше в 10 разів, щонайменше в 100 разів або щонайменше в 1000 разів в більшому ступені, ніж ефекторні Т-клітини і NK-клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини у порівнянні з канонічними

CD4⁺-Т-клітинами пам'яті. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений злитий білок активує регуляторні Т-клітини щонайменше в 10 разів, щонайменше в 100 разів або щонайменше в 1000 разів в більшому ступені, ніж канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначену активацію визначають шляхом вимірювання рівнів фосфорилування внутрішньоклітинного STAT, насамперед STAT5. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене вимірювання рівнів фосфорилування внутрішньоклітинного STAT здійснюють за допомогою проточного цитометричного аналізу. В одному з варіантів здійснення винаходу величина EC₅₀ для зазначеного злитого білка, яка характеризує індукцію передачі сигналу рецептора IL-2 в регуляторних Т-клітинах, щонайменше в 10 разів, щонайменше в 100 разів або щонайменше в 1000 разів менше, ніж величина EC₅₀, яка характеризує індукцію передачі сигналу рецептора IL-2 в ефекторних Т-клітинах і НК-клітинах. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена індукція передачі сигналу рецептора IL-2 представляє собою індукцію фосфорилування STAT. В одному з варіантів здійснення винаходу величина EC₅₀, яка характеризує індукцію передачі сигналу рецептора IL-2 в регуляторних Т-клітинах, щонайменше в 10 разів, щонайменше в 100 разів або щонайменше в 1000 разів менше, ніж величина EC₅₀, яка характеризує індукцію передачі сигналу рецептора IL-2 в канонічних CD4⁺-Т-клітинах пам'яті. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена індукція передачі сигналу рецептора IL-2 представляє собою індукцію фосфорилування STAT.

В іншому об'єкті винаходу запропонований злитий білок насамперед для застосування з метою вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене застосування полягає в тому, що приводять в контакт регуляторні Т-клітини з зазначеним злитим білком *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене застосування додатково полягає в тому, що приводять в контакт інші (що відрізняються від регуляторних) Т-клітини з зазначеним злитим білком. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене застосування представляє собою застосування *in vitro*, і зазначений злитий білок застосовують в концентрації приблизно 10 нг/мл або менше, переважно приблизно 1 нг/мл або менше. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначене застосування представляє собою застосування *in vivo*, і зазначений злитий білок застосовують в дозі, що складає приблизно 100 мкг/кг ваги тіла або менше, насамперед приблизно 25 мкг/кг ваги тіла або менше, більш переважно приблизно 10 мкг/кг ваги тіла або менше (де поняття "вага тіла" відноситься до ваги тіла індивідуума, якому вводять злитий білок).

Винахід відноситься також до способу вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*, який полягає в тому, що приводять до контакт зазначені регуляторні Т-клітини зі злитим білком, запропонованим у винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений спосіб додатково полягає в тому, що приводять в контакт інші (що відрізняються від регуляторних) Т-клітини з зазначеним злитим білком. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена активація охоплює індукцію проліферації і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений спосіб представляє собою спосіб *in vitro*, і зазначений злитий білок застосовують в концентрації приблизно 10 нг/мл або менше, зокрема, приблизно 1 нг/мл або менше. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначений спосіб представляє собою спосіб *in vivo*, і зазначений злитий білок застосовують в дозі приблизно 100 мкг/кг ваги тіла або менше, переважно приблизно 25 мкг/кг ваги тіла або менше, більш переважно приблизно 10 мкг/кг ваги тіла або менше (де поняття "вага тіла" відноситься до ваги тіла індивідуума, якому вводять злитий білок).

В деяких варіантах злитого білка, застосування або способу, описаних в попередніх параграфах, зазначена активація охоплює індукцію проліферації регуляторних Т-клітин і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор в регуляторних Т-клітинах. Індукцію проліферації можна виміряти, наприклад, шляхом визначення внутрішньоклітинного маркера проліферації Ki-67 згідно з методом, описаним в прикладах. В одному з варіантів здійснення винаходу проліферація регуляторних Т-клітин, активованих злитим білком, запропонованим у винаході, підвищується щонайменше приблизно в 1,5 рази, щонайменше приблизно в 2 рази або щонайменше приблизно в 3 рази у порівнянні з проліферацією неактивованих регуляторних Т-клітин. В одному з варіантів здійснення винаходу проліферація інших (які відрізняються від регуляторних) Т-клітин і/або НК-клітин, що контактують зі злитим білком, запропонованим у винаході, підвищується менше ніж приблизно в 1,5 рази, менше ніж приблизно в 1,2 рази або менше ніж приблизно в 1,1 рази у порівнянні з проліферацією відповідних клітин, які не мали контакту з зазначеним злитим білком. Індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор можна виміряти, наприклад, шляхом визначення фосфорильованого STAT5 відповідно до методу, описаного в прикладах. В одному з варіантів здійснення винаходу, передача сигналів через IL-2 рецептор в регуляторних Т-клітинах, активованих злитим білком, запропонованим у винаході,

підвищується щонайменше приблизно в 1,5 рази, щонайменше приблизно в 2 рази, щонайменше приблизно в 3 рази або щонайменше приблизно в 5 разів у порівнянні з передачею сигналів через IL-2-рецептор в неактивованих регуляторних Т-клітинах. В одному з варіантів здійснення винаходу передача сигналів через IL-2-рецептор в інших (які відрізняються від регуляторних) Т-клітинах і/або NK-клітинах, які контактують зі злитим білком, запропонованим у винаході, підвищується менше ніж приблизно в 1,5 рази або менше ніж приблизно в 1,2 рази, або менше ніж приблизно в 1,1 рази у порівнянні з передачею сигналів через IL-2-рецептор в відповідних клітинах, які не мали контакту з зазначеним злитим білком.

Полінуклеотиди

Винахід відноситься також до полінуклеотидів, що кодують злитий білок, зазначений в даному описі, або його фрагмент.

Полінуклеотиди, запропоновані у винаході, охоплюють полінуклеотиди, послідовність яких щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовностям, представленим в SEQ ID NO: 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 і 65, включаючи їх функціональні фрагменти або варіанти.

Полінуклеотиди, які кодують злиті білки, запропоновані у винаході, можна експресувати у вигляді індивідуального полінуклеотиду, який кодує повний злитий білок, або у вигляді декількох (наприклад, двох або більшої кількості) полінуклеотидів, для яких характерна сумісна експресія. Поліпептиди, які кодуються полінуклеотидами, які сумісно експресуються, можуть бути зв'язані за допомогою, наприклад, дисульфідних мостиків або інших засобів, з утворенням функціонального злитого білка. Наприклад, область, що містить легкий ланцюг імуноглобуліну, може кодуватися полінуклеотидом, відмінним від полінуклеотиду, що кодує область, яка містить важкий ланцюг імуноглобуліну. При сумісній експресії поліпептиди важкого ланцюга повинні бути асоційовані з поліпептидами легкого ланцюга з утворенням імуноглобуліну.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є полінуклеотид, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує послідовність варіабельної області, представлену в SEQ ID NO: 9 або 11. Іншим варіантом здійснення даного винаходу є полінуклеотид, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 19 або 50. Іншим варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична нуклеотидній послідовності, представленій в SEQ ID NO 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 або 65. Іншим варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, яка кодує послідовність варіабельної області, яка щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 9 або 11. Іншим варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, яка щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 19 або 50. Винахід відноситься до полінуклеотиду, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, що кодує послідовності варіабельних областей SEQ ID NO: 9 або 11 з консервативними амінокислотними замінами. Винахід відноситься також до полінуклеотиду, що кодує злитий білок, який містить молекулу імуноглобуліну і дві молекули IL-2, або його фрагмент, де полінуклеотид містить послідовність, що кодує поліпептидні послідовності SEQ ID NO: 19 або 50 з консервативними амінокислотними замінами.

В деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотид або нуклеїнова кислота представляє собою ДНК. В інших варіантах здійснення винаходу полінуклеотид, що запропонований в даному винаході, представляє собою РНК, наприклад, в формі матричної РНК (мРНК). РНК, запропонована в даному винаході, може бути одноланцюговою або дволанцюговою.

Методи рекомбінації

Злиті білки, запропоновані у винаході, можна одержувати, наприклад, шляхом твердофазного пептидного синтезу (наприклад, твердофазного синтезу Мерифілда) або методами рекомбінації. Для рекомбінантного одержання один або декілька полінуклеотидів, які

кодує злитий білок (фрагмент), наприклад, описаний вище, виділяють і вбудовують в один або декілька векторів для подальшого клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Зазначений полінуклеотид легко виділяти і секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур. Одним з варіантів здійснення винаходу є вектор, переважно експресійний вектор, що містить один або

5 декілька полінуклеотидів, що запропоновані у винаході. Методи, добре відомі спеціалістам в даній галузі, можна застосовувати для конструювання експресійних векторів, що містять що кодує послідовність злитого білка (фрагмента) наряду з прийнятними сигналами, які контролюють транскрипцію/трансляцію. Ці методи охоплюють технології рекомбінантної ДНК *in vitro*, методи синтезу і *in vivo* рекомбінації/генетичної рекомбінації (див., наприклад, методи,

10 описані у Maniatis та ін., *Maniatis та ін., Molecular Cloning A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; і Ausubel та ін., *Current Protocols in Molecular Biology*, вид-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Експресійний вектор може представляти собою частину плазміди, вірусу або може представляти собою фрагмент нуклеїнової кислоти. Експресійний вектор охоплює касету експресії, в якій полінуклеотид, що

15 кодує злитий білок (фрагмент) (тобто що кодує область), клонують із забезпеченням функціонального зв'язку з промотором і/або іншими елементами, які контролюють транскрипцію або трансляцію. В контексті даного опису "область, яка кодує" представляє собою частину нуклеїнової кислоти, яка складається з кодонів, які трансклюють в амінокислоти. Хоча "стоп-кодон" (TAG, TGA або TAA) не трансклюється в амінокислоту, то він, у випадку його присутності,

20 може розглядатися як частина кодувальної області, однак будь-які фланкувальні послідовності, наприклад, промотори, сайти зв'язування рибосом, термінатори транскрипції, інтрони, 5'- і 3'-нетрансльовані області тощо, не є частиною кодувальної області. Дві або більша кількість областей які кодують може бути присутньою в індивідуальній полінуклеотидній конструкції, наприклад, індивідуальному векторі, або в різних полінуклеотидних конструкціях, наприклад, в

25 різних векторах. Окрім того, будь-який вектор може містити одну область, що кодує або може містити дві або більшу кількість областей, які кодують, наприклад, вектор, що запропонований в даному винаході, може кодувати один або декілька поліпептидів, які пост- або котрансляційно розділюються на кінцеві білки шляхом протеолітичного розщеплення. Окрім того, вектор, полінуклеотид або нуклеїнова кислота, запропонований/запропонована у винаході, може

30 кодувати гетерологічні кодувальні області, або злиті, або не злиті з першим або другим полінуклеотидом, який кодує злитий білок (фрагмент), відповідно до винаходу, їх або варіанти або похідні. Гетерологічні кодувальні області охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) спеціалізовані елементи або мотиви, такі як секреторний сигнальний пептид або гетерологічний функціональний домен. Функціональний зв'язок має місце, коли кодувальна область генного продукту, наприклад поліпептиду, асоційована з однією або декількома регуляторними послідовностями таким чином, щоб експресія генного продукту знаходилась під впливом або контролем регуляторної(их) послідовності(ей). Два ДНК-фрагмента (таких як кодувальна

35 область поліпептиду і асоційований з нею промотор) є "функціонально зв'язаними", якщо індукція промоторної функції приводить до транскрипції мРНК, яка кодує потрібний генний продукт, і якщо природа зв'язку між двома ДНК-фрагментами не впливає на здатність регулювальних експресію послідовностей спрямовувати експресію генного продукту, або не впливає на здатність ДНК-матриці до транскрипції. Таким чином, промоторна область повинна бути функціонально зв'язана з нуклеїновою кислотою, яка кодує поліпептид, якщо промотор має здатність здійснювати транскрипцію нуклеїнової кислоти. Промотор може представляти собою

45 специфічний для клітини промотор, який забезпечує значну транскрипцію ДНК тільки в попередньо відібраних клітинах. Інші контролювальні транскрипцію елементи, окрім промотора, наприклад, енхансери, оператори, репресори і сигнали термінації транскрипції, можна функціонально зв'язувати з полінуклеотидом для забезпечення специфічної для клітини транскрипції. Прийнятні промотори й інші контролювальні транскрипцію області представлені в

50 даному описі. Спеціалістам в даній галузі відомо широка різноманітність контролювальних транскрипцію областей. Вони охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) контролювальні транскрипцію області, які функціонують в клітинах хребетних тварин, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) сегменти промоторів і енхансерів з цитомегаловірусів (наприклад, негайно-ранній промотор в поєднанні з інтроном -A), мавпячого вірусу 40 (наприклад, ранній промотор) і ретровірусів (таких як вірус саркоми Рауса). Інші контролювальні транскрипцію області охоплюють області, виведені з генів хребетних тварин, таких як ген актину, білка теплового шоку, бичачого гормону росту й кролячого β -глобіну, а також інші послідовності, які можуть контролювати експресію генів в еукаріотичних клітинах. Додаткові прийнятні контролювальні транскрипцію області охоплюють тканиноспецифічні промотори і енхансери, а

60 також індукційні промотори (наприклад, промотори, індуковані тетрацикліном). Аналогічно до

цього, звичайним спеціалістам в даній галузі відомо широка різноманітність контролювальних трансляцій елементів. Вони охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) сайти зв'язування рибосом, кодони ініціації трансляції і термінувальні кодони й елементи, виведені з вірусних систем (зокрема, внутрішній сайт зв'язування (посадки) рибосом або IRES, який позначають також як CITE-послідовність). Касета експресії може охоплювати також інші характерні структури, такі як сайт ініціації реплікації і/або інтегровані в хромосому елементи, такі як довгі кінцеві повтори (LTR) ретровірусів, або інвертовані кінцеві повтори (ITR) аденоасоційованого вірусу (AAV).

Кодувальні області полінуклеотиду і нуклеїнової кислоти, запропоновані в даному винаході, можуть бути асоційовані з додатковими кодувальними областями, які кодують секреторні або сигнальні пептиди, які спрямовують секрецію поліпептиду, який кодується полінуклеотидом, запропонованим в даному винаході. Наприклад, якщо потрібні секретія злитого білка, то ДНК, яка кодує сигнальну послідовність, можна поміщати проти ходу транскрипції відносно нуклеїнової кислоти, яка кодує злитий білок, відповідно до винаходу, або його фрагмент. Відповідно до гіпотези, яка стосується сигналів, білки, які секретуються клітинами ссавців, мають сигнальний пептид або секреторну лідерну послідовність, який/яка відщеплюється від зрілого білка після ініціації експорту збільшеного білкового ланцюга через шорсткуватий ендоплазматичний ретикулум. Звичайним спеціалістам в даній галузі повинно бути очевидним, що поліпептиди, які секретуються клітинами хребетних тварин, як правило, мають сигнальний пептид, злитий з N-кінцем поліпептиду, який відщеплюється від трансльованого поліпептиду з утворенням секретованої або "зрілої" форми поліпептиду. В деяких варіантах здійснення винаходу застосовують нативний сигнальний пептид, наприклад, сигнальний пептид важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобуліну або функціональне похідне зазначеної послідовності, яке зберігає здатність забезпечувати секрецію поліпептиду, функціонально зв'язаного з ним. Альтернативно до цього, можна застосовувати гетерологічний сигнальний пептид ссавців або його функціональне похідне. Наприклад, лідерну послідовність дикого типу можна замінити на лідерну послідовність людського тканинного активатора плазміногену (TPA) або мишачої β -глюкуронідази. Приклади амінокислотних і полінуклеотидних послідовностей секреторних сигнальних пептидів представлені в SEQ ID NO: 39-47.

ДНК, що кодує коротку білкову послідовність, яку можна застосовувати для полегшення подальшої очистки (наприклад, гістидинову мітку), або призначену для мічення злитого білка, можна включати всередину або на кінці полінуклеотиду, що кодує злитий білок (фрагмент).

Додатковим варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, що містить один або декілька полінуклеотидів, що запропоновані у винаході. Деякими варіантами здійснення винаходу є клітина-хазяїн, що містить один або декілька векторів, що запропоновані у винаході. Полінуклеотиди і вектори можуть мати будь-які особливості, індивідуально або в поєднанні, зазначені в даному описі стосовно полінуклеотидів і векторів відповідно. В одному з таких варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн містить вектор (наприклад, трансформована або трансфектована ним), що містять полінуклеотид, який кодує злитий білок (частина злитого білка), згідно з винаходом. В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн" відноситься до будь-якого типу клітинної системи, яку можна конструювати для одержання злитих білків, що запропоновані у винаході, або їх фрагментів. Клітини-хазяї, придатні для реплікації й для підтримання експресії злитих білків, добре відомі в даній галузі. Такі клітини можна трансфектувати або трансдукувати відповідним чином конкретним експресійним вектором і можна вирощувати більшу кількість клітин, які містять вектор з метою внесення в ферментери для великомасштабних процесів одержання злитого білка в достатніх для клінічних застосувань кількостях. Прийнятними клітинами-хазяями є прокаріотичні мікроорганізми, такі як *E. coli*, або різні еукаріотичні клітини, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини комах або т.п. Наприклад, поліпептиди можна одержувати в бактеріях, насамперед в тих випадках, коли відсутня потреба в глікозилюванні. Після експресії поліпептид можна виділяти з пасти бактеріальних клітин в розчинній фракції і можна додатково очищувати. Окрім прокаріот, як хазяїв для клонування або експресії векторів, які кодують поліпептид, можна застосовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, включаючи штами грибів і дріжджів, шляхи глікозилювання яких були "гуманізовані", що дозволяє одержувати поліпептид з частково або повністю людської схемою глікозилювання (див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 і Li та ін., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Клітини-хазяї, які можна застосовувати для експресії (глікозилюваних) поліпептидів, одержують також з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних тварин). Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, а також можна застосовувати клітини рослин. Були виявлені багаточисельні бакуловірусні штами й відповідні придатні для них як хазяї клітини комах, насамперед для трансфекції клітин

Spodoptera frugiperda. Як хазяї можна застосовувати також культури рослинних клітин (див., наприклад, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (опис технології PLANTIBODIES™ для одержання антитіл в трансгенних рослинах). Як хазяї можна застосовувати також клітини хребетних тварин. Наприклад, можна застосовувати клітинні лінії ссавців, які адаптовані до росту в суспензії. Іншими прикладами прийнятних ліній клітин-хазяїв є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія клітин нирки ембріону людини (293 або клітини лінії 293, субклоновані з метою вирощування в суспензійній культурі, Graham та ін., J. Gen. Virol., 36, 1977, з. 59); клітини нирки дитинча хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (TM4-клітини, описані, наприклад, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартишки (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A); клітини легені людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, описані, наприклад, у Mather та ін., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клітини MRC 5 і клітини FS4. Іншими цінними лініями клітин-хазяїв ссавців є клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи DHFR⁻-CHO-клітини (Urlaub та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, з. 4216); і клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд конкретних ліній клітин-хазяїв ссавців, які можна застосовувати для виробництва білка, див., наприклад, у Yazaki і Wu, в: Methods in Molecular Biology під ред. B.K.C. Lo, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клітини-хазяї охоплюють вирощувані клітини, наприклад, вирощувані клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах, клітини бактерій і клітини рослин (але не обмежуючись тільки ними), а також клітини, які знаходяться в організмі трансгенної тварини, трансгенної рослини або вирощуваної рослинної або тваринної тканини. В одному з варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн представляє собою еукаріотичну клітину, переважно клітину ссавці, таку як клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітину нирки людського ембріону (HEK) або лимфоїдну клітину (наприклад, клітину Y0, NS0, Sp20).

В даній галузі відомі стандартні технології для експресії сторонніх генів в цих системах. Клітини, що експресують поліпептид, який містить або важкий, або легкий ланцюг імуноглобуліну, можна конструювати таким чином, щоб в них відбувалась експресія також інших ланцюгів імуноглобуліну, так, щоб продукт, який експресується, представляв собою імуноглобулін, який містить як важкий, так і легкий ланцюг.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб одержання злитого білка, згідно з винаходом, де спосіб полягає в тому, що культивують клітину-хазяїна, яка містить полінуклеотид, який кодує злитий білок, представлений в даному описі, в умовах, придатних для експресії злитого білка, і виділяють злитий білок з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітини-хазяїна).

В злитих білках, що запропоновані у винаході, компоненти (молекула імуноглобуліну і молекула IL-2) генетично зливають один з іншим. Злиті білки можна створювати так, щоб їх компоненти зливати один з іншим безпосередньо або опосередковано через лінкерну послідовність. Склад і довжину лінкера можна визначати за допомогою методів, добре відомих в даній галузі, і можна оцінювати його ефективність. Додаткові послідовності можна охоплювати також в сайт розщеплення для розділення при необхідності індивідуальних компонентів злитого білка, наприклад, розпізнавану ендопептидазою послідовність.

В деяких варіантах здійснення винаходу злиті білки, запропоновані у винаході, містять щонайменше варіабельну область імуноглобуліну, яка має здатність зв'язуватися з антигеном. Варіабельні області можуть утворювати частину наявних в природних умовах або не наявних в природних умовах антитіл або їх фрагментів або можуть походити з них. Методи одержання поліклональних антитіл і моноклональних антитіл добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Harlow and Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не наявні в природних умовах антитіла можна створювати за допомогою твердофазного пептидного синтезу, можна одержувати за допомогою методів рекомбінації (наприклад, описаних в US № 4186567) або можна одержувати, наприклад, шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек, що містять варіабельні області важких ланцюгів і варіабельні області легких ланцюгів (див., наприклад, US № 5969108 на ім'я McCafferty).

Згідно з винаходом можна застосовувати будь-які види імуноглобулінів тваринного походження. Приклади імуноглобулінів, які можна застосовувати згідно з даним винаходом, охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) імуноглобуліни мишей, приматів або людини. Якщо злитий білок призначений для застосування на людині, то можна застосовувати хімерну форму імуноглобуліну, в якій константні області імуноглобуліну одержують з людського антитіла. Гуманізовану або повністю людську форму імуноглобуліну можна одержувати також за

допомогою методів, добре відомих в даній галузі (див., наприклад, US № 5565332 на ім'я Winter). Для здійснення гуманізації можна застосовувати різні методи, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) (а) трансплантація нелюдських (наприклад, з антитіла-донора) CDR в людський (наприклад, антитіло-реципієнт) каркасна ділянка і константні області, які зберігають або не зберігають залишки каркасної ділянки, які мають вирішальне значення (наприклад, залишки, важливі для зберігання гарної антигензв'язувальної афінності або функцій антитіла), (б) трансплантація тільки нелюдських визначальних специфічностей ділянок (SDR або a-CDR; залишки мають вирішальне значення для взаємодії антитіло-антиген) в людську каркасну ділянку і константні області, або (в) трансплантація повністю нелюдських варіабельних доменів і їх "маскування" сегментом, який нагадує людський шляхом заміни поверхневих залишків. Огляд гуманізованих антитіл і методів їх одержання див., наприклад, у Almagro і Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, і они описані також, наприклад, у Riechmann та ін., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen та ін., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; U.S. №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Jones та ін., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison та ін., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison і Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen та ін., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immunol* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri та ін., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34) (опис трансплантації SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (опис "повторного покриття"); Dall'Acqua та ін., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описані "перестановки FR") і Osbourn та ін., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, і Klimka та ін., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (опис підходу на основі "цілеспрямованої селекції" для перестановки FR). Переважні імуноглобуліни, запропоновані у винаході, представляють собою людські імуноглобуліни. Людські антитіла і людські варіабельні області можна одержувати за допомогою різних методик, відомих в даній галузі. Людські антитіла описані в цілому у van Dijk і van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 і Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Людські варіабельні області можуть утворювати частину людських моноклональних антитіл або можуть бути одержані з них за допомогою методу гібридом (див., наприклад, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, вид-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Людські антитіла і людські варіабельні області можна одержувати також шляхом введення імуногена трансгенній тварині, яку модифіковано таким чином, що може продукувати інтактні людські антитіла або інтактні антитіла з людськими варіабельними областями у відповідь на контрольне зараження антигеном (див., наприклад, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Людські антитіла й людські варіабельні області можна створювати також шляхом виділення послідовностей варіабельних областей Fv-клону, відібраних з людських фагових дисплейних бібліотек (див., наприклад, Hoogenboom та ін. в: *Methods in Molecular Biology*, під ред. O'Brien та ін., вид-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); і McCafferty та ін., *Nature* 348, сс. 552-554; Clackson та ін., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, як правило, експонує фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових Fv- (scFv)-фрагментів, або у вигляді Fab-фрагментів.

В деяких варіантах здійснення винаходу імуноглобуліни, що входять у злиті білки, запропоновані в даному винаході, створюють так, щоб вони мали підвищену афінність зв'язування, наприклад, за допомогою методів, описаних в публікації PCT WO 2011/020783 (див. приклади, що стосуються дозрівання афінності) або публікації заявки на патент США № 2004/0132066, повний зміст яких включено в даний опис як посилання. Здатність злитих білків, що запропоновані у винаході, зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою можна оцінювати кількісно або за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), або іншими методиками, відомими спеціалісту в даній галузі, наприклад, за допомогою метода поверхневого плазмонного резонансу (Liljeblad та ін., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229). Аналізи в умовах конкуренції можна застосовувати для ідентифікації антитіла, яке конкурує з референс-антитілом за зв'язування з конкретним антигеном. В деяких варіантах здійснення винаходу зазначене антитіло, яке конкурує зв'язується з тим самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується референс-антитіло. Докладня, наведені як приклади, методи картування епітопу, з яким зв'язується антитіло, представлені у Morris, "Epitope Mapping Protocols" в: *Methods in Molecular Biology*, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При здійсненні наведеного як приклад аналізу в умовах конкуренції іммобілізований антиген інкубують в розчині, який містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з антигеном, і друге немічене антитіло, яке підлягає тестуванню відносно його здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з антигеном. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридоми. Як контроль іммобілізований антиген інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло що містить. Після інкубації в умовах, що забезпечують

зв'язування першого антитіла з антигеном, надлишок незв'язаного антитіла видаляють і оцінюють кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном, суттєво знижена у зразку для тестування у порівнянні з контрольним зразком, то це свідчить про те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з антигеном (див. Harlow і Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Злиті білки, одержані за допомогою представлених в даному описі методів, можна очищати з використанням відомих в даній галузі методик, таких як рідинна хроматографія високого розділення, іонообмінна хроматографія, гель-електрофорез, афінна хроматографія, гель-фільтрація тощо. Фактичні умови, застосовні для очистки конкретного білка, залежать, зокрема, від таких факторів, як чистий заряд, гідрофобність, гідрофільність тощо, і вони повинні бути очевидними спеціалісту в даній галузі. Для очистки антитіла за допомогою афінної хроматографії можна застосовувати ліганд, рецептор або антиген, з яким зв'язується злитий білок. Для очистки, наприклад, за допомогою афінної хроматографії злитих білків, що запропоновані у винаході, можна застосовувати матрикс з білком А або білком G. Наприклад, послідовне застосування афінної хроматографії на білку А або G і гель-фільтрації можна застосовувати для виділення злитого білка, практично відповідно до методу, описаного в розділі "Приклади". Чистоту злитих білків можна визначати за допомогою будь-якого з широкої різноманітності добре відомих аналітичних методів, включаючи гель-електрофорез, рідинну хроматографію високого тиску тощо. Наприклад, встановлено, що злиті білки, які експресували відповідно до описаним в розділі "Приклади" методам, є інтактними і правильно зібраними, що продемонстровано за допомогою ДСН-ПААГ у відновлювальних і невідновлювальних умовах (див., наприклад, фіг. 4).

Композиції, препаративні форми і шляхи введення

Наступним об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять будь-який з злитих білків, представлених в даному описі, наприклад, призначення для застосування у будь-якому із зазначених нижче терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-який із злитих білків, представлених в даному описі, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-який з злитих білків, представлених в даному описі, і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, зазначений нижче.

Окрім того, представлений спосіб одержання злитого білка, згідно з винаходом, в формі, придатній для введення *in vivo*, який полягає в тому, що (а) одержують злитий білок, відповідно до винаходу, і (б) поєднують в препаративній формі злитий білок щонайменше з одним фармацевтично прийнятним носієм, де приготовлений препарат злитого білка є придатним для застосування *in vivo*.

Фармацевтичні композиції, запропоновані в даному винаході, містять в терапевтично ефективній кількості один або декілька злитих білків, який(і) розчинений(і) або диспергований(і) у фармацевтично прийнятному носії. Поняття "фармацевтично або фармакологічно прийнятний" відноситься до молекулярних субстанцій і композицій, які, в цілому, є нетоксичними для реципієнтів в застосовних дозах і концентраціях, тобто не викликають шкідливі, алергійні або інші небажані реакції при відповідному введенні тварині, такій, наприклад, як людина. Приготування фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше один злитий білок і необов'язково додаткову діючу речовину, повинно бути очевидним спеціалістам в даній галузі в світлі даного опису, наприклад, з довідника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, включеного в даний опис як посилання. Окрім того, очевидно, що препарати, призначення для введення тварині (наприклад, людині), повинні задовольняти вимоги стандартів стерильності, пірогенності й загальної безпеки й чистоти, розроблених відділенням біологічних стандартів FDA (Управління контролю харчових продуктів і лікарських засобів) або відповідним уповноваженим органом інших країн. Переважними композиціями є ліофілізовані препаративні форми або водні розчини. В контексті даного опису "фармацевтично прийнятний носій" охоплює будь-які й всі розчинники, буфери, дисперсійні середовища, покриття, поверхнево-активні речовини, антиоксиданти, консерванти (наприклад, антибактеріальні агенти, протигрибкові агенти), агенти для надання ізотонічності, агенти, які уповільнюють абсорбцію, солі, білки, лікарські засоби, стабілізатори лікарських засобів, полімери, гелі, зв'язувальні речовини, ексципієнти, розпушувачі, замащувачі, підсолоджувальні речовини, коригенти, барвники і подібні матеріали і їх комбінації, які повинні бути відомі звичайному спеціалісту в даній галузі (див., наприклад, довідник Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включений в даний опис як посилання). Будь-який загальноприйнятний носій, якщо тільки він є сумісним з діючою

речовиною, можна застосовувати в терапевтичних або фармацевтичних композиціях.

Композиція може містити різні типи носіїв залежно від того, чи вводять її в твердій, рідкій або аерозольній формі, і від того, чи повинна вона бути стерильною, як у випадку застосування таких шляхів введення, як ін'єкція. Злиті білки, запропоновані в даному винаході (і додатковий

терапевтичний засіб), можна вводити за допомогою будь-якого метода або будь-якої комбінації методів, відомих звичайному спеціалісту в даній галузі (див., наприклад, довідник Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Printing Company, 1990, включений в даний опис як посилання). Для введення поліпептидних молекул, таких як злиті білки, запропоновані у винаході, найбільш часто застосовують парентеральне введення, насамперед, внутрішньовенну ін'єкцію.

Парентеральні композиції охоплюють композиції, створені для введення шляхом ін'єкції, наприклад, підшкірної, внутрішньошкірної, всередину ушкодження, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної, внутрішньом'язової, підоболонкової або внутрішньочеревної ін'єкції. Для ін'єкції злиті білки, запропоновані у винаході, можна охоплювати в препаративні форми у вигляді водних розчинів, переважно у фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний соляний буфер. Розчин може містити агенти, призначені для одержання препаративної форми, такі як суспендувальні, стабілізувальні і/або диспергувальні агенти. Альтернативно до цього, злиті білки можуть знаходитися в порошкоподібній формі, призначеній для відновлення перед застосуванням прийнятним наповнювачем, наприклад, стерильною водою, яка не містить пірогенів. Стерильні розчини для ін'єкцій готують шляхом включення злитих білків, що запропоновані у винаході, в потрібній кількості у відповідний розчинник при необхідності в поєднанні з різними іншими інгредієнтами, перерахованими нижче. Стерильність можна легко забезпечувати, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтрувальні мембрани. Як правило, дисперсії одержують шляхом включення різних стерилізованих діючих речовин в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і/або інші інгредієнти. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкцій, суспензій або емульсій переважними методами одержання є вакуумна сушка або сушка виморожуванням, які дозволяють одержувати порошок діючої речовини в поєднанні з будь-яким додатковим потрібним інгредієнтом з попередньо стерилізованим фільтрацією рідким середовищем. При необхідності рідке середовище перед застосуванням повинно бути відповідним чином забуферене і рідкому розріджувачу спочатку надана ізотонічність за допомогою достатньої кількості соляного розчину або глюкози. Композиція повинна бути стабільною в умовах приготування і зберігання і захищена від забруднювальної дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби. Прийнято підтримувати забруднення ендотоксинами на мінімальному безпечному рівні, наприклад, менше 0,5 нг/мг білка. Придатні фармацевтично прийнятні носії охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними): буфери, такі як фосфатний, цитратний і буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламмонійхлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид; бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол, резорцінол; циклогексанол; 3-пентанол і мета-крезол); низькомолекулярні (які містять менше приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, маннозу або декстрини; хелатувальні агенти, такі як ЕДТК; цукри, такі як сахароза, манніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити сполуки, які підвищують в'язкість суспензії, такі як натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, сорбіт, декстран або т.п. Необов'язково суспензія може містити також стабілізатори або агенти, які підвищують розчинність сполук, що дозволяє одержувати висококонцентровані розчини. Окрім того, суспензії діючих речовин можна одержувати у вигляді відповідних масляних призначених для ін'єкції суспензій. Прийнятні ліпофільні розчинники або наповнювачі охоплюють жирні нелеткі олії, такі як кунжутна олія, або синтетичні ефіри жирних кислот, такі як етилолеати або тригліцериди, або ліпосоми.

Фармацевтичні композиції, які містять злиті білки, запропоновані у винаході, можна готувати за допомогою загальноприйнятих процесів змішування, розчинення, емульгування, капсулювання, захоплення або ліофілізації. Фармацевтичні композиції можна включати в препаративні форми за допомогою загальноприйнятого метода з використанням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, розріджувачів, ексципієнтів або допоміжних речовин, які полегшують процесування білків, з одержанням препаратів, які можна застосовувати в

фармацевтичних цілях. Відповідна форма залежить від вибраного способу введення.

Злиті білки можна охоплювати в композиції у вигляді вільної кислоти або вільної основи, в нейтральній формі або у формі солі.

Фармацевтично прийнятні солі представляють собою солі, які практично зберігають біологічну активність вільної кислоти або вільної основи. Вони охоплюють кислотно-адитивні солі, наприклад, солі, утворені з вільними аміногрупами білкової композиції, або утворені з неорганічними кислотами, такими, наприклад, як соляна або фосфорна кислота, або з органічними кислотами, такими як оцтова, щавлева, винна або мигдальна кислота. Солі, утворені з вільними карбоксильними групами, можна одержувати також з неорганічних основ, таких, наприклад, як гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза; або таких органічних основ як ізопропіламін, триметиламин, гістидин або прокаїн. Фармацевтичні солі мають тенденцію до більш високої розчинності у водних й інших протонних розчинниках у порівнянні з відповідними формами у вигляді вільних основ.

Способи і композиції для терапевтичного застосування

Будь-які злиті білки, представлені в даному описі, можна застосовувати в терапевтичних способах.

Для застосування в терапевтичних способах злиті білки, запропоновані у винаході, можна охоплювати в склад препаративних форм, дозувати і вводити у відповідності з належною клінічною практикою. Фактори, які розглядають в цьому контексті охоплюють конкретне порушення, яке підлягає лікуванню, конкретного ссавця, який підлягає лікуванню, клінічний стан конкретного пацієнта, причину порушення, область введення агенту, метод введення, схему введення й інші фактори, відомі медикам-практикам.

Одним з об'єктів винаходу є злиті білки, запропоновані у винаході, призначення для застосування як лікарського засобу. наступними об'єктами винаходу є злиті білки, запропоновані у винаході, призначення для застосування для лікування захворювання. Деякими варіантами здійснення винаходу є злиті білки, запропоновані у винаході, призначення для застосування в способі лікування. Одним з варіантів здійснення винаходу є злитий білок, представлений в даному описі, призначений для застосування при лікуванні захворювання в індивідуума, який цього потребує. Деякими варіантами здійснення винаходу є злитий білок, призначений для застосування в способі лікування індивідуума, який має захворювання, що полягає в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості злитий білок. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, представляє собою аутоімунне захворювання. Прикладами аутоімунних захворювань є діабет типу 1, псоріаз, астма, ревматоїдний артрит, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, неспецифічний виразковий коліт, системний червоний вовчак (SLE) і розсіяний склероз. В одному з варіантів здійснення винаходу захворювання представляє собою відторгнення трансплантату або реакцію "трансплантат-проти-хазяїна". В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання вибирають з групи, що містить діабет типу 1, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, неспецифічний виразковий коліт, SLE і розсіяний склероз. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою діабет типу 1. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою запальне захворювання кишечника. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою розсіяний склероз. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою астму, легеневий фіброз або обструктивне захворювання легенів. В наступних варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою серцево-судинне захворювання, насамперед атеросклероз і гострий коронарний синдром. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою алергійний стан, насамперед алергію на харчові продукти. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, імунодепресант, якщо захворювання, що підлягає лікуванню, представляє собою аутоімунне захворювання. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу представляє собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є застосування злитого білка, згідно з винаходом, для виробництва або приготування лікарського засобу, який призначений для лікування захворювання в індивідуума, який цього потребує. В одному з варіантів здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, що полягає в тому, що вводять індивідууму, який має захворювання, в терапевтично ефективній кількості лікарський засіб. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, представляє собою аутоімунне захворювання. В одному з варіантів здійснення винаходу захворювання представляє собою відторгнення трансплантату або реакцію "трансплантат-

проти-хазяїна". В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання вибирають з групи, що містить діабет типу 1, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, неспецифічний виразковий коліт, SLE і розсіяний склероз. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою діабет типу 1. В іншому конкретному варіанті здійснення

5 винаходу захворювання представляє собою запальне захворювання кишечника. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою розсіяний склероз. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою астму, легеневий фіброз або обструктивне захворювання легенів. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою алергійний стан, насамперед алергію на харчові продукти. В

10 наступних варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою серцево-судинне захворювання, насамперед атеросклероз і гострий коронарний синдром. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб додатково полягає в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, імунодепресант, якщо захворювання представляє собою аутоімунне захворювання.

15 "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу може представляти собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб лікування захворювання в індивідуума, який полягає в тому, що зазначеному індивідууму в терапевтично ефективній кількості вводять злитий білок, відповідно до винаходу. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначеному індивідууму

20 вводять композицію, яка містить злитий білок, відповідно до винаходу, в фармацевтично прийнятній формі. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, представляє собою аутоімунне захворювання. В одному з варіантів здійснення винаходу захворювання представляє собою відторгнення трансплантату або реакцію "трансплантат-проти-хазяїна". В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання вибирають з групи, що містить діабет типу 1, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, неспецифічний виразковий коліт, SLE і розсіяний склероз. В більш конкретному варіанті

25 здійснення винаходу захворювання представляє собою діабет типу 1. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою запальне захворювання кишечника. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання представляє собою розсіяний склероз. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою астму, легеневий фіброз або обструктивне захворювання легенів. В інших варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою алергійний стан, насамперед алергію на харчові продукти. В наступних варіантах здійснення винаходу захворювання представляє собою серцево-судинне захворювання, насамперед атеросклероз і гострий коронарний синдром. В

30 деяких варіантах здійснення винаходу спосіб додатково полягає в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, імунодепресант, якщо захворювання представляє собою аутоімунне захворювання. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу може представляти собою ссавця, переважно людину.

40 В деяких варіантах здійснення винаходу злиті білки, запропоновані у винаході, в ефективній кількості вводять в клітину. В інших варіантах здійснення винаходу злиті білки, запропоновані у винаході, вводять в терапевтично ефективній кількості індивідууму для лікування захворювання.

Для попередження або лікування захворювання відповідна доза злитого білка, згідно з

45 винаходом (при його застосуванні індивідуально або в поєднанні з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами), повинна залежати від типу захворювання, який підлягає лікуванню, шляху введення, ваги тіла пацієнта, типу злитого білка, серйозності й перебігу захворювання, від того, чи вводять злитий білок в профілактичних або терапевтичних цілях, попередніх або здійснюваних одночасно терапевтичних утручань, історії хвороби

50 пацієнта і відповіді на злитий білок і припису лікаря. Спеціаліст-практик, який відповідає за введення, у будь-якому випадку, повинний визначати концентрацію діючої(их) речовини(в) в композиції і відповідної дози(доз) для конкретного індивідуума. Різні схеми введення доз охоплюють (але, не обмежуючись тільки ними) одноразове введення або декілька введень в різні моменти часу, болюсне введення і пульсуючу інфузію.

55 Злитий білок можна вводити пацієнту у вигляді однієї обробки або серій обробок. В залежності від типу і серйозності захворювання доза злитого білка, що складає приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1–10 мг/кг), може представляти собою початкову можливу дозу для введення пацієнту, наприклад, з використанням одного або декількох індивідуальних введень або за допомогою безперервної інфузії. Типова добова доза може складати від

60 приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більш в залежності від зазначених вище факторів. Для

повторних введеннях протягом декількох днів або більш тривалого періоду в залежності від стану лікування, як правило, повинно тривати до досягнення потрібного пригнічення наявних симптомів захворювання. Як приклад, доза злитого білка може складати від приблизно 0,005 до приблизно 10 мг/кг. В іншому прикладі (але, не обмежуючись тільки зазначеним) доза на одно

5 введення може складати від приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 мкг/кг ваги тіла, приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 до приблизно 1000 мг/кг/ваги тіла або більш, і знаходиться в будь-якому зазначеному діапазоні. Як приклади (але, не обмежуючись тільки ними) зазначеного діапазону, можна вводити від

10 приблизно 5 до приблизно 100 мг/кг ваги тіла, від приблизно 5 мкг/кг ваги тіла до приблизно 500 мг/кг ваги тіла тощо з урахуванням зазначених вище рівнів доз. Так, пацієнту можна вводити одну або декілька доз, що складають приблизно 0,5, 2,0, 5,0 або 10 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Зазначені дози можна вводити переривчасто, наприклад, кожного тижня або кожні три тижні (наприклад, таким чином, щоб пацієнт одержував від приблизно двох до приблизно

15 двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз злитого білка). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу, після якої застосовувати одну або декілька більш низьких доз. Однак можна застосовувати інші схеми введення доз. Успіх такої терапії легко оцінювати за допомогою загальноприйнятих методик і аналізів.

Злиті білки, запропоновані у винаході, як правило, слід застосовувати в кількості, ефективній

20 для досягнення поставленої мети. При застосуванні для лікування або попередження хворобливого стану злиті білки, запропоновані у винаході, або їх фармацевтичні композиції, вводять або застосовують в терапевтично ефективній кількості. Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в компетенції спеціалістів в даній галузі, насамперед в світлі представленого докладного опису винаходу.

Для системного введення терапевтично ефективну дозу можна спочатку визначати за допомогою аналізів *in vitro*, наприклад, аналізів з використанням клітинних культур. Потім дозу можна охоплювати в форму для вивчення на тваринних моделях для досягнення концентрації в кровотоці, яка знаходиться в діапазоні, що охоплює значення IC_{50} , визначене на клітинній культурі. Зазначену інформацію можна застосовувати для більш точного визначення доз, які

30 можна застосовувати на людях.

Початкові дози можна оцінювати також, виходячи з даних, одержаних *in vivo*, наприклад, на тваринних моделях, застосовуючи методики, добре відомі в даній галузі. Звичайний спеціаліст в даній галузі легко може оптимізувати застосування на людях на основі даних, одержаних на тваринах.

Рівень доз й інтервал можна регулювати індивідуально для одержання рівнів в плазмі злитих білків, які є достатніми для підтримання терапевтичного дії. Звичайні дози, призначення для введення пацієнту шляхом ін'єкції, складають від приблизно 0,1 до 50 мг/кг/день, як правило, від приблизно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для досягнення терапевтично ефективних рівнів в плазмі можна вводити декілька доз кожного дня. Рівні в плазмі можна оцінювати, наприклад, за

40 допомогою ЖХВР.

У випадках місцевого застосування або вибіркового поглинання ефективна місцева концентрація злитого білка може не відповідати концентрації в плазмі. Спеціаліст в даній галузі може оптимізувати терапевтично ефективні місцеві дози без проведення надлишкових експериментів.

Застосування в терапевтично ефективній дозі злитих білків, представлених в даному описі, повинно, як правило, забезпечувати терапевтичну користь, не викликаючи суттєву токсичність. Токсичність і терапевтичну ефективність злитого білка можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних процедур на культурах клітин або експериментальних тварин. Аналізи на клітинних культурах і опити на тваринах можна застосовувати для визначення значень LD_{50} (доза, смертельна для 50 % популяції) і ED_{50} (доза, терапевтично ефективна для 50 % популяції). Співвідношення доз, що характеризують токсичні й терапевтичні дії, позначають як терапевтичний індекс, який можна виражати у вигляді відношення LD_{50}/ED_{50} . Злиті білки, що мають високі терапевтичні індекси, є переважними. В одному з варіантів здійснення винаходу злитий білок, що запропонований в даному винаході, характеризується

50 високим терапевтичним індексом. Дані, одержані в аналізах з використанням клітинних культур і в експериментах на тваринах, можна застосовувати для визначення діапазону доз, які можна застосовувати на людях. Доза знаходиться переважно в діапазоні концентрацій в кровотоці, які охоплюють ED_{50} , що мають невисоку токсичність або не мають токсичності. Доза може варіюватися в даному діапазоні в залежності від різних факторів, наприклад, від застосовної лікарської форми, застосовного шляху введення, стану індивідуума і т.п. Точну препаративну

60

форму, шліх введення і дозу може вибирати індивідуально лікар в залежності від стану пацієнта (див., наприклад, Fingl та ін., в: The Pharmacological Basis of Therapeutics, гл. 1, 1975, з. 1, публікація повністю включена в даний опис як посилання).

Для лікаря пацієнтів, яким вводять злиті білки, запропоновані у винаході, повинно бути очевидно, як і коли завершувати, робити перерву або регулювати введення з причин токсичності, дисфункції органів і т.п. І, навпаки, для лікаря повинно бути очевидним, як регулювати лікування в бік застосування більш високих доз, якщо клінічний відповідь є неадекватним (уникаючи токсичності). Величина дози для введення при лікуванні відповідного порушення повинна варіюватися в залежності від серйозності стану, який підлягає лікуванню, шляху введення і т.п. Серйозність стану можна, наприклад, оцінювати серед іншого за допомогою стандартних прогностичних методів оцінки. Окрім того, доза і передбачувана частота введення дози повинна також варіюватися в залежності від віку, ваги тіла і відповіді індивідуального пацієнта.

Інші засоби і варіанти лікування

Злиті білки, запропоновані у винаході, при лікуванні можна вводити в поєднанні з одним або декількома іншими засобами. Наприклад, злитий білок, відповідно до винаходу, можна вводити сумісно щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом. Поняття "терапевтичний засіб" охоплює будь-який засіб, який вводять для лікування симптому або захворювання в індивідуума, який потребує такого лікування. Зазначений додатковий терапевтичний засіб може представляти собою будь-які діючі речовини, які можна застосовувати при конкретному показанні, що підлягає лікуванню, переважно з додатковими видами активності, які не мають негативної дії одна на іншу. В деяких варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб представляє собою імунодепресант.

Зазначені інші засоби можуть бути присутніми в комбінації в кількостях, ефективних для зазначених цілей. Ефективна кількість зазначених інших засобів залежить від кількості застосовного злитого білка, типу порушення або лікування, і інших зазначених вище факторів. Злиті білки, як правило, застосовують в таких самих дозах і з використанням шляхів введення, зазначених в даному описі, або в дозах, що складають приблизно від 1 до 99 % від зазначених в даному описі доз, або в будь-якій дозі і з використанням будь-якого шляху введення, які відповідно до емпіричних/клінічних даних розглядають як прийнятні.

Зазначені вище комбіновані терапії передбачають сумісне введення (коли два або більшу кількість терапевтичних засобів включають в одну і ту ж саму або в окремі композиції) і роздільне введення, у цьому випадку введення злитого білка, згідно з винаходом, можна здійснювати до, одночасно і/або після введення додаткового терапевтичного засобу і/або ад'юванту.

Вироби

Іншим об'єктом винаходу є виріб, який містить продукти, застосовні для лікування, попередження і/або діагностування зазначених вище порушень. Виріб представляє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковку, яка розміщена на контейнері або додається до нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, пухирці, шприці, пакети для внутрішньовенного (iv) розчину тощо. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, яка сама по себе або в поєднанні з іншою композицією є ефективною для лікування, попередження і/або діагностування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може представляти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пляшечку, оснащену пробкою, яку можна проколювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше одна діюча речовина в композиції представляє собою злитий білок, відповідно до винаходу. На етикетці або листівці-вкладиші в упаковку зазначено, що композицію застосовують для лікування вибраного стану. Окрім того, виріб може охоплювати (а) перший контейнер з наявною в ньому композицією, де композиція містить злитий білок, відповідно до винаходу; і (б) другий контейнер з наявною в ньому композицією, де композиція містить додатковий терапевтичний засіб. Відповідно до цього варіанту здійснення винаходу виріб може містити листівку-вкладиш в упаковку, яка містить інформацію про те, що композиції можна застосовувати для лікування конкретного стану. В альтернативному або додатковому варіанті виріб може охоплювати також другий (або третій) контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВІ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Окрім того, він може охоплювати інші продукти, необхідні з комерційної точки зору і з точки зору споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприці.

Приклади

Нижче представлені приклади способів і композицій, що запропоновані у винаході. Як

повинно бути очевидно, можна здійснювати на практиці різні інші варіанти здійснення винаходу з урахуванням представленого вище опису винаходу в цілому.

Методи рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК застосовували стандартні методи, описані у Sambrook J. та ін., Molecular cloning: A laboratory manual; вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенти для молекулярної біології застосовували відповідно до інструкцій виробників. Загальну інформацію, яка стосується нуклеотидних послідовностей легких і важких ланцюгів людських імуноглобулінів, див. у: Kabat E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-оє вид., вид-во NIH, публікація No 91-3242, 1991.

Секвенування ДНК

Послідовності ДНК визначали за допомогою секвенування двох ланцюгів.

Синтез генів

Потрібні сегменти генів або створювали за допомогою ПЛР з використанням відповідних матриць, або синтезували на фірмі Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з синтетичних олігонуклеотидів і ПЛР-продуктів шляхом автоматичного синтезу генів. В випадках, коли точна генна послідовність не була доступною, створювали олігонуклеотидні праймери на основі послідовностей найближчих гомологів і гени виділяли за допомогою ОТ-ПЛР з РНК, одержаної з відповідної тканини. Сегменти генів, фланковані одиничними сайтами, розпізнаваними рестриктазами (ендонуклеазами), клонували в стандартних векторах для клонування/секвенування. Плазмідну ДНК очищали з трансформованих бактерій і визначали концентрацію за допомогою УФ-спектроскопії. Послідовність ДНК субклонуваних фрагментів генів підтверджували ДНК-секвенуванням. Створювали сегменти генів з потрібними сайтами рестрикції, які дозволяють субклонувати їх у відповідних експресійних векторах. Всі конструкції створювали з 5'-кінцевою послідовністю ДНК, що кодує лідерний пептид, який спрямовує секрецію білків в еукаріотичних клітинах. В SEQ ID NO: 39-47 представлені приклади лідерних пептидів і полінуклеотидних послідовностей, які кодують їх.

Одержання злиття β -субодиниця IL-2R-Fc і злиття α -субодиниця IL-2R-Fc

Для вивчення афінності зв'язування рецептора IL-2 створювали "інструмент", який дозволяє експресувати гетеродимерний рецептор IL-2. β -Субодиницю рецептора IL-2 зливали з молекулою Fc, яку створювали таким чином, щоб вона мала здатність до гетеродимеризації (Fc("западина")) (див. SEQ ID NO: 21 і 22 (людські), SEQ ID NO: 27 і 28 (мишачі) і SEQ ID NO: 33 і 34 (мавп циномоглус)), застосовуючи технологію "knobs-into-holes" (Merchant та ін., Nat Biotech. 16, 1998, сс. 677-68). Потім γ -субодиницю рецептора IL-2 зливали з варіантом Fc("виступ") (див. SEQ ID NO: 23 і 24 (людські), SEQ ID NO: 29 і 30 (мишачі) і SEQ ID NO: 35 і 36 (мавп циномоглус)), гетеродимеризованим з Fc("западина"). Потім зазначений злитий білок, що містить гетеродимерний Fc застосовували як субстрат для аналізу взаємодії IL-2/IL-2-рецептор. α -Субодиницю IL-2R експресували у вигляді мономерного ланцюга, що несе сайт розщеплення AcTev і Avi His-метку (SEQ ID NO: 25 і 26 (людські), SEQ ID NO: 31 і 32 (мишачі) і SEQ ID NO: 37 і 38 (мавп циномоглус)). Відповідні субодиниці IL-2R короткочасно експресували в клітинах HEK EBNA 293 з сироваткою у випадку конструкції β -субодиниці IL-2R і без сироватки у випадку конструкції α -субодиниці. Конструкцію β -субодиниці IL-2R очищали на білку А (фірма GE Healthcare) з наступною гель-фільтрацією (фірма GE Healthcare, Супердекс 200). α -Субодиницю IL-2R очищали з використанням His-мітки на колонці NiNTA (фірма Qiagen) з наступною гель-фільтрацією (фірма GE Healthcare, Супердекс 75). Амінокислотні й відповідні нуклеотидні послідовності різних конструкцій рецепторів представлені в SEQ ID NO: 21-38.

Одержання злитих білків

Послідовності ДНК створювали шляхом генного синтезу і/або класичних методів молекулярної біології і субклонували в експресійних векторах ссавців під контролем промотора MPSV і проти хода транскрипції відносно синтетичного сайту полі-А, кожний вектор ніс послідовність OriP EBV. Злиті білки, які застосовували в описаних нижче прикладах, одержували шляхом контрансфекції клітин лінії HEK293-EBNA, що знаходяться на експоненціальній фазі росту, експресійними векторами ссавців, застосовуючи опосередковану фосфатом кальцію трансфекцію. Альтернативно до цього, HEK293-клітини, що ростуть в суспензії, трансфектували відповідними експресійними векторами з використанням поліетилеіміну (PEI). Альтернативно до цього, для одержання білків в безсироватковому середовищі застосовували пули стабільно трансфектованих CHO-клітин або клони CHO-клітин. Потім злиті білки очищали з супернатанту. В цілому, метод полягав в наступному: злиті білки очищали з використанням однієї стадії афінної хроматографії на білку А (HiTrap ProtA, фірма GE Healthcare), урівноважували з використанням 20мМ фосфату натрію, 20мМ цитрату натрію, pH 7,5. Після внесення супернатанту колонку спочатку промивали 20мМ фосфатом натрію,

20мМ цитратом натрію, рН 7,5, а потім промивали 13,3мМ фосфатом натрію, 20мМ цитратом натрію, 500мМ хлоридом натрію, рН 5,45. Злитий білок елюювали за допомогою 20мМ цитрату натрію, 100мМ хлориду натрію, 100мМ гліцину, рН 3 або 10мМ цитрату натрію, рН 3,0. Фракції нейтралізували 0,5М Na_2HPO_4 , рН 8,0 (1:10), поєднували і очищали гель-фільтрацією (HiLoad 16/60 Супердекс 200, фірма GE Healthcare або HiLoad 26/60 Супердекс 200, фірма GE Healthcare) в кінцевому буфері для продукту, що мав наступний склад: 25мМ гістидин, 140мМ NaCl, рН 6,0. Концентрацію білка в очищених зразках білків визначали, вимірюючи оптичну густину (ОГ) при 280 нм, застосовуючи коефіцієнт молярної екстинції, розрахований на основі амінокислотної послідовності. Молекулярну масу визначали також на основі амінокислотної послідовності. Чистоту і молекулярну масу злитих білків аналізували за допомогою ДСН-ПААГ в присутності відновлювача (5мМ 1,4-дитіотреїтол) або без нього і забарвлювали кумасі діамантовим блакитним (SimpleBlue™ SafeStain, фірма Invitrogen). Гелеву систему NuPAGE® Pre-Cast (фірма Invitrogen) застосовували відповідно до інструкцій виробника (4-20 % Тригліцинові гелі або 3-12 % Бис-Трис). Альтернативно до цього, чистоту і молекулярну масу молекул аналізували за допомогою KE-ДСН в присутності відновлювача або без нього, застосовуючи систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) відповідно до інструкцій виробника. Вміст агрегатів в зразках злитих білків аналізували з використанням колонки для аналітичної гель-фільтрації з Супердекс 200 10/300GL (фірма GE Healthcare) в рухомому буфері, що містить 2мМ MOPS, 150мМ NaCl, 0,02 % NaN_3 , рН 7,3, при 25°C. Альтернативно до цього, вміст агрегатів в зразках антитіл аналізували з використанням колонки для аналітичної гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25мМ K_2HPO_4 , 125мМ NaCl, 200мМ моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.) NaN_3 , рН 6,7, при 25°C.

Результати очистки і характеристики конструкцій DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-IL-2 N88D, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ і DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ представлені на фіг. 1, 2, 3, 4 і 5 відповідно.

Афінність до IL-2-рецепторам

Афінність злитих білків визначали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на пристрої Biacore T200 (фірма GE Healthcare) для гетеродимера людського, мишачого і мавпячого (циномолгус) IL-2R $\beta\gamma$, застосовуючи рекомбінантний гетеродимер IL-2R $\beta\gamma$ в наступних умовах: ліганди: гетеродимер, що містить людський, мишачий і мавпячий IL-2R, що містить β -субодиницю, що містить "виступ", γ -субодиницю, що містить "западину", іммобілізований на SA-чипі (з рівнями іммобілізації 194, 114 і 116 RU відповідно), аналіт: DP47GS IgG-IL-2 (див. SEQ ID NO: 13, 15 і 19), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (див. SEQ ID NO: 17 і 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (див. SEQ ID NO: 15, 19 і 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 50) і DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 52), температура: 25°C; буфер: HBS-EP; концентрація аналіту: від 100 до 1,2нМ (розведення 1:3); швидкість потоку 30 мкл/хв; асоціація: 120 з, дисоціація: 600 з для 2 найбільших концентрацій і 120 з для більш низьких концентрацій, регенерація: 60 при застосуванні 3М MgCl_2 ; апроксимація: ленгмюрівська модель зв'язування: 1:1, $R_i \neq 0$, R_{max} = локальне. Афінності визначали на основі кінетичних констант швидкостей k_{on} і k_{off} . Афінність злитих білків визначали також для α -субодиниці людського, мишачого і мавпячого (циномолгус) IL-2R, застосовуючи рекомбінантну мономерну α -субодиницю IL-2R в наступних умовах: ліганди: α -субодиниця людського, мишачого і мавпячого (циномолгус) IL-2R, іммобілізована на CM5-чипі шляхом амінного поєднання (рівні іммобілізації відповідали 240, 245 і 220 RU відповідно), аналіти: DP47GS IgG-IL-2 (див. SEQ ID NO: 13, 15 і 19), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (див. SEQ ID NO: 17 і 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (див. SEQ ID NO: 15, 19 і 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 50) і DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (див. SEQ ID NO: 19 і 52), температура: 25°C; буфер: HBS-EP; концентрація аналіту від 300 до 0,41нМ (розведення 1:3); швидкість потоку 30 мкл/хв; асоціація: 120 з; дисоціація: 180 з; регенерація: 10мМ гліцин, рН 1,5 протягом 60 з. Афінності визначали шляхом аналізу стаціонарного стану.

Результати оцінки афінності на основі кінетичних характеристик для гетеродимера IL-2R $\beta\gamma$ і характеристик в стаціонарному стані для α -субодиниці IL-2R представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Зв'язування злитих білків з IL-2R $\beta\gamma$ і IL-2R α

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

Злиті людський DP47GS IgG – IL-2 і їх мутанти зв'язуються не тільки з 3 різними ланцюгами α , β і γ людського рецептора IL-2, але також і з відповідними ланцюгами рецептора мавпи циномогус і миші, хоча для останніх двох видів в середньому виявлена тенденція до трохи більш низької афінності зв'язування. Афінності зазначених злиття цитокіну з α -ланцюгами людини і мавпи циномогус були порівняними, а афінність до мишачого α -ланцюга відрізнялась ~ у 2 рази від афінності до людського α -ланцюга, виявленої для молекул, несучих тільки один цитокіновий компонент. Для молекул, що несуть два цитокінових компонента, зазначена різниця не мала місце, ймовірно, внаслідок авідності. Афінності DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-IL-2 N88D до α -ланцюгів теоретично повинні бути однаковими, оскільки мутація N88D не повинна впливати на поверхню розділу з α -ланцюгом. N88D локалізований на поверхні розділу з β -ланцюгом рецептора IL-2 і його зміна в результаті мутації на D приводило до зниження афінності, що можна виявити при порівнянні зв'язування DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-IL-2 N88D з IL-2R $\beta\gamma$ всіх трьох видів (0,15нМ, 0,60нМ і 0,85нМ у порівнянні з 0,93нМ, 1,3нМ і 2,4нМ відповідно). У випадку DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂, що несе два мутантних цитокіни IL-2, зазначена різниця, щонайменше відносно людського IL-2R $\beta\gamma$, являлось менше вираженням, найбільш ймовірно внаслідок авідності. DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ характеризувались дуже схожими авідностями зв'язування з IL-2R $\beta\gamma$ всіх трьох видів. Хоча E95 також локалізований на поверхні розділу з β -ланцюгом рецептора IL-2, його зміна в результаті мутації на А, щонайменше в том випадку, коли два зазначених мутанти злиті з IgG, не приводило до значного зниження авідності.

Експресія IL-2-рецепторів на імунних клітинах

Високоафінний тримерний IL-2-рецептор складається з α - (IL-2RA, CD25), β - (IL-2RB, CD122) і γ - (IL-2RG, CD132)-ланцюгів і має величину K_D ~10пМ. CD25 індивідуально має тільки незначну афінність (K_D ~10нМ) відносно IL-2. Димер IL-2RB/IL-2RG, який експресується на деяких типах клітин за відсутності IL-2RA, також зв'язується з IL-2, але з проміжною афінністю (K_D ~1нМ). Передача сигналів через IL-2-рецептор опосередковується IL-2RB- і IL-2RG-ланцюгами. За даними кристалографічного структурного аналізу IL-2RA, ймовірно, не контактує ані з IL-2RB, ані з IL-2RG. Висловлена гіпотеза о том, що основою узгодженої дії в тримерному рецепторі є зниження ентропії, коли CD25 "захоплює" IL-2 на клітинній поверхні для презентації IL-2RB і IL-2RG, або, альтернативно до цього, має місце індукована CD25 зміна конформації IL-2, що стабілізує комплекс. В регуляторних FOXP3⁺-CD4⁺-Т-клітинах має місце значний стехіометричний надлишок IL-2RA у порівнянні з β - і γ -ланцюгами рецептора, що підтверджує гіпотезу про те, що димери або навіть більш великі комплекси, що охоплюють α -ланцюг, сприяють зв'язуванню IL-2. Встановлено також, що CD25 на одній клітині може презентувати IL-2 димерам IL-2RB/IL-2RG на іншій клітині, при цьому має місце високоафінна міжклітинна взаємодія, яка підкреслює унікальний взаємозв'язок між трьома ланцюгами, з яких складається високоафінний IL-2-рецептор.

Експресію CD25 (IL-2RA) і CD122 (IL-2RB) на субпопуляціях CD4⁺-Treg, субпопуляціях NK-клітин і на NKT-клітинах, а також на субпопуляціях канонічних CD4⁺ -і CD8⁺-Т-клітин визначали за допомогою FACS (фіг. 6 і 7). Маркери клітинної поверхні застосовували для визначення субпопуляцій CD4⁺-Treg, NKT-клітин і NK-клітин (фіг. 6). Для оптимізації забарвлювання з метою виявлення CD25 і CD122 не здійснювали внутрішньоклітинне забарвлювання для виявлення FoxP3. В цілому, метод полягав в наступному: застосовуючи 150 мкл крові здорового донора, флуоресцентні антитіла інкубували протягом 45 хв при кімнатній температурі в темноті (здійснюючи струшування на початку і через 20 хв). Еритроцити лізували в BD-буфері для лізису (лізуючий розчин BD FACS, 349202) протягом 9 хв і решту клітини промивали (2 мл 3ФР + 0,1 % БСА) і фіксували (1 % параформальдегіду (ПФА)). Клітини аналізували за допомогою клітинного аналізатора LSRFortessa (фірма Becton Dickinson) і для аналізу даних застосовували

програму FloJo (фірма TreeStar). Субпопуляції Treg ідентифікували за допомогою антитіл, специфічних відносно TCR $\alpha\beta$ -ФІТЦ (IP26, фірма BioLegend), CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4, фірма BioLegend), CD127-PE/CY7 (ebioRDR5, фірма Ebioscience), CD45RA-Pacific Blue (H1100, фірма BioLegend), CD25-APC (2A3, M-A251, фірма BD Biosciences) і CD122-PE (TU27, фірма BioLegend). NK- і NKT-клітини забарвлювали в окремій пробірці за допомогою антитіл, специфічних відносно TCR $\alpha\beta$ -ФІТЦ, CD4-Alexa Fluor 700, CD8-PE/CY7 (HTT8a, фірма BioLegend), CD56-Pacific Blue (HCD56, фірма BioLegend), CD25-APC і CD122-PE. Після установки дискримінаційного вікна на лімфоцити на основі FSC/SSC і виключення дублетів наївні Treg ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁺CD45RA⁺, Treg пам'яті ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁺CD45RA⁻, а активовані Treg ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{high}CD45RA⁻. NK-клітини ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁻CD56^{bright}, а активовані NK-клітини ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁻CD56^{bright}. NKT-клітини ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD56⁺. Контролі ізотипів (IC), кон'юговані з APC (алофікоціанін) і PE (фікоеритрин), застосовували для оцінки фонових рівнів флуоресценції для CD25 і CD122 відповідно.

Аналогічно до вищезазначеного, маркери клітинної поверхні застосовували для виявлення наївних і канонічних CD4⁺-Т-клітин пам'яті (фіг. 4А і 4Б), канонічних CD8⁺-Т-клітин пам'яті і CD45RA⁺-CD8-Т-клітин (комбінація субпопуляцій наївних клітин і TEMRA (TEMRA означає ефекторні клітини пам'яті, переспрямовані на експресію CD45RA) (фіг. 7В і 7Г). Забарвлювання і аналіз здійснювали відповідно до описаному вище методу. Застосовуючи ту ж пробірку, яку застосовували для характеристики CD4⁺-Treg, ідентифікували канонічні наївні CD4⁺-Т-клітини як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{+/+}CD45RA⁺, і ідентифікували канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{+/+}CD45RA⁻. CD8-Т-клітини визначали, застосовуючи TCR $\alpha\beta$ -ФІТЦ, CD8-Alexa Fluor 700 (HTT8a, фірма BioLegend), CD28-PE/CY7 (CD28.2, фірма BioLegend), CD45RA-Pacific Blue, CD25-APC і CD122-PE. CD8⁺-Т-клітини пам'яті ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD45RA⁻. Наївні CD8⁺-Т-клітини і клітини TEMRA ідентифікували як TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD45RA⁺. CD28 не застосовували для того, щоб відрізнати наївні CD8⁺-Т-клітини від CD8⁺-TEMRA-Т-клітин, оскільки маркер CD28 не був включений в описаний нижче аналіз pSTAT5a (див. фіг. 8).

В деяких тестах (фіг. 15) визначали наступні додаткові субпопуляції: центральні CD4⁺-Т-клітини пам'яті (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/+}), ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/+}), центральні CD8⁺-Т-клітини пам'яті (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/+}), ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/+}) і CD8⁺-клітини TEMRA (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁺CD127⁺CD25^{+/+}).

На фіг. 6 і 7 представлені дані про специфічну для клітин експресії IL-2RA і IL-2RB для субпопуляцій Т-клітин, NK-клітин і NKT-клітин в людській периферійній крові (IL-2RG практично повсюдно експресується на гематопоетичних клітинах, так як він взаємодіє з більшою кількістю цитокінових рецепторів). Найбільш високий рівень IL-2RA був присутнім на трьох популяціях регуляторних CD4⁺-Т-клітин (Treg): наївні клітини (CD45RA⁺CD25⁺), клітини пам'яті (CD45RA⁻CD25⁺) і активовані клітини (CD45RA⁻CD25^{hi}) (фіг. 6А). В середньому канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті експресували приблизно в 10-разів менше CD25, ніж Treg (фіг. 7А). Експресія CD25 на наївних CD4⁺-Т-клітинах значно варіювалась у різних донорів, але во всіх випадках виявилась нижче, ніж виявлена на CD4⁺-Т-клітинах пам'яті (фіг. 7А). Експресія CD25 на NK, NKT і CD8-Т-клітинах виявилась дуже низькою і не піддавалась виявленню за виключенням CD56^{bright}-NK-клітин (фіг. 6В і 7В). CD56^{bright}-NK- і CD56⁺-NK-клітини експресували найбільш високий рівень IL-2RB (фіг. 6Г), приблизно в 10 разів більш високий у порівнянні з любими іншими субпопуляціями Т-клітин, включаючи NKT-клітини (фіг. 6Б, 6Г, 7Б, 7Г).

Індукція pSTAT5a в субпопуляціях клітин людської периферійної крові

Після індукованої IL-2 олігомеризації тримерного IL-2R цитоплазматичні протеїнтирозинкінази JAK1 і JAK3, які асоційовані з внутрішньоклітинними доменами IL-2RB і IL-2RG відповідно, становились активованими. Ці кінази фосфорилують визначені залишки тирозину в IL-2RB, які діють як сайти "причалування" для STAT5a і STAT5b, які в свою чергу фосфорилуються. Індукована IL-2 активація декількох шляхів передачі сигналів, насамкінець, приводить до транскрипції генів-мішеней, які беруть участь в різних функціях, асоційованих з IL-2/IL-2R-шляхом. Оскільки різні типи клітин експресують різні рівні молекул IL-2RA і IL-2RB рецептора IL-2 (фіг. 6 і 7), то для розуміння інтегрованої сигнальної відповіді на IL-2, опосередкованої різними комбінаціями рецепторів з високою і проміжною афінністю, при створенні винаходу вимірювали рівні pSTAT5a в індивідуальних клітинах за допомогою поліхроматичної проточної цитометрії.

Вплив різних доз DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS

IgG-IL-2N88D і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ на індукцію фосфорилування STAT5a оцінювали з використанням субпопуляцій людських CD4⁺-Treg, наївних і канонічних CD4⁺-Т-клітин пам'яті, канонічних CD8⁺-Т-клітин пам'яті, CD45RA⁺CD8⁺-Т-клітин, NKT-клітин і NK-клітин (фіг. 8 і 14 і таблиці 2 і 3). Всі субпопуляції характеризували в одній пробірці для кожної дози. В цілому, метод полягав в наступному: збирали зразки крові дорослих здорових добровольців в гепаринізовані пробірки. Додавали в різних концентраціях злиті білки DP47GS IgG-IL-2 до 500 мкл крові і інкубували при 37°C. Через 30 хв кров лізували і фіксували, застосовуючи попередньо нагрітий буфер для лізису/фіксації (фірма Becton Dickinson, № 558049), протягом 10 хв 37°C, промивали двічі 3ФР, що містять 0,2 % БСА, і потім підвищували проникність клітин за допомогою попередньо охолодженого до -20°C метанолу (фірма Sigma, чистота, придатна для застосування для біотехнології (Biotech grade), № 494437) протягом 20 хв на льоді. Потім клітини інтенсивно промивали чотири рази 3ФР, що містять 0,2 % БСА, після чого здійснювали FACS-забарвлювання, застосовуючи панель флуоресцентних антитіл, дозволяючих відрізняти один від іншого різні субпопуляції лімфоцитів і NK-клітин і статус pSTAT5a. Застосовні антитіла представляли собою анти-CD4-Alexa Fluor 700 (клон RPA-T4), CD3-PerCP/Cy5.5 (UCHT1), CD45RA-PE/Cy7 (HI100), CD8-Brilliant Violet 605 (RPA-T8), CD56-Brilliant Violet 421 (HCD56), FOXP3-PE (259D) (все від фірми BioLegend), CD25-APC (клони M-A251 і 2A3) і pSTAT5a-Alexa Fluor 488 (pY694) (фірма Becton Dickinson). Зразки досліджували за допомогою аналізатора клітин LSRFortessa (фірма Becton Dickinson) і дані аналізували за допомогою програми FloJo (фірма TreeStar). Після установки дискримінаційного вікна на лімфоцити і виключення дублетів Treg визначали як CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ і підрозділяли на CD45⁺FOXP3^{hi} (активовані Treg), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺FOXP3⁺ (Treg пам'яті) і CD3⁺CD4⁺CD45⁺FOXP3⁺ (наївні Treg). канонічні CD4⁺-Т-клітини ідентифікували як CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (наївні) і CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻ (клітини пам'яті). CD8-Т-клітини визначали як CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻ (клітини пам'яті) і CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺. NKT-клітини ідентифікували як CD3⁺CD56⁺ а NK-клітини визначали як CD3⁺CD56^{bright} (активовані NK-клітини) або CD3⁺CD56⁺ (NK-клітини). Внутрішньоклітинні рівні pSTAT5a кількісно оцінювали у всіх субпопуляціях клітин при всіх дозах.

На фіг. 8 представлені відповіді Т-клітин, NK-клітин і NK Т-клітин в людської периферійної крові трьох донорів в залежності від дози імунокон'югату DP47GS IgG-IL-2, кожні з яких тестували в різні дні. Ієрархія відповіді на DP47GS IgG-IL-2 виявилась однаковою в крові трьох донорів і такою самою, яка була виявлена при застосуванні рекомбінантного людського IL-2 (Proleukin®) (дані не представлені). У всіх трьох популяціях Treg, тобто в активованих клітинах (CD45RA⁺, CD25^{hi}), клітинах пам'яті (CD45RA⁻, CD25⁺) і наївних клітинах (CD45RA⁺, CD25⁺), рівні pSTAT5a зростали при застосуванні DP47GS IgG-IL-2 в концентрації 0,1 нг/мл, у той час як для інших клітинних популяцій була необхідною концентрація DP47 IgG-IL-2, або яка перевищувала 1 нг/мл (CD56^{bright} NK і CD4⁺-Т-клітин пам'яті), або яка складала 10-100 нг/мл (CD8⁺-Т-клітини пам'яті, CD56⁺-NK-клітини, наївні CD4⁺-Т-клітини, NKT-клітини і CD45RA⁺CD8⁺-Т-клітини), для того, щоб викликати підвищення рівнів pSTAT5a, які піддаються виявленню. На фіг. 11 представлені більш докладно відповіді популяцій Treg в залежності від дози, які демонструють їх високу чутливість до DP47GS IgG-IL-2. Слід зауважити, що високий рівень експресії IL-2RB на NK-клітинах в поєднанні з помірними рівнями експресії CD56 (фіг. 6Г) у порівнянні з рівнем експресії IL-2RB на субпопуляціях Т-клітин є недостатнім для того, щоб проявляти аналогічну Treg-клітинам чутливість до IL-2. В цілому, встановлено, що субпопуляції активованих, клітин пам'яті і наївних Treg мали саму високу чутливість до DP47GS IgG-IL-2, при цьому CD56^{bright} NK-клітини і канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті виявились в 20-50 разів менше чутливими. З інших проаналізованих відносно збільшення рівня pSTAT5a субпопуляцій клітин ефекторні CD8⁺-Т-клітини пам'яті, ефекторні наївні CD4⁺-Т-клітини, NKT-клітини, "спокійні" NK-клітини (позитивні, що не дають яскраве забарвлювання відносно CD56) і наївні ефекторні CD8⁺-Т-клітини + CD45RA⁺-клітини пам'яті виявились відносно нечутливими до імунокон'югату IgG-IL-2.

На фіг. 9 представлені відповіді Т-клітин, NK-клітин і NK Т-клітин в людської периферійної крові п'яти донорів залежно від дози імунокон'югату DP47GS IgG-(IL-2)₂, кожні з яких тестували в різні дні. Аналогічно тому, що було встановлено для DP47GS IgG-IL-2 (фіг. 8), три субпопуляції Treg представляли собою клітини, найбільш чутливі до індукції pSTAT5a під дією DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фіг. 9 і 11), і схожі ієрархічні відповіді в залежності від дози виявлені для інших клітинних субпопуляцій у всіх п'яти донорів.

Для більш простого порівняння DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂ рівні pSTAT5a стандартизували (фіг. 10). Для стандартизації величин MFI величини MFI для pSTAT5a нестимульованих клітин, специфічні для кожної наявної в дискримінаційному вікні субпопуляції, вичитали з величин MFI для всіх стимульованих варіантів в зазначеній клітинній субпопуляції. Одержані величини ділили на найбільш високу величину MFI pSTAT5a, одержану для

зазначеної субпопуляції у відповідь на дозу. Визначали величини EC_{50} на основі кількості який містить IL-2 злитого білка, потрібного для досягнення величини MFI pSTAT5a, що складає 50 % від максимальної, виявленої для даної субпопуляції. Як продемонстровано на фіг. 10, імунокон'югат DP47GS IgG-(IL2)₂ викликав більш сильну індукцію pSTAT5a в клітинах, які конститутивно експресують CD25, можливо, в результаті підвищеної авідності імунокон'югату до високоафінного IL-2-рецептору. Встановлено, що величина EC_{50} , яка характеризує активацію pSTAT5a, в Treg виявилась в 5-9 разів нижче для DP47GS IgG-(IL-2)₂ у порівнянні з DP47GS IgG-IL-2 при безпосередньому порівнянні. В таблиці 2 узагальнені репрезентативні величини EC_{50} і кратність відмінностей активації pSTAT5a при застосуванні DP47GS IgG-IL-2 у порівнянні з DP47GS IgG-(IL-2)₂ в різних субпопуляціях клітин.

Таблиця 2

Величини EC_{50} і кратність відмінностей в активації pSTAT5a при застосуванні DP47GS IgG-IL-2 в порівнянні з DP47GS IgG-(IL-2)₂ в різних клітинних субпопуляціях

Т-клітина	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Кратність вимірювання
активована Treg-клітина	0,10 нг/мл	0,020 нг/мл	5
Treg-клітина пам'яті	0,22 нг/мл	0,033 нг/мл	7
Наївна Treg-клітина	0,20 нг/мл	0,023 нг/мл	9
CD56 ^{bright} NK	2,0 нг/мл	0,63 нг/мл	3
Канонічна CD4-Т-клітина пам'яті	5 нг/мл	0,7 нг/мл	7
NK-клітини	35 нг/мл	10 нг/мл	4

Навіть при дуже незначних концентраціях DP47GS IgG-(IL-2)₂ індукував більш високі рівні pSTAT5a у порівнянні з DP47GS IgG-IL-2 (фіг. 11). В цьому експерименті кров трьох здорових донорів тестували індивідуально в один і той самий день відносно відповідей на титрування з використанням 2-кратних розведень DP47 IgG-IL-2 і DP47 IgG-(IL-2)₂, що приводило до одержання обмежувальних концентрацій IL-2. На графіках на фіг. 11 представлені середні значення \pm СКО величин MFI pSTAT5a для трьох донорів. Окрім трьох вивчених індивідуально субпопуляцій Treg (фіг. 11Б-Г), застосовували дискримінаційний аналіз для оцінки pSTAT5a во всіх CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺-Treg-клітинах (фіг. 11А). Результати чітко продемонстрували в 5-10 разів більш високу ефективність DP47GS IgG-(IL-2)₂ відносно активації Treg-клітин, не зважаючи на підвищення тільки в 2 рази кількості IL-2 на молекулу IgG. Поліхроматичну проточну цитометрію здійснювали відповідно до описаного вище метода (див. фіг. 8).

Канонічні CD4⁺-Т-клітини пам'яті реагували також на більш низькі (в 7-разів) концентрації DP47GS IgG-(IL-2)₂ у порівнянні з DP47GS IgG-IL-2. Хоча величини EC_{50} виявились більш низькими для CD56^{bright}-NK-клітин і CD56⁺-NK-клітин при порівнянні DP47GS IgG-(IL-2)₂ з DP47 IgG-IL-2, мало місце зниження тільки в 3- і 4 рази відповідно. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що дія цих клітин відносно опосередкованої IL-2 передачі сигналів зв'язано з IL-2-рецептором, що має проміжну афінність. Цей диференціальний зсув величин ED_{50} для Treg-клітин відносно NK-клітин в декілька разів перевищує перевагу відносно активації Treg-клітин.

На фіг. 12 представлена відповідь Т-клітин, NK-клітин і NK-Т-клітин в людської периферійної крові кожного з трьох донорів в залежності від дози DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, кожні з яких тестували в різні дні. Молекулу IL-2E95A створювали так, щоб вона повинна була знижувати активність зв'язування з IL-2R $\beta\gamma$, однак було встановлено, що вона в дійсності мала властивості зв'язування з рецептором IL-2R $\beta\gamma$, схожими з властивостями IL-2 дикого типу. Ієрархія відповіді на DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ виявилась однаковою в крові трьох донорів і такою самою, яка була виявлена при застосуванні який містить IL-2 дикого типу імунокон'югату DP47GS IgG-(IL-2) в крові цих же донорів. У всіх трьох популяціях Treg-клітин, тобто активованих клітин (CD45RA⁺CD25^{hi}), клітин пам'яті (CD45RA⁺CD25⁺) і наївних клітин (CD45RA⁺CD25⁺), рівні pSTAT5a зростали при застосуванні DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ в концентрації 0,1 нг/мл, у той час як для інших клітинних популяцій була необхідною концентрація DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, або 1 нг/мл (CD56^{bright} NK і CD4⁺-Т-клітин пам'яті), або яка складає 10-100 нг/мл (CD8⁺-Т-клітини пам'яті, CD56⁺-NK-клітини, наївні CD4⁺-Т-клітини, NKT-клітини і CD45RA⁺CD8⁺-Т-клітини), для того, щоб викликати підвищення рівнів pSTAT5a, які піддаються виявленню. Важно зауважити, що високий рівень експресії IL-2RB на NK-клітинах з проміжними рівнями CD56 (фіг. 6Г) у порівнянні з експресією IL-2RB на субпопуляції Т-клітин був недостатнім для забезпечення схожої з Treg чутливості до IL-2. В цілому було встановлено, що субпопуляції активованих, клітин пам'яті і

наївних Treg характеризувались найбільшою чутливістю до DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, у той час як CD56^{bright}-NK-клітини і канонічні ефektorні CD4⁺-T-клітини пам'яті були в 20-50 разів менше чутливими. Серед інших субпопуляцій клітин, які аналізували відносно підвищення pSTAT5a, ефektorні CD8⁺-T-клітини пам'яті, наївні ефektorні CD4⁺-T-клітини, NKT-клітини, "спокійні" NK-клітини (CD56-позитивні не яскраво забарвлені) і наївні ефektorні CD8⁺-CD45RA⁺-T-клітини виявились відносно нечутливими до імунокон'югату IgG-(IL-2E95A)₂.

На фіг. 13 представлена відповідь T-клітин, NK-клітин і NK-T-клітин в людської периферійної крові кожного з п'яти донорів в залежності від дози DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂, кожні з яких тестували в різні дні. Молекулу IL-2N88D створювали для зниження афінності зв'язування з IL2Rβγ і, на відміну від молекули, що має точкову мутацію E95A, вона мала в 6,2 рази меншу афінність зв'язування з IL2Rβγ за даними Віасоге-аналізу (таблиця 1, K_D=0,15нМ у порівнянні з 0,93нМ). Як встановлено при створенні даного винаходу, для всіх трьох імунокон'югатів, три субпопуляції Treg представляли собою клітини, найбільш чутливі до активації pSTAT5a з використанням DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, і схожі за ієрархією залежності відповіді від дози були виявлені для інших субпопуляцій клітин всіх п'яти донорів. Важно зауважити на відсутності чутливості у ефektorних CD4⁺-T-клітин пам'яті при стимуляції за допомогою DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂; навіть при дозах 1000 нг/мл кон'югат мав слабкий стимулювальний вплив на цю важливу з точки зору аутоімунітету популяцію клітин.

Як продемонстровано в даному прикладі, унікальна створена точкова мутація IL-2, N88D, різко знижувала стимулювальну активність потрібної популяції клітин, а саме, всіх ефektorних CD4⁺-T-клітин пам'яті, зберігаючи при цьому стимулювальний вплив відносно Treg-клітин, які потрібні для нового і покращеного терапевтичного засобу.

Для порівняння який містить IL-2 дикого типу DP47GS IgG-(IL-2)₂ з імунокон'югатами, що містять IL-2 з точковими мутаціями E95A і N88D, накладали один на іншого графіки величин pSTAT5a для кожного з протестованих типів клітин (фіг. 14). Встановлено, що DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ мав такою самою активністю, що і його аналог дикого типу, DP47GS IgG-(IL-2)₂, відносно стимуляції кожної з популяцій людських клітин, це характеризувалось тим, що криві залежності відповіді від дози можна було поєднати. На відміну від цього, молекули зі зниженою здатністю до зв'язування з IL2Rβγ, а саме, DP47GS IgG-IL-2N88D і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, мали слабкий вплив на ефektorні CD4⁺-T-клітини пам'яті й тільки двовалентний кон'югат DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ зберігав значну стимулювальну активність відносно різних популяцій Treg-клітин.

На фіг. 15 представлені результати аналізу відповідей у вигляді рівнів pSTAT5a в зразках цільної крові, взятих у додаткових десяти донорів крові. Для кожного донора проводили тестування в різні дні шляхом порівняння впливів DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, для чого здійснювали титрування в широкому діапазоні (≥6 log). Як було продемонстровано раніше для DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фіг. 9), Treg-клітини пам'яті та наївні Treg-клітини представляли собою клітини, найбільш чутливі до індукованого DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ pSTAT5a (фіг. 15A, Б); при цьому, хоча кожний злитий білок дозволяв стимулювати максимальні pSTAT5a-відповіді, вони розрізнялись концентраціями, необхідними для досягнення точки зламу на кривій активації, а також максимальною дозою, необхідною для активації. CD56^{bright}-NK-клітини представляли собою субпопуляцію клітин, менше чутливу до DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, у порівнянні з Treg-клітинами, ніж до злитих білків, що містять IL-2 дикого типу (фіг. 15B); точка зламу на кривій активації була вище і в цьому випадку ніколи не досягався максимальний ефект, навіть при застосуванні найбільшої протестованої дози (5000 нг/мл). NK-клітини, на відміну від DP47GS IgG-(IL-2)₂, були нечутливими до DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (фіг. 15Г). Як центральні CD4⁺-T-клітини пам'яті (фіг. 15Д), так і ефektorні CD4⁺-T-клітини пам'яті (фіг. 15Е), були відносно нечутливими до DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, для них точка зламу на кривій активації була в 1000 разів більш високою, ніж для DP47GS IgG-(IL-2)₂, й індукувались тільки часткові відповіді при застосуванні найбільшої протестованої дози (5000 нг/мл). У той час як DP47GS IgG-(IL-2)₂ індукував активацію в різного ступеню, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не мав впливу на наступні субпопуляції клітин: наївні CD4⁺-T-клітини (фіг. 15Ж), CD8⁺-T-клітини центральної пам'яті (фіг. 15З), ефektorні CD8⁺-T-клітини пам'яті (фіг. 15И), наївні CD8⁺-T-клітини (фіг. 15К), ефektorні CD45RA⁺CD8⁺-T-клітини пам'яті (фіг. 15Л), NKT-клітини (фіг. 15М) і CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD56⁻-T-клітини (фіг. 15Н).

В таблиці 3 представлені величини EC₅₀, одержані на основі кількості злитих білків, що містять IL-2, необхідної для досягнення 50 % від максимальної pSTAT5a-відповіді, виявленої для субпопуляції клітин, яка розглядається. DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, подібно до його аналога, DP47GS IgG-(IL-2)₂, що містить IL-2 дикого типу, викликав найбільш сильну індукцію pSTAT5a в Treg, тобто клітинах, які конститутивно експресують високоафінний рецептор CD25 (IL2Rα),

ймовірно, внаслідок його більш високої авідності до високоафінного рецептору IL-2. Залежності відповіді від дози для DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ виявились конгруентними. Величина EC₅₀, яка характеризує активацію pSTAT5a в Treg-клітинах, була в 6-7 разів менше при застосуванні DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ і DP47GS IgG-(IL-2)₂ у порівнянні з одновалентним DP47GS IgG-IL-2. Аналогічно до цього, величина EC₅₀, яка характеризує активацію Treg-клітин, була в 7-10 разів менше при застосуванні одновалентного DP47GS IgG-IL-2 у порівнянні з двовалентним DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. І, насамкінець, величина EC₅₀, яка характеризує активацію Treg-клітин, була в 36-61 разів менше при застосуванні двовалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ у порівнянні з двовалентним DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Найбільш важливу з імунологічної точки зору перевагу DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ при лікуванні аутоімунних порушень краще за все проілюстровано в таблиці 3, з якої видно дуже велику різницю в специфічності, яку мав DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ відносно активації Treg-клітин у порівнянні з активацією ефекторних CD4⁺-клітин (вона складає від >320 разів до >500 разів). Для порівняння, різниця в специфічності відносно Treg-клітин у порівнянні з ефекторними CD4⁺-Т-клітинами пам'яті суттєво менше для DP47GS IgG-(IL-2)₂ (вона складає від 13 до 14 разів) і DP47GS IgG-IL-2 (вона складає від 10 до 16 разів).

Таблиця 3

Величини EC₅₀ і кратність відмінностей в специфічності відносно активації pSTAT5a при застосуванні DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в різних субпопуляціях клітин

Субпопуляції людських клітин	IgG-IL-2 ED ₅₀ (нМ)	IgG-(IL-2) ₂ ED ₅₀ (нМ)	IgG-(IL-2N88D) ₂ ED ₅₀ (нМ)
Treg-клітини пам'яті	2,2	0,31	11,4
Наївні Treg	1,8	0,29	17,7
Ефекторні CD4 ⁺ -Т-клітини пам'яті	29	4	>5700
Кратність розрізнення в специфічності: Treg-клітини пам'яті у порівнянні з CD4 ⁺ -Teff-клітинами пам'яті	10	13	>500
наївні Treg-клітини у порівнянні з CD4 ⁺ -Teff-клітинами пам'яті	16	14	>320

Різні впливи злитих білків, які містять IL-2, на людські NK-клітини і CD8⁺-Т-клітини in vitro

Свіжовиділені людські мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) культивували in vitro без будь-якої додаткової стимуляції, яка відрізняється від IL-2, тобто в умовах, які, як відомо, є сприятливими для виживання й росту NK-клітин і CD8⁺-Т-клітин. Людські NK-клітини можна підрозділяти на клітини, які експресують в малих або кількостях, які не піддаються виявленню CD56 (позначені як CD56^{-dim}), і "активовану" субпопуляцію клітин, які характеризуються високими рівнями експресії CD56 (позначені як CD56^{bright}); більшість NK-клітин в крові представляють собою CD56^{-dim}-клітини, меншість класифікують як CD56^{bright}-клітини. Вважають, що "активовані" NK-клітини, які представляють собою CD56^{bright}, є попередниками NK-клітин, які не експресують CD56 (тобто CD56^{-dim}). Після культивування протягом шести днів in vitro в присутності DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (кожний в концентрації 0, 5, 50 і 500 нг/мл) були виявлені відмінності в рості й здатності до виживання між CD56^{-dim}-клітинами, NK CD56^{bright}-Т-клітинами і CD8⁺-Т-клітинами. Значні розрізнення в кількості клітин були виявлені при обробці зазначеними стимулами, при цьому DP47GS IgG-(IL-2)₂ стимулював найбільше збільшення кількості CD56^{bright}-Т-клітин (медіана складала 101×10³ у порівнянні з 38×10³, p<0,005) (фіг. 16A) і також CD8⁺-Т-клітин (медіана складала 13,6×10³ клітин у порівнянні з 2,5×10³ клітин, p<0,0001) (фіг. 16B).

Впливу що містять IL-2 злитих білків на гуманізованих мишей

Гуманізованих мишей створювали, застосовуючи опромінених невеликою дозою випромінювання новонароджених NOD.Prkdc^{scid} IL2rg^{null} (NSG)-мишей як хазяїна з порушенням імунітетом, яким трансплантували стовбурові CD34⁺-клітини печінки людського ембріону шляхом IP-ін'єкції. Зразки крові, взяті з організму кожної миші у віці 8-10 тижнів, тестували для підтвердження того, що відбулось приживлення людського трансплантату. В результаті порівняння впливів пролейкіну і DP47GS IgG-(IL-2)₂ при створенні винаходу було встановлено, що основними клітинами, на які вони впливали in vivo, були NK-клітини і Treg-клітини; після обробки DP47GS IgG-(IL-2)₂ мало місце суттєве збільшення як NK-клітин, так і Treg-клітин, при

цьому пропорціональна відповідь NK-клітин була вище. Впливи пролейкіну були схожими, але впливи на NK-клітини і Treg-клітини в межах групи були менше збіжними і ступінь збільшення був менше, ніж у випадку обробки DP47GS IgG-(IL-2)₂. Злиті білки, які містять IL-2 мали різні впливу in vivo в організмі гуманізованих мишей. DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типу приводив до збільшення кількості як Treg- (фіг. 17А), так і NK-клітин (фіг. 17Б), у той час як DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не мав впливу на NK-клітини (фіг. 17Б), але збільшував кількість Treg-клітин в значно більшому ступені (фіг. 17А), ніж IgG-(IL-2)₂ дикого типу.

Наслідком гуманізації NSG-мишей з точки зору довгострокової перспективи є їх більш короткий час виживання, зумовлений тем, що реакція "людський ксенотрансплантат проти хазяїна" приводить до втрати ваги і мультисистемної поліорганної недостатності. Введення наповнювача двічі на тиждень не мало впливу і в цьому випадку медіанна здатність до виживання складала 36 днів після початку обробки (фіг. 18). Обробка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ приводила до медіанної здатності до виживання, схожій зв здатністю до виживання при обробці наповнювачем, і складала 37 днів. На відміну від цього, обробка DP47GS IgG-(IL-2)₂ двічі на тиждень скорочувала медіанну здатність до виживання в цій групі до 21 дні (фіг. 18, $p < 0,0037$ у порівнянні з DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂).

Коли реакція "трансплантат проти хазяїна" досягала заздалегідь визначеного ступеню серйозності, яка потребує припинення прижиттєвого випробування для кожної миші (втрата ваги $\geq 15\%$), проводили оцінку состава людських клітин в крові. В момент часу, коли наступав загрозливий життю рівень реакції "трансплантат проти хазяїна", були виявлені дуже сильні розрізнення між групами обробки в кінцевому складі Treg, NK-клітин і CD8⁺-Т-клітин в крові (фіг. 19). У мишей, оброблених наповнювачем, кількість людських Treg складала менше 1 % від загальної кількості людських CD45⁺-клітин, а кількість NK- і CD8⁺-Т-клітин складала ~ 3 % від кількості людських CD45⁺-клітин в крові. Обробка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ збільшувала кількість NK- і CD8⁺-Т-клітин до 2 % і 5 % відповідно, у той час як кількість Treg зростала до 6 %. На відміну від цього, обробка DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типу збільшувала пропорцію NK-клітин і CD8⁺-Т-клітин до 30 % від загальної кількості людських CD45⁺-клітин і Treg до 3,5 %, що, ймовірно, пояснює значне зниження часу виживання в цій групі у порівнянні з мишами, обробленими DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Індукція pSTAT5a в субпопуляціях клітин периферійної крові мавп циномолгус

Так само, як і в людській периферійній крові, має місце переважна і яка характеризується схожою залежністю від дози індукція pSTAT5a в субпопуляціях Treg в периферійній крові мавп циномолгус, стимульованої IL-2 (пролейкін) (дані не представлені). При безпосередньому порівнянні здатності DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-IL-2 індукувати pSTAT5a в трьох субпопуляціях Treg була потрібна в 2-8 разів більш низька концентрація DP47GS IgG-(IL-2)₂ для досягнення рівня pSTAT5a, що складає 50 % від максимального, ніж концентрація DP47GS IgG-IL-2. В таблиці 4 узагальнені величини EC₅₀, що характеризують активацію pSTAT5a за допомогою DP47GS IgG-IL-2 в порівнянні з DP47GS IgG-(IL-2)₂ в різних субпопуляціях Treg мавп циномолгус, одержані результати виявились в дуже більшому ступені схожими з результатами, одержаними при дослідженні людської периферійної крові (таблиця 3).

Так же, як і у випадку цільної крові людини, застосовували маркери клітинної поверхні і внутрішньоклітинні маркери для ідентифікації субпопуляцій регуляторних Т-клітин і канонічних Т-клітин в цільній крові здорових мавп циномолгус. Зразки крові збирали в один і той самий день у трьох здорових мавп циномолгус в які містять гепарин натрію пробірки і додавали в різних концентраціях DP47GS IgG-IL-2 або DP47GS IgG-(IL-2)₂ до 500 мкл крові і інкубували при 37°C. Після витримання протягом 10 хв при 37°C зразки лізували і фіксували за допомогою попередньо нагрітого BD-буфера для лізису/фіксації (фірма BD Biosciences). Після промивки підвищували проникність клітин за допомогою 1 мл метанолу протягом 30 хв на льоді. Зразки промивали тричі і забарвлювали, застосовуючи панель FOXP3-Alexa Fluor[®] 647 (клон: 259D, фірма BioLegend), CD4-V500 (клон: L200, фірма BD Biosciences), CD45RA-V450 (клон: 5H9, фірма BD Biosciences), CD25-PE (клон: 4E3, фірма eBioscience), pSTAT5a-Alexa Fluor[®] 488 (клон: 47, фірма BD Biosciences) і Ki-67-PerCP-Cy5.5 (клон: B56, фірма BD Biosciences), протягом 1 год. при 4°C. Все зразки досліджували за допомогою аналізатора клітин LSRFortessa (фірма Becton Dickinson) і дані аналізували за допомогою програми FlowJo (FlowJo, LLC).

Таблиця 4

Індукція pSTAT5a в субпопуляціях Treg в периферійній крові мавп циномолгус в відповідь на обробку DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂

Т-клітина	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Кратність вимірювання
активована Treg-клітина	0,07 нг/мл	0,02 нг/мл	4
Treg-клітина пам'яті	0,21 нг/мл	0,025 нг/мл	8
наївна Treg-клітина	0,040 нг/мл	0,02 нг/мл	2

В іншому експерименті аналогічно аналізам pSTAT5a, проведеним з використанням людської крові, здійснювали стимуляцію *in vitro* свіжо гепаринізованої крові нормальних здорових мавп циномолгус за допомогою наповнювача, а саме ЗФР, як контролю, DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, і вивчали впливи на фосфорилування STAT5a в субпопуляціях Treg і канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті. Для стимуляції була вибрана доза 20 нг/мл на основі того, що максимальні відповіді людських Treg мали місце при ≤ 1 нг/мл, і того, що в цьому діапазоні доз мали місце близькі до максимальних відповіді канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітин (результати представлені на фіг. 9).

Умови експерименту були тими самими, що й описані вище. Зразки крові збирали того ж самого дня у трьох здорових мавп циномолгус (донори C1, C2, C3) в пробірці з гепарином натрію, додавали по 20 нг/мл DP47GS IgG-(IL-2)₂ або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ до 500 мкл крові і інкубували при 37°C протягом 20 хв перед здійсненням лізису і проведенням аналізу.

Стратегія установки дискримінаційних вікон для розділення CD4⁺CD25⁺-Treg мавп циномолгус на субпопуляції наївних (FOXP3⁺CD45RA⁺) клітин, клітин пам'яті (FOXP3⁺CD45RA⁺) і активованих (FOXP3^{hi}CD45RA⁺) клітин проілюстрована на фіг. 20A. Як і у випадку людських клітин, три субпопуляції CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Treg кожного донора експресували високі рівні високоафінного рецептора IL-2 CD25 (фіг. 20B). Після стимуляції *in vitro* за допомогою як DP47GS IgG-(IL-2)₂, так і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, в концентрації 20 нг/мл в Treg всіх трьох донорів відбувалось значне фосфорилування STAT5a (фіг. 20B). Так само, як і людські клітини, активовані Treg-клітини і Treg-клітини пам'яті мавп циномолгус мали більш високий потенціал відносно індукції pSTAT5a у порівнянні з наївними Treg-клітинами.

Людські канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини, хоча вони і не мали такої самої чутливості, що і Treg-клітини, могли стимулюватися IL-2, при застосуванні pSTAT5a як біомаркера активації оцінки показали, що для DP47GS IgG-(IL-2)₂ величина ED₉₀ складала 20 нг/мл (фіг. 14). Канонічні ефекторні CD4⁺-Т-клітини пам'яті мавп циномолгус в крові також можна ідентифікувати як CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁺-клітини, при цьому більша частина клітин представляла собою CD25⁺-клітини, а менша субпопуляція представляла собою CD25⁺-клітини (фіг. 21A). Якщо розглядати всю популяцію, то Teff-клітини пам'яті мавп циномолгус всіх трьох донорів давали відповідь на DP47GS IgG-(IL-2)₂ в концентрації 20 нг/мл, викликаючи підвищення pSTAT5a, у той час як обробка DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в концентрації 20 нг/мл визивала слабкий відповідь (супо 2) або не визивала відповіді (супо 1 і 3) у вигляді pSTAT5a (фіг. 21B). Коли Teff-клітини пам'яті додатково підрозділяли на CD25⁺- і CD25⁺-субпопуляції, то було встановлено, що відповідь на DP47GS IgG-(IL-2)₂ в основному був зумовлений CD25⁺-субпопуляцією (фіг. 21Г), тоді як CD25⁺-субпопуляція давала слабку відповідь (фіг. 21В). На відміну від цього, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ не мав впливу на CD25⁺-Teff-клітини пам'яті (фіг. 21В) і мав на 70-80 % меншу стимулювальну активність відносно CD25⁺-субпопуляції (фіг. 21Г).

Були проведені додаткові дослідження на свіжозібраній крові нормальних мавп циномолгус, в яких безпосередньо порівнювали взяті в різних концентраціях DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ для оцінки їх здатності стимулювати в залежності від дози pSTAT5a в різних субпопуляціях Т-клітин, а саме, в активованих, наївних і Treg-клітин пам'яті і ефекторних CD4⁺-Т-клітинах пам'яті. Як DP47GS IgG-(IL-2)₂, так і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, стимулювати Treg-клітини в залежності від дози, при цьому двовалентний що містить IL-2 дикого типу злитий білок виявився ~ в 10 разів більш ефективним, ніж двовалентний що містить IL-2N88D злитий білок, для кожної з субпопуляцій Treg (фіг. 22A-В). На відміну від цього, було виявлено дуже сильне розрізнення між двома молекулами при оцінці ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті відносно індукції pSTAT5a (фіг. 22Г). DP47GS IgG-(IL-2)₂ характеризувався величиною EC₉₀ ~ 300 нг/мл, у той час як DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ фактично не мав впливу при зазначеній високій дозі. Величини EC₅₀, які характеризують стимуляцію pSTAT5a у мавп циномолгус, представлені в

таблиці 5, в якій представлені також кратності відносних специфічностей стосовно стимуляції Трег-клітин у порівнянні з ефекторними CD4⁺-Т-клітинами пам'яті. Ці результати, одержані для цільної крові мавп циномогус, дуже схожі з результатами, одержаними з використанням цільної крові людини (фіг. 14 і таблиця 3), і свідчать про те, що результати досліджень на мавпах циномогус можуть мати більшу прогностичну цінність для клінічних випробувань на людях.

Таблиця 5

Величини EC₅₀ і кратність відмінностей в специфічності відносно активації pSTAT5a за допомогою DP47GS IgG-(IL-2)₂ і DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в субпопуляціях Т-клітин мавп циномогус

Трег-клітини мавп циномогус	IgG-(IL-2) ₂ (нг/мл)	IgG-(IL-2 N88D) ₂ (нг/мл)
активовані Трег-клітини	0,1	0,7
Трег-клітини пам'яті	0,1	1,1
наївні Трег-клітини	0,06	0,8
ефекторні CD4 ⁺ -Т-клітини пам'яті	1,2	>1,000
Кратність розрізнення в специфічності: активовані Tregs у порівнянні з CD4 ⁺ -Teff- клітинами пам'яті	12	>1,400
Трег-клітини пам'яті у порівнянні з CD4 ⁺ -Teff- клітинами пам'яті	12	>900
наївні Трег-клітини у порівнянні з CD4 ⁺ -Teff- клітинами пам'яті	20	>1,200

Оцінка фармакокінетичних властивостей на мишах

10 Перед початком функціональних досліджень на мишах проводили оцінку фармакокінетичних (ФК) властивостей одновалентних і двовалентних імункон'югатів, що містять IL-2 дикого типу і IL-2 з мутацією N88D, на NOD-, NOD.scid- і NOD.scid.II2rα^{-/-}-мишах (фіг. 23).

15 NOD- і NOD.scid-мишам (n=3) вводили шляхом внутрішньовенної (i.v.) ін'єкції по 0,3 мг/кг ваги тіла/мишу DP47GS IgG-IL-2 або DP47GS IgG-(IL-2)₂ в 3ФР, що містить 0,5 % мишачої сироватки і брали зразки крові в різні моменти часу протягом періоду від 2 хв до 168 год. після ін'єкції (фіг. 23А). Людський IL-2 оцінювали в мишачій сироватці з використанням мишачого МАТ до людського IL-2 (фірма BD Pharmingen, № 555051, клон 5344.111), яким сенсibiliзували 96-лункові планшети для захоплення IL-2. Потім проводили виявлення людського IL-2 з використанням біотинільованого мишачого МАТ до людського IL-2 (фірма BD Pharmingen, № 555040, клон В33-2). Зв'язування IL-2 візуалізували і кількісно оцінювали з використанням кон'югованого з європієм стрептавідину. Протягом перших 24 год. кліренс DP47GS IgG-(IL-2)₂ відбувався набагато швидше, ніж DP47GS IgG-IL-2, як у випадку NOD-, так і у випадку NOD.scid-мишей. Через 48 год. концентрації кожного аналіту в сироватці находились на схожому рівні, а через 72 год. всі вони були нижче межі виявлення. Межа виявлення IL-2 дорівнювала 0,05 нг/мл і вона позначена на графіке пунктирною лінією. Несподівано швидкий кліренс як одновалентних, так і двовалентних імункон'югатів IgG-IL-2 в організмі мишей, що не мають адаптивної імунної системи, дозволяє припустити, що у мишей існує негематопоетичний компартмент для IL-2 або "злив" і він може керувати швидким кліренсом in vivo імункон'югатів, які містять IL-2.

30 Для перевірки цієї гіпотези при створенні винаходу були проведені ФК-дослідження на NOD.scid-мишах, у яких був відсутній також високоафінний рецептор IL-2, IL2Rα (CD25), тобто на NOD.scid.II2rα^{-/-}-мишах (фіг. 23Б). В організмі NOD.scid.II2rα^{-/-}-мишей кліренс DP47GS IgG-(IL-2)₂, не зважаючи на введену в три рази більш високу дозу (0,3 мг/кг), відбувався протягом перших 24-48 год. більш швидко, ніж кліренс введеного в дозі 0,1 мг/кг DP47GS IgG-IL-2 і введеного в дозі 0,1 мг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Однак через 48 год. рівні кожного кон'югату в крові переходили в фазу повільної стаціонарної елімінації, при цьому IL-2 знаходився в крові на легко виявлюваному рівні протягом періоду часу аж до 6 днів. Важно зауважити, що в організмі зазначених позбавлених високоафінного рецептора IL-2 мишей початкова 24-часова фаза розподілу молекули DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ відбувалась небагато більш швидко, ніж IgG-IL-2, однак після цього мала місце фаза елімінації, схожа з фазою елімінації одновалентного імункон'югату, яка протягом періоду часу аж до 6 днів, тобто до останнього моменту часу, коли проводили їх аналіз. Зазначені дані для DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ є особливо важливими,

оскільки результати ФК-аналізу для NOD.scid.II2 α ^{-/-}-мишей, ймовірно, дозволяють з гарною точністю прогнозувати результати ФК-аналізу для приматів окрім людини.

Підвищення FOXP3 і CD25 в мишиних Treg після обробки IL-2

Для порівняння здатностей різних молекулярних форматів і конфігурацій людського IL-2 стимулювати FoxP3⁺-Treg-клітини *in vivo* мишам вводили шляхом підшкірної ін'єкції наповнювач, пролейкін (рекомбінантний людський IL-2), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂ або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ і проводили оцінку Treg з точки зору змін експресії CD25 на клітинній поверхні і внутрішньоклітинного FOXP3 через заздалегідь визначений як оптимального проміжок часу, що складав 24 год. (фіг. 24). Молодим здоровим мишам лінії BALB/c (n=3/групу обробки, n=4/наповнювач як контрольної групи) ін'єкували підшкірно або пролейкін (20000 або 100000 МЕ/мишу), DP47GS IgG-IL-2 (60, 300 або 1500 МЕ/мишу), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (60, 300 або 1500 МЕ/мишу) або DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300 або 1500 МЕ/мишу). Дози вводили в наповнювачі, який представляв собою 100 мкл стерильного ЗФР, pH 7,2, що містив 0,5 % стерилізованої фільтрацією мишачої сироватки. Через 24 год. мишей умертвляли і у них виймали селезінку. Одержували суспензію одиничних клітин селезінки в 1 мл середовища L-15 і зберігали на льоді до подальшої обробки. Аліквоту (40 мкл) профільтрованої суспензії одиничних клітин переносили в пробірки для здійснення FACS і промивали 2 мл FACS-буфера (600 × g, 5 хв). Потім зразки інкубували з кон'югованими з флуорохромом антитілами до антигенам клітинної поверхні: CD4 (клон RM4-5, флуорохром A700), CD25 (eBio7D4, Af488), CD44 (IM7, e605), CD62L (MEL-14, PE), ICOS (C398.4A, PE/Cy7), CD103 (2E7, APC). Забарвлювання здійснювали протягом 30 хв при 4 °C в 100 мкл FACS-буфера (ЗФР, pH 7,2+0,2 % BCA). Після забарвлювання клітинної поверхні зразки промивали 4 мл FACS-буфера (600 × g, 5 хв) перед здійсненням внутрішньоклітинного забарвлювання (відповідно до протоколу внутрішньоклітинного забарвлювання фірми eBioscience). В цілому, метод полягав в наступному: зразки ресуспендували в 200 мкл буфера для фіксації/підвищення проникності (фірма eBioscience, № 00-5521) і інкубували протягом 1 год. при 4°C. В зразки додавали 1 мл 1 × буфера для підвищення проникності (фірма eBioscience, № 00-8333) перед додаванням 3 мл FACS-буфера і здійсненням промивки (600 × g, 5 хв). Внутрішньоклітинні антигени Ki-67 (B56, PerCP Cy5.5) і FOXP3 (FJK-16S, e450) забарвлювали в 100 мкл 1 × буфера для підвищення проникності протягом 1 год. при 4°C. Зразки промивали 4 мл FACS-буфера (600 × g, двічі по 5 хв) і дані одержували за допомогою аналізатора BD Fortessa і аналізували за допомогою програми FlowJo (фірма Tree Star Inc.). Treg ідентифікували як CD4⁺, FOXP3⁺ в синглетах в лімфоцитарному вікні; для всіх зразків в цій популяції розраховували середню інтенсивність флуоресценції (MFI), виявлену для CD25 і FOXP3.

Як продемонстровано на фіг. 24, три імунokon'югата, що містять IL-2 мали однакову ефективність відносно стимуляції експресії CD25 (фіг. 24А) і FoxP3 (фіг. 24Б) в мишиних Treg і характеризувались узгоджувальними залежностями відповіді від дози в діапазоні доз, що охоплює дози 60, 300 і 1500 МЕ/мишу. У кожному випадку доза 1500 МЕ кожного імунokon'югату (чорні стовпчики) була значимо більш ефективна, ніж 100000 МЕ пролейкіну (чорні стовпчики). В більшості випадків 300 МЕ імунokon'югатів (темно-сірі стовпчики) були еквівалентні 100000 МЕ пролейкіну, а 60 МЕ імунokon'югатів (світло-сірі стовпчики) були еквівалентні 20000 МЕ пролейкіну (світло-сірі стовпчики). Для всіх груп обробок дані представлені у вигляді середнього значення ± СКО.

Оцінка фармакокінетичних властивостей на мавпах циномолгус

Перед початком функціональних досліджень на приматах окрім людини оцінювали фармакокінетичні (ФК) властивості імунokon'югатів, що містять IL-2 на біологічно наївних здорових дорослих мавпах циномолгус (фіг. 25). Мавпам (n=2/дозу) вводили внутрішньовенно (i.v.) у вигляді короточасної болюсної ін'єкції стерильний DP47GS IgG-IL-2 або DP47GS IgG-(IL-2)₂ в ЗФР, що містить 0,5 % сироватки мавп циномолгус і брали зразки крові в різні моменти часу протягом періоду часу з 30 хв до 72 год. після ін'єкції. Людський IL-2 оцінювали в зразках сироватки мавп циномолгус з використанням мишачого МАт до людського IL-2 (фірма BD Pharmingen, каталожний номер 555051, клон 5344.111) для сенсibiliзації 96-лункових планшетів для захоплення людського IL-2. Потім проводили виявлення людського IL-2 з використанням біотинільованого мишачого МАт до людського IL-2 (фірма BD Pharmingen, каталожний номер 555040, клон B33-2 Зв'язування IL-2 візуалізували і кількісно оцінювали з використанням кон'югованого з європієм стрептавідину. Межа виявлення IL-2 з використанням сироватки мавп циномолгус дорівнювала 0,05 нг/мл (позначена на графіках пунктирною лінією). У зразках сироватки мавп циномолгус, взятих перед обробкою, IL-2 не був виявлений (відповідно, його рівень був < 0,05 нг/мл).

Виявлення IL-2 в сироватці мавп циномолгус проводили в період з 30 хв до 48 год. після i.v. -

ін'єкції для всіх доз DP47GS IgG-IL-2 (фіг. 25A) і DP47GS IgG-(IL-2)₂ (фіг. 25Б). Через 72 год. рівні IL-2 в сироватці находились нижче межі виявлення (0,05 нг/мл, пунктирна лінія) для всіх тварин, оброблених 10 і 25 мкг/кг DP47GS IgG-IL-2 або DP47GS IgG-(IL-2)₂. Після обробки DP47GS IgG-IL-2 в дозі 100 мкг/кг виявлюваний рівень IL-2 в сироватці все ще був присутнім через 72 год.

Індукція збільшення кількості Трег-клітин у мавп циномогус

У мавп циномогус, оброблених *in vivo* DP47GS IgG-IL-2, мало місце збільшення в залежності від дози абсолютної кількості Трег-клітин, а також його кратне збільшення у порівнянні з вихідним рівнем через 7 днів після дозування (фіг. 26A і 26Б відповідно). У всіх експериментах застосовували нормальних здорових мавп циномогус віком від 3 до 6 років обох статей, при цьому жодна тварину не використовували більше одного разу. Під анестезією здійснювали SC ін'єкцію в бічну область спини DP47GS IgG-IL-2 (n=4-6) або наповнювача (n=3) в різних дозах. Індивідуальні дози DP47GS IgG-IL-2 розраховували на основі ваги тіла і готували для ін'єкції в наповнювачі, який являв собою стерильний ЗФР, рН 7.2, що містить 0,5 % стерильної нормальної сироватки мавп циномогус. Зразки крові збирали в різні моменти часу і аналізували для визначення гематологічних змін (загальний аналіз крові (CBC) і диференційований підрахунок лейкоцитів) за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора фірми Advia, а також маркерів клітинної поверхні і внутрішньоклітинних маркерів, докладно описаних вище (див. описані експериментальних процедур для таблиці 4). Дані про зміну регуляторних CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клітин в цільній крові в день 7 після обробки представлені на фіг. 26 у вигляді абсолютної кількості клітин на мм³ цільної крові (фіг. 26A) і кратності вимірювання кількості Трег-клітин (фіг. 26Б); все дані представлені у вигляді середнього значення \pm СКО. При більш високих дозах DP47GS IgG-IL-2, що складали 25 мкг/кг і 36 мкг/кг, було встановлено, що кількість Трег-клітин збільшувалось в середньому приблизно в 3 рази (діапазон 111-255 %, n=6) і в 4 рази (діапазон 110-470 %, n=6) відповідно. При подальшому зниженні введеної SC дози DP47GS IgG-IL-2 (12, 6 і 2 мкг/кг) продовжував викликати відповідним чином зменшені вимірювання кількості Трег-клітин і кратності його вимірювання. Не прив'язуючись до будь-якої теорії, можна вважати, що ~2-кратне збільшення кількості Трег-клітин (що знаходиться в діапазоні 67-133 %, n=6) при введенні дози 12 мкг/кг DP47GS IgG-IL2 може представляти собою потрібне збільшення кількості Трег-клітин у випадку деяких аутоімунних і запальних захворювань. Кількість Трег-клітин у людей варіюється в широких межах (20-90 Трег-клітин на мм³ крові; від 4 до 10 % CD4⁺-Т-клітин) і логічно припустити, що збільшення кількості Трег-клітин, індуковане IL-2 в організмі індивідуума, повинно приводити до загального підвищення функціональної супресії.

При оцінюванні більш низьких доз DP47GS IgG-IL-2 (2-6 мкг/кг) зразки крові збирали більш часто для ідентифікації оптимальних моментів часу для виявлення змін кількості Трег-клітин після введення DP47GS IgG-IL-2 (фіг. 27). Хоча вимірювання кількості Трег-клітин спостерігали протягом 7 днів, максимальна стимуляція мала місце в день 4, тобто раніше, ніж це мало місце при обробці більш високими дозами DP47GS IgG-IL-2 (день 7, фіг. 26).

Пролейкін і DP47GS IgG-IL-2 малу порівняну дію *in vitro* при аналізі цільної крові людини і мавп циномогус, коли безпосередньо порівнювали кількість одиниць IL-2-активності, потрібну для стимуляції pSTAT5a в Трег-клітинах і інших чутливих до IL-2 клітинах (дані не представлені). Маючи у розпорядженні дані про короткий час напівжиття пролейкіну в організмі людини, проводили дослідження на мавпах циномогус з використанням однієї дози для оцінки *in vivo* індукції і активації Трег-клітин. Пролейкін викликав залежну від дози і часу зміну кількості Трег-клітин, яку оцінювали за кратністю вимірювання абсолютних кількостей, а також за активацією pSTAT5a. У той час як збільшення кількості Трег-клітин було номінальним (фіг. 28A: 10-40 %), індуковане за допомогою Proleukin[®] підвищення pSTAT5a в Трег-клітинах було значним і залежало від дози через один день після обробки (фіг. 28Б), але мало невелику тривалість *in vivo* і рівень pSTAT5a повертався до норми через 2-3 дні.

Порівняння здатності DP47GS IgG-IL-2 і пролейкіну індукувати збільшення кількості Трег-клітин *in vivo* у мавп циномогус представлено на фіг. 29. Нормальних здорових мавп циномогус (по n=5 в групі) обробляли низькими дозами DP47GS IgG-IL-2 або високими дозами пролейкіну і аналізували вимірювання регуляторних Т-клітин в день 10. В дні 0 і 7 вводили SC DP47 IgG-IL-2 в дозі 16800 МЕ/кг (результати для дози 12 мкг/кг представлені на фіг. 26). На основі опублікованих даних досліджень, в яких пролейкін вводили пацієнтам з діабетом типу 1 (4,5×10⁶ МЕ/індивідуума, 3 рази на тиждень) і в яких було продемонстровано, що він приводить до збільшення кількості Трег-клітин, і даних, одержаних при введенні однократних доз, які представлені на фіг. 28, пролейкін вводили SC 3 рази на тиждень (M/W/F), здійснюючи введення загалом 5 доз по 200000 МЕ/кг кожна (доза для мавп циномогус, еквівалентна

4,5×10⁶ МЕ/індивідуума). Результати представлені на фіг. 29 у вигляді середніх значень ± СКО для вимірювання загальної кількості Трег-клітин на мм³ крові (фіг. 29А), кратності збільшення кількості Трег-клітин (фіг. 29Б) і вимірювання співвідношення між Трег-клітинами і канонічними CD4⁺FOXP3⁺-клітинами (фіг. 29В).

Хоча протягом 10-денного періоду було введено кількість DP47GS IgG-IL-2, що має майже в 30 разів меншу активність, DP47GS IgG-IL-2 індукував більше збільшення кількості Трег-клітин, ніж пролейкін (фіг. 29А, $p=0,06$). Кратність збільшення кількостей Трег-клітин у порівнянні з вихідним рівнем (фіг. 29Б) і збільшення кількості Трег-клітин у порівнянні з канонічними CD4⁺-клітинами (фіг. 29В) також були більш значимими ($p=0,0011$ і $p=0,016$ відповідно) у мавп, яким вводили DP47GS IgG-IL-2, у порівнянні з мавпами, яким вводили пролейкін. Для людей співвідношення між регуляторними CD4⁺-Т-клітинами (звичайно їх визначають як FOXP3⁺-клітини і за допомогою комбінації маркерів клітинної поверхні) і не-регуляторними CD4⁺-Т-клітинами (які позначають як канонічні або ефекторні клітини) часто застосовують для визначення функціональних рівнів Трег-клітин в організмі пацієнтів зі спливанням часу.

Відповіді *in vivo* субпопуляцій клітин периферійної крові мавп циномолгус на обробку низької дозою DP47GS IgG-IL-2

Клітинна специфічність *in vivo* IL-2 при обробці в низькій дозі представляє собою параметр, що має вирішальне значення. При створенні винаходу було встановлено, що можна здійснювати високочутливий моніторинг клітинної активації *in vivo*, індукований DP47GS IgG-IL-2 або пролейкіном, шляхом вимірювання рівнів pSTAT5a *ex vivo* в зразках крові, взятих в різні моменти часу після введення доз мавпам циномолгус або мишам. Відповіді *in vivo* всіх популяцій клітин, моніторинг яких можна здійснювати *in vitro* (фіг. 8-10), можна аналізувати також *ex vivo*.

Через 1 і 3 дні після введення *in vivo* однієї дози DP47GS IgG-IL-2 (12 мкг/кг) здоровим мавпам циномолгус ($n=5$) збирали зразки цільної крові і аналізували відносно фосфорилування STAT5a як описано вище (див. описані експериментальних процедур для таблиці 4). У кожній мавпи брали зразок крові в день 0 перед обробкою і вимірювали рівень фосфорилування STAT5a, який застосовували індивідуально для оцінки кратності змін після обробки. Кратність вимірювання pSTAT5a в Трег-клітинах в дні 1 і 3 представлена на фіг. 30А, кратність вимірювання pSTAT5a в канонічних ефекторних CD4⁺CD45RA⁺-Т-клітинах пам'яті представлена на фіг. 30Б, а кратність вимірювання pSTAT5a в канонічних наївних ефекторних CD4⁺CD45RA⁺-Т-клітинах представлена на фіг. 30В. Результати переконливо свідчать про те, що в крові мавп циномолгус, взятій через один і три дні після введення однієї низької дози (12 мкг/кг) DP47GS IgG-IL-2, мало місце переважне підвищення pSTAT5a в Трег-клітинах у порівнянні з Т-клітинами пам'яті і наївними CD4⁺-Т-клітинами (фіг. 30А-В). Очевидно, що одноразова низька доза DP47GS IgG-IL-2 була більш ефективною, ніж одноразова висока доза пролейкіну (фіг. 28Б) відносно викликання тривалого стану активації *in vivo* Трег-клітин.

В перших дослідженнях, в яких фосфорилування STAT5a застосовували як біомаркер *in vivo* активації Трег-клітин, максимальний рівень pSTAT5a був виявлений тільки в день 1 при обробці однієї дозою пролейкіну (фіг. 28Б) і в дні 1 і 3 при обробці низької дозою (12 мкг/кг) DP47GS IgG-IL-2 (фіг. 30А). Додаткове титрування DP47GS IgG-IL-2 в поєднанні з використанням зразків, взятих у додаткові моменти часу, продемонструвало, що pSTAT5a-сигнали *in vivo* могли підтримуватися протягом 4 днів, перш ніж вони знижувались знову до нормального рівня через 7 днів (фіг. 31А, 31Б). Величини MFI (середня інтенсивність флуоресценції) pSTAT5a-сигналів, виміряні як для дози 2 мкг/кг (31А, $n=4$), так і для дози 6 мкг/кг (31Б, $n=6$), свідчать про те, що в цих випадках pSTAT5a-сигнали були менше максимальних (див. фіг. 33Б). Навіть зазначені дуже низькі дози DP47GS IgG-IL-2 забезпечували *in vivo* тривалі сигнали від Трег-клітин, що перевищують сигнали, одержані після обробки пролейкіном (фіг. 28Б). Ці результати підтверджують висунуту при створенні винаходу гіпотезу про те, що дуже низькі рівні IL-2, який має тривалий час життя, тобто DP47GS IgG-IL-2, але не пролейкіну, можуть стимулювати Трег-клітини протягом тривалих періодів часу *in vivo*, тим самим дозволяючи зменшувати частоту обробок, необхідних для відновлення домінантної ауто толерантності й покращення наслідків захворювання. Збільшення кількості Трег-клітин в периферійної крові після обробки низькою дозою IL-2 може відображати зміна в розподілі клітин в організмі, а не дійсне збільшення кількості клітин. Для того, щоб встановити, що збільшення Трег-клітин *in vivo* щонайменше частково зумовлено індукцією клітинного поділу при обробці IL-2, проводили оцінку внутрішньоклітинного маркера проліферації Ki-67. Ki-67 представляє собою білок, який можна виявляти в ядрах на фазах G₁, S, G₂ і мітозу, але який відсутній в спокійних клітинах, що знаходяться на фазі G₀ клітинного циклу. Для мавп циномолгус, оброблених 2 і 6 мкг/кг DP47GS IgG-IL-2, як описано вище (фіг. 31), здійснювали також моніторинг змін *ex vivo*

рівнів внутрішньоклітинного маркера Ki-67 як описано вище (див. описані експериментальних процедур для таблиці 4) для оцінки ступеню проліферації *in vivo*. Процент клітин, що знаходиться на фазах клітинного циклу (Ki-67⁺) в день 0 порівнювали з процентом Ki-67⁺-клітин в період з 1 по 11 день після обробки. Дані для Ki-67⁺-Tрег-клітин представлені на фіг. 32А, для канонічних ефекторних CD4⁺CD45⁺-Т-клітин пам'яті представлені на фіг. 32Б, а для канонічних наївних ефекторних CD4⁺CD45RA⁺-Т-клітин представлені на фіг. 32В. Встановлено, що в клітинах крові мавп циномогус, зібраних через 1-7 днів після введення однієї низької дози DP47GS IgG-IL-2 (6 мкг/кг) мало місце переважне підвищення рівня Ki-67 в Трег-клітинах у порівнянні з рівнями в канонічних наївних ефекторних CD4⁺-Т-клітинах (див. порівняння фіг. 32А з 32В). DP47GS IgG-IL-2 (6 мкг/кг) мав здатність стимулювати проліферацію канонічних ефекторних CD4⁺-Т-клітин пам'яті (фіг. 32Б) на відміну від наївних ефекторних Т-клітин. При обробці мінімальної дозою DP47GS IgG-IL-2 (2 мкг/кг) мала місце мінімальна активація клітинного циклу і проліферація у порівнянні з дозою 6 мкг/кг.

При аналізах цільної крові людини і мавп циномогус було встановлено, що активність *in vitro* двовалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ відносно Трег-клітин в цілому була приблизно в 6 разів більш сильною, ніж одновалентного DP47GS IgG-IL-2 (таблиці 2 і 4). Тому перша доза для мавп циномогус була в 6 разів менше найбільшої протестованої дози DP47GS IgG-IL-2 (36 мкг/кг). DP47GS IgG-(IL-2)₂ після введення в дозі 6 мкг/кг (n=4) викликав великі вимірювання Трег-клітин, присутніх в кровотоці (фіг. 33А), які зберігались значно довше звичайних 14 днів після обробки, значні й тривалі рівні pSTAT5а в Трег-клітинах, які повертались до нормальних величин через 1 тиждень (фіг. 33Б), і майже 3-кратне збільшення кількості Трег-клітин (фіг. 33В). Кратність змін, індукованих DP47GS IgG-IL-2 (див. фіг. 26, незабарвлені стовпчики) порівнювали зі змінами після обробки дозою 6 мкг/кг двовалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ (затінений стовпчик) (фіг. 33Г). Аналогічно до того, що було встановлено при аналізі цільної крові людини і мавп циномогус, DP47GS IgG-(IL-2)₂ мав підвищеної ефективності *in vivo*, яка перевищувала (очікуване) 2-кратне збільшення, яке відповідає кількості молекул IL-2 на молекулу IgG.

Мавпам циномогус вводили додаткові дози двовалентного DP47GS IgG-(IL-2)₂ для оцінки його впливів *in vivo* при дуже низьких дозах (2 і 0,7 мкг/кг) (фіг. 34). У той час як доза 2 мкг/кг визивала помірні кратності змін (в середньому 46 %, діапазон від 20 до 70 %, n=8), доза 0,7 мкг/кг мала слабкий вплив на кількості Т-клітин (середня величина збільшення 16 %, n=3) (фіг. 34А). Обидві низькі дози стимулювали підвищення pSTAT5а в Трег-клітинах (фіг. 34Б, n=3 для кожної дози), маючи при цьому слабкий вплив на pSTAT5а Teff-/Tmem-клітин (фіг. 34В, n=3 для кожної дози).

Повні впливи терапії з використанням одновалентного і двовалентного злитого білка, який містить IL-2 дикого типу і його здатність збільшувати кількість Трег-клітин у мавп циномогус представлені на фіг. 35. Обидві форми IgG-IL-2, який має тривалий час життя є сильними індукторами Трег-клітин, що можна оцінювати *in vivo*, застосовуючи pSTAT5а як біомаркер активації, і, як представлено на відповідному кресленні, приводять до кратного збільшення кількостей присутніх в кровотоці Трег-клітин. DP47GS IgG-(IL-2)₂, що має підвищену ефективність, зумовлену подвійною кількістю молекул IL-2 на С-кінці IgG, мав більш сильну залежність від дози у порівнянні з DP47GS IgG-IL-2.

Деметилування ДНК FOXP3 і CTLA-4 в субпопуляціях Т-клітин мавп циномогус

Функціонально активні Трег-клітини мають здатність продукувати імуносупресорні цитокини CTLA-4, IL-10 і TGFβ і потребують стабільну експресію фактору транскрипції FOXP3. Експресія FOXP3 в Трег-клітинах людини і мавп циномогус залежить від деметилування десяти CpG-сайтів метилування ДНК в специфічній для Трег деметильованій області (TSDR) в локусі FOXP3. Аналогічно до цього, експресія й вироблення CTLA-4 залежить від деметилування семи CpG-сайтів метилування ДНК в локусі CTLA-4 людини і мавп циномогус. Тому при створенні винаходу проводили оцінку статусу деметилування як FOXP3, так і CTLA-4 в різних субпопуляціях CD4⁺-Т-клітин до і після обробки DP47GS IgG-IL-2 (n=4, 25 мкг/кг s.c.) і DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=4, 6 мкг/кг s.c.), які вводили в тих дозах і в ті моменти часу, які, як було встановлено раніше, значно збільшували кількість Трег-клітин в крові. В експерименті застосовували тільки біологічно наївних дорослих самців мавп циномогус вагою від 9,1 до 10,9 кг. Обробки проводили через 3 тижні після першого вихідного збору зразків крові й збору зразків крові через 4-5 днів після обробки. PBMC з 30 мл гепаринізованої крові розділяли за допомогою FACSAriaTM (фірма Becton Dickinson) на відповідні субпопуляції CD4⁺-клітин, включаючи Трег-клітини (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}), ефекторні Т-клітини пам'яті (CD4⁺CD45RA⁺), наївні ефекторні Т-клітини (CD4⁺CD45RA⁺) і CD4⁺CD25⁺CD127⁺-клітини.

Відсортовані субпопуляції клітин заморожували у вигляді аліквот по 100000 клітин і зберігали у вигляді сухого дебрису при -80°C для того, щоб проводити обробку одночасно для

всіх зразків. Здійснювали відтавання клітинних дебрисів і екстракцію ДНК, і проводили одностадійну обробку бісульфітом з використанням набору Epiect Fast Lyse All (фірма Qiagen) відповідно до інструкцій виробника. Застосовували по 5 нг (в 2 мкл) обробленої бісульфітом ДНК в 20 мкл суміші для першого циклу ПЛР для дуплексу, яка містить 10 мкл суміші з набору для мультиплексної ПЛР (фірма Qiagen), 6 мкл води, 0,5 мкл прямого праймеру для FOXP3 tgtaaacgacgcccaggtTTTAGAAGTTGTATGGGGGATGTT (SEQ ID NO: 54), 0,5 мкл зворотного праймеру для FOXP3 caggaaacagctatgaccAAAATATCTACCCTCTTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 55), 0,5 мкл прямого праймеру для CTLA-4 tgtaaacgacgcccaggtGGGTTTGGTTATGAAGGAGTA TGA (SEQ ID NO: 56) і 0,5 мкл зворотного праймеру для CTLA-4 caggaaacagctatgaccTTCACT TAATTTCCASTAAAAATACCC (SEQ ID NO: 57). Перший цикл циклічної ПЛР проводили при 95°C протягом 15 хв, потім 20 циклів при 95°C протягом 30 з, при 60°C протягом 90 з і при 72°C протягом 60 з, потім протягом 10 хв при 72°C. ПЛР-продукт очищали з використанням гранул AMPure XP (фірма Becton Coulter) відповідно до інструкцій виробника і елюювали в 20 мкл води. Здійснювали другий цикл ПЛР, в якому додавали унікальну індексну послідовність до початку кожного зразку, використовуючи 15 мкл суміші для ПЛР, яка містить 7,5 мкл суміші для мультиплексної ПЛР (фірма Qiagen), 6,5 мкл продукту, одержаного в першому циклі ПЛР, і 1 мкл індексного праймеру. Умови здійснення циклів другого циклу ПЛР були наступними: 95°C протягом 15 хв, потім 7 циклів при 95°C протягом 30 з, при 54°C протягом 90 з і при 72°C протягом 60 з, потім 5 хв при 72°C. ПЛР-продукти очищали з використанням гранул AMPure XP і елюювали в 15 мкл води, і 4 мкл застосовували для кількісної оцінки кількості ПЛР-продукту з використанням пристрою Shimadzu MultiNA. Об'єднували однакові молярні концентрації кожного зразку, створюючи бібліотеку для секвенування, яку кількісно оцінювали з використанням набору для кількісної оцінки бібліотек Кара Illumina. Бібліотеку секвенували за допомогою набору Illumina MiSeq з використанням реагентів v3 і здійснювали прогони для прочитання спарених кінцевих фрагментів 2 × 300 пар основ. Демультіплексування здійснювали за допомогою текстового драйвера bespoke python і застосовували програму Cutadapt для видалення адаптерів для секвенування. Прочитані прямі й зворотні послідовності зливали з використанням FLASH і виділяли послідовність кожного сайту метилування.

Обробка мавп циномолгус як DP47GS IgG-IL-2, так і DP47GS IgG-(IL-2)₂ індукувала значне збільшення кількості Трег-клітин в крові всіх оброблених тварин аналогічно тому, що було встановлено раніше з використанням такого ж самого протоколу обробки (фіг. 33 і фіг. 35). Важливо зауважити, що швидке й різке збільшення Трег-клітин після обробки як DP47GS IgG-IL-2, так і DP47GS IgG-(IL-2)₂, не приводило до негативного впливу або зниження статусу деметилування FOXP3 (фіг. 36, верхня панель) або CTLA-4 (фіг. 36, нижня панель). Схожі результати були одержані для обох молекул, дані для DP47GS IgG-(IL-2)₂ представлені на фіг. 36. Той факт, що обробка не мала негативного впливу і не знижувала статус деметилування як FOXP3, так і CTLA-4, свідчить про те, що всі Трег-клітини зберігали свій природній зрілий імуносупресорний фенотип, незважаючи на значне збільшення абсолютних кількостей. Одержані на приматах окрім людини результати оцінки деметилування FOXP3 і CTLA-4 в Трег-клітинах дозволяють припустити, що обробка людини низькими дозами, що мають тривалий час життя IgG-(IL-2)₂-подібними молекулами може дозволити збільшувати кількості повністю функціональних зрілих Трег-клітин, що, в свою чергу, повинно коректувати імунорегуляторні дисбаланси при аутоімунних захворюваннях людини, а також при інших хронічних імуніопосередкованих запальних захворюваннях.

Фармакокінетичні характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в організмі мавп циномолгус
ФК-характеристики DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ оцінювали на біологічно наївних мавпах циномолгус (фіг. 37). Мавпам (n=2/дозу) вводили шляхом внутрішньовенної (iv) і підшкірної (sc) ін'єкції в дозі 30 або 100 мкг/кг стерильний DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ в ЗФР, що містить 0,5 % сироватки мавп циномолгус, і брали зразки крові в різні моменти часу в період з 30 хв до 14 днів після ін'єкції. Оцінку людського IL-2 в зразках плазми мавп циномолгус проводили відповідно до описаному вище методу. Межа виявлення IL-2 в аналізі з використанням плазми мавп циномолгус складала 0,05 нг/мл. В зразках плазми мавп циномолгус, взятих до обробки, рівень IL-2 не піддавався виявленню (тобто був < 0,05 нг/мл).

На відміну від ФК злитих білків дикого типу (фіг. 25), коли їх рівні в крові можна було виявити тільки через 48-72 год., DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ був виявлений в плазмі всіх включених в експеримент мавп циномолгус у всі моменти часу аж до дні 14 при застосуванні iv- (фіг. 37А) і sc- (фіг. 37Б) шляхів введення. Протягом перших двох-трьох днів рівні в плазмі були пропорційні дозі і білки характеризувались більш тривалим часом напівжиття у порівнянні зі злитими молекулами, що містять IL-2 дикого типу.

Були проведені вимірювання рівнів розчинного CD25 (sCD25, IL-2RA) в плазмі (фіг. 37В),

який розглядають як біомаркер експозиції IL-2 *in vivo*. Як реагенти застосовували моноклональні антитіла до людського sCD25, які, як відомо, вступають в перехресну реакцію з sCD25 мавп циномолгус, в сендвіч-імуноаналізі з використанням захоплювального (MAB623, фірма R&D Systems) і біотинільованого ідентифікувального (BAF223, фірма R&D Systems) антитіл, застосовуючи кон'югований з Eu⁺⁺ стрептавідін для виявлення зв'язаного sCD25. Підвищення рівнів sCD25 після введення DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ залежало від дози і мало місце в період з 1 по 7 день, після чого вони повертались до нормальних рівнів в день 8.

Індукція Treg-клітин у мавп циномолгус за допомогою DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

В описаних раніше експериментах на мавпах циномолгус, яких обробляли *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 і DP47GS IgG-(IL-2)₂ дикого типу, було виявлено залежне від дози збільшення в 2-4 рази абсолютної кількості Treg-клітин (фіг. 26 і 33 відповідно), що відображало їх активності *in vitro*, виявлені в аналізах цільної крові людини, а саме, 6-9-кратні розрізнення *in vitro* (таблиці 2 і 3). З урахуванням втрати їх ефективності *in vitro* в людській цільній крові (таблиця 3), як дози DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ *in vivo* були вибрані 30 і 100 мкг/кг. Так же, як і в попередніх експериментах, ін'єкцію DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ здійснювали *iv*- або *sc*-шляхом, розраховуючи індивідуальні дози з урахуванням ваги тіла, і білок готували для ін'єкції в наповнювачі, що являв собою стерильний ЗФР, рН 7,2, що містить 0,5 % стерильної нормальної сироватки мавп циномолгус (n=2 на дозу і путь ін'єкції). Зразки крові брали до обробки (в дні -4 і -5), відразу після обробки (день 0) і в різні моменти часу після обробки (дні 1-14) і аналізували відносно гематологічних змін (загальний аналіз крові (СВС) і диференційований підрахунок лейкоцитів), а також маркерів клітинної поверхні й внутрішньоклітинних маркерів, описаних вище.

Збільшення загальної кількості CD4⁺Treg-клітин, CD4⁺-Treg-клітин пам'яті, наївних CD4⁺-Treg-клітин і CD8⁺FOXP3⁺-Treg-клітин представлені у вигляді залежних від дози відповідей або у вигляді абсолютної кількості клітин/мл крові (фіг. 38А і 38Б), або у вигляді % від загальної кількості CD4⁺- або CD8⁺-Т-клітин (фіг. 38В і 38Г).

Загальна кількість CD4⁺-Treg-клітин збільшувалась після введення 100 мкг/кг з 90000/мл до 810000/мл (в 9 разів) і з 4,2 % до 26 % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (в 6,2 рази) і все ще залишалась на підвищеному рівні в день 14. Після введення 30 мкг/кг загальна кількість CD4⁺-Treg-клітин збільшувалась з 62000/мл до 447000/мл (в 7,2 рази) і з 4,5 % до 16,7 % від загальної кількості CD4⁺-клітин (в 3,7 рази).

Кількість Treg-клітин пам'яті зростала при введенні 100 мкг/кг з 42000/мл до 536000/мл (в 12,8 разів) і з 2 % до 17,4 % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (в 8,7 разів). При введенні 30 мкг/кг кількість Treg-клітин пам'яті збільшувалось з 51000/мл до 280000/мл (в 5,5 разів) і з 2,3 % до 10,5 % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (в 4,6 рази).

Кількість наївних Treg-клітин зростала при введенні 100 мкг/кг з 35000/мл до 272000/мл (в 7,8 рази) і з 2 % до 8,6 % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (в 4,3 рази). При введенні 30 мкг/кг кількість наївних Treg-клітин збільшувалась з 46000/мл до 166000/мл (в 3,6 рази) і з 2,2 % до 6,2 % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (в 2,8 разів).

Після введення 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, кількість CD8⁺FOXP3⁺-Treg-клітин збільшувалась від рівня, відповідного рідкому типу клітин, 16000/мл до 183000/мл (в 11,4 рази) і від 0,7 % до 7,8 % від загальної кількості CD8⁺-Т-клітин (в 11,1 рази). При введенні дози DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, що складає 30 мкг/кг, загальна кількість CD8⁺-Treg-клітин збільшувалась з 17000/мл до 101000/мл (в 5,9 рази) і з 0,5 % до 4,3 % від загальної кількості CD8⁺-Т-клітин (в 8,6 рази). Не було виявлено зв'язаних з обробкою збільшень кількості CD4⁺-Teff-клітин пам'яті після введення 100 мкг/кг або 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (фіг. 39А); в дійсності проценти знижувались в день 4, ймовірно, внаслідок більшого збільшення кількості CD4⁺-Treg-клітин в цей момент часу. Кількість CD4⁺CD25^{hi}-Teff-клітин пам'яті залишалась без вимірювання після введення 30 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, але була підвищеною в 1,6 рази в день 4, після чого поверталось до вихідного рівня в дні 7-10 (фіг. 39Б).

Індукція pSTAT5a, CD25 і Ki-67 у мавп циномолгус з використанням DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

Як зазначено вище, клітинна специфічність *in vivo* обробки з використанням IL-2 представляє собою параметр, що має вирішальне значення, і при створенні винаходу було продемонстровано, що можна здійснювати моніторинг активації субпопуляції клітин *in vivo* шляхом вимірювання *ex vivo* pSTAT5a, рівнів CD25 на клітинній поверхні й внутрішньоклітинного Ki-67 в зразках крові, взятих в різні моменти часу після введення дози.

Результати, представлені на фіг. 40А і 40Б, демонструють, що після обробки за допомогою DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ мали місце переважна індукція pSTAT5a і пролонгування відповіді у вигляді сигналів pSTAT5a в CD4⁺- і CD8⁺-Treg-клітинах; максимальні відповіді підтримувались протягом періоду часу з дні 1 по день 4 як при введенні дози 100 мкг/кг, так і дози 30 мкг/кг, і повертались до вихідного рівня через 7 днів. Відповіді CD4⁺CD25^{hi}-Teff-клітин пам'яті складали

~ половину від максимальних рівнів відповідей в день 1 і повертались до вихідного рівня в день 4. Для всіх інших протестованих типів клітин після обробки була виявлена слабка індукція pSTAT5a або вона взагалі не мала місце.

Збільшення рівнів CD25 на клітинній поверхні є наслідком активації IL-2 і представляє собою чутливий біомаркер активації *in vivo*. Невдовзі після обробки DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, як в дозі 100 мкг/кг, так і в дозі 30 мкг/кг, рівень CD25 переважно зростав в CD4⁺клітинах пам'яті і наївних Treg-клітинах, а також в CD8⁺FOXP3⁺-Treg-клітинах (фіг. 41A, 41Б). CD25-відповіді CD4⁺клітин пам'яті і наївних Treg-клітин досягали піка в день 4 і повертались до вихідного рівня через 7 днів, у той час як підвищені рівні CD25 в CD8⁺FOXP3⁺-Treg-клітинах зберігались протягом 10-14 днів.

В експериментах з використанням що містять IL-2 дикого типу злитих білків при створенні винаходу було продемонстровано, що Ki-67 представляє собою чутливий внутрішньоклітинний маркер для клітин, у яких почалась проліферація *in vivo*, і він виявився чутливим біомаркером індукованої IL-2 активації у мавп циномогус. При аналізі відповідей на 100 мкг/кг DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ було встановлено, що 80-90 % CD4⁺- і CD8⁺-Treg-клітин становились Ki-67-позитивними (Ki-67⁺) (фіг. 42A), у той час як після обробки дозою 30 мкг/кг Ki-67-позитивними становились 60-90 % клітин (фіг. 42Б). Було встановлено, що інші протестовані субпопуляції клітин були менше чутливими у порівнянні з Treg-клітинами.

Для попереднього вивчення *in vivo* вплив нових сконструйованих молекул IL-2 на збільшення кількості Treg-клітин всі дози для мавп циномогус виражали в пмоль/кг, що дозволяло здійснювати безпосередні порівняння незалежно від молекулярної маси; залежності відповідей від дози порівнювали за типом "голова-до голови" для максимальних збільшень кількості CD4⁺-Treg-клітин у вигляді % від загальної кількості CD4⁺-Т-клітин (фіг. 43). Не зважаючи на втрату ефективності *in vitro* у порівнянні зі злитими білками дикого типу, несподівано було встановлено, що DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ індукував більше збільшення кількості Treg-клітин у мавп циномогус, ймовірно, внаслідок збільшення його системної експозиції як після *iv*-, так і після *sc*-введення.

Еозинофілія, яка виникає внаслідок введення IL-2 *in vivo*

Proleukin[®] у людей стимулює еозинофілію при щоденному застосуванні в дозах від 1×10⁶ до 4,5×10⁶ МЕ/індивідуума. У мавп циномогус виявлено схоже збільшення кількості еозинофілів у 100 % тварин після повторної обробки високою дозою пролейкіну або однократними дозами DP47GS IgG-IL-2, що складають 226 пмоль/кг (фіг. 44). На фіг. 44 представлені результати для кожної протестованої тварини (вихідні рівні для колоній були одержані для тварин перед тестуванням: (n=44 і n=30) і для різних груп обробки (n=5-6) не залежно від того чи була кількість еозинофілів нормальною або підвищеною. Різким контрастом з впливами пролейкіну і DP47GS IgG-IL-2 була фактична відсутність впливу на еозинофілії DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ *in vivo* при його застосуванні в дозах 170 і 570 пмоль/кг (30 і 100 мкг/кг відповідно). Зазначена відсутність індукції системної еозинофілії при обробці DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ є дуже важливою, приймаючи до уваги ступінь експансії Treg, індукованої зазначеними різними обробками (порівняння представлено на фіг. 43).

Обробка *in vivo* з використанням DP47GS IgG-IL-2 пригнічує імунні відповіді у мишей

В попередніх дослідженнях було встановлено, що DP47GS IgG-IL-2 в дозі 4000 МЕ активував мишачі регуляторні FOXP3⁺-Т-клітини *in vivo*; далі цю дозу застосовували для оцінки його здатності пригнічувати класичні залежні від Т-клітин імунні відповіді у мишей, тобто реакцію гіперчутливості уповільненого типу (фіг. 45) і IgG-відповідь на KLH (фіг. 46).

NOD-мишей і C57BL/6-мишей (n=7) імунізували шляхом IV-ін'єкції баранячими еритроцитами (srbc) і здійснювали контрольне зараження через 3 дні, застосовуючи болюсну ін'єкцію srbc, в одну задню лапу для індукції реакції гіперчутливості уповільненого типу (DTH). Через один день після контрольного зараження мишей умертвляли обробкою CO₂, відрізували лапи і зважували. Величина DTH-відповіді представлена у вигляді вимірювання ваги лап у порівнянні з неімунізованими мишами (Δ ваги лап). DP47GS IgG-IL-2 вводили *sc* в дозі 4000 МЕ на мишу за 3 дні до імунізації і в день імунізації srbc і наповнювачем, який представляв собою стерильний ЗФР, pH 7,2. Статистичну значимість визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні з використанням програми GraphPad Prism.

Обробка DP47GS IgG-IL-2 за 3 дні до і в день імунізації баранячими еритроцитами пригнічувала подальшу реакцію гіперчутливості уповільненого типу на контрольне зараження баранячими еритроцитами на 51 % у NOD-мишей (фіг. 45A; p=0,0023) і на 38 % у C57BL/6-мишей (фіг. 45Б; p=0,002). Застосовний як позитивний контроль імунодепресант мишачий CTLA-4-Ig інгібував DTH-реакцію в такому ж самому ступені, що й DP47GS IgG-IL-2.

DP47GS IgG-IL-2 також мав здатність пригнічувати KLH-специфічні IgG-відповіді у мишей

ліній C57BL/6 (інгібування на 78 %, $p=0,0007$, фіг. 46A) і NOD (інгібування на 67 %, $p=0,004$, фіг. 46Б). В цьому експерименті здорових молодих мишей C57BL/6 ($n=7-10$) і NOD ($n=13-14$) імунізували шляхом IP-ін'єкції за допомогою 100 мкг людської вакцини, яка містить чистий KLN без ад'юванта, відповідно до рекомендацій виробника (фірма Stellar). Обробка DP47GS IgG-IL-2 включала 1 (NOD) або 2 (C57BL/6) щотижневі SC-обробки 4000 ME на мишу в день імунізації. Через 7 днів (NOD) і 21 день (C57BL/6) після імунізації одержували зразки крові й визначали рівні в сироватці KLN-специфічних IgG-відповідей за допомогою ELISA.

Здатність DP47GS IgG-IL-2 подавляти імунні відповіді in vivo підтверджує гіпотезу про те, що активація регуляторних Т-клітин, яка індукується низькою дозою IL-2, приводить до утворення функціональних регуляторних Т-клітин, що опосередковує зниження імунної відповіді.

Хоча представлений вище винахід описаний достатньо докладно з метою ілюстрації і прикладу для більш ясного і кращого розуміння, опис і приклади не слід розглядати як обмежувальні обсяг винаходу. Опис всіх патентів і наукової літератури, процитованих в даному описі, спеціально повністю включені в нього як посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ

<120> ЗЛИТІ БІЛКИ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2, І ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 31142

<150> US 61/936564

<151> 2014-02-06

<160> 66

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 399


```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
5 <223> людський IL-2 дикого типу

<400> 2
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat      60
10 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc      120
    acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa      180
15 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta      240
    agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa      300
    acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga      360
20 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact                                399

<210> 3
<211> 133
<212> PRT
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> людський IL-2 дикого типу (C125A)

30 <400> 3

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1          5          10          15
35 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
    20          25          30
40 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
    35          40          45
    Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50          55          60
45 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
    65          70          75          80
    Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
    85          90          95
50 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
    100          105          110
    Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
    115          120          125
55 Ile Ser Thr Leu Thr
    130

<210> 4
60 <211> 399
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
65 <223> людський IL-2 дикого типу (C125A) (1)

<400> 4
gctcctacat cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat      60

```

	ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg	120
5	accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa	180
	gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agtccaagaa cttccacctg	240
	aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggctccgag	300
10	acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagctacca tcgtggaatt tctgaaccgg	360
	tggatcacct tcgcccagtc catcatctcc accctgacc	399
15	<210> 5 <211> 399 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> людський IL-2 дикого типу (C125A) (2)	
	<400> 5 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat	60
25	ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc	120
	acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa	180
30	gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta	240
	agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa	300
	acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga	360
35	tggattacct ttgcccagag catcatctca acactgact	399
40	<210> 6 <211> 399 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> людський IL-2 дикого типу IL-2 (C125A) (3)	
45	<400> 6 gctcctacta gcagctccac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct gctgctggat	60
	ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg	120
50	accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgaactga aacatctgca gtgcctggaa	180
	gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agagcaagaa cttccacctg	240
55	aggcccaggg acctgatcag caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggcagcgag	300
	acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagccacca tcgtggaatt tctgaaccgg	360
	tggatcacct tcgcccagag catcatcagc accctgaca	399
60	<210> 7 <211> 399 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
65	<220> <223> IL-2 дикого типу IL-2 (C125A) (4)	
	<400> 7	

gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 5 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta 240
 10 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399
 15 <210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 8
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 25 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 30 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 45 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 55 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 60 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 65 225
 <210> 9
 <211> 115

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
5 <223> DP47GS, VH

<400> 9

10 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
   1           5           10           15
   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20           25           30

15 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
   35           40           45

   Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
   50           55           60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
   65           70           75           80

   Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85           90           95

   Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100           105           110

30 Val Ser Ser
   115

<210> 10
<211> 345
35 <212> ДНК
   <213> Штучна послідовність

<220>
40 <223> DP47GS, VH

<400> 10
gaggtgcaat tgttgagatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
50 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagt                        345

<210> 11
55 <211> 108
   <212> PRT
   <213> Штучна послідовність

<220>
60 <223> DP47GS, VL

<400> 11

65 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
   1           5           10           15
   Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
      20           25           30

```

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 5 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 10 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 15 100 105
 <210> 12
 <211> 324
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> DP47GS, VL
 25 <400> 12
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 30 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300
 35 caggggacca aagtggaaat caaa 324
 <210> 13
 <211> 592
 40 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> DP47GS, HC (Fc «виступ», P329G LALA)-IL2
 45 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 55 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 65 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
			115					120					125				
5	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
		130					135					140					
	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
10	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165					170						175	
	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180					185						190		
15	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
			195					200					205				
	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
20		210					215					220					
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
25	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
				260					265					270			
30	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
35		290					295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
40	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	
				340					345					350			
45	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360				365					
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
50		370				375						380					
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
55	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					405					410					415		
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				420					425					430			
60	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			435					440					445				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	
65		450					455					460					
	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	
	465					470					475					480	

	Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr	
	485 490 495	
5	Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu	
	500 505 510	
	Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val	
	515 520 525	
10	Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu	
	530 535 540	
	Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr	
15	545 550 555 560	
	Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe	
	565 570 575	
20	Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr	
	580 585 590	
	<210> 14	
	<211> 1776	
25	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> DP47GS, HC (Fc «западина», P329G LALA)-IL2	
30	<400> 14	
	gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct	120
35	ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
40	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
	ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
	ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
45	ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
	ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
50	agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
	aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
	actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc	720
55	ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
60	gagggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgtaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
	gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
65	ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag	1080
	gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccggtgctgga ctccgacggc 1200

5 tcttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgatgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtggcgccgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380

10 cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440

cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500

15 tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560

gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaacttaaga 1620

cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtctctg aactaaaggg atctgaaaca 1680

20 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740

attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 15

25 <211> 445

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

30 <223> DP47GS, HC (Fc «западина», P329G LALA)

<400> 15

35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 15

1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 30

20 25 30

40 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 45

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 60

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 80

65 70 75 80

50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr 110

100 105 110

55 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro 125

115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val 140

130 135 140

60 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala 160

145 150 155 160

65 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly 175

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly 190

180 185 190

	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
			195					200					205				
5	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
		210					215					220					
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
10	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245						250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
15				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		275						280					285				
20	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305				310						315					320	
25	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325						330					335		
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
30				340					345					350			
	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	
			355					360					365				
35	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
40	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				405					410					415			
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
45				420					425					430			
	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
			435					440					445				
50	<210> 16																
	<211> 1335																
	<212> ДНК																
	<213> Штучна послідовність																
55	<220>																
	<223> DP47GS, HC (Fc «западина», P329G LALA)																
	<400> 16																
60	gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc																
	tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct																
	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggttag cacatactac																
65	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat																
	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc																

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccctccgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacca gcggcgccac agccgctctg 420
 5 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480
 ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540
 10 agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc 720
 15 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 20 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 25 ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccgga atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 30 tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 35 ctgtctccgg gtaaa 1335
 <210> 17
 <211> 592
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2
 45 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 55 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 65 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

UA 120847 C2

	115					120					125					
5	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
	130						135					140				
10	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
	145					150					155					160
15	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				165						170					175	
20	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
				180					185					190		
25	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
			195					200					205			
30	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	210						215					220				
35	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
	225					230				235						240
40	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245						250					255	
45	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
			260					265					270			
50	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
			275					280					285			
55	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290						295					300				
60	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
	305				310					315						320
65	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335		
70	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340						345					350		
75	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	355						360					365				
80	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370						375				380					
85	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	385					390					395					400
90	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				405						410					415	
95	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			420						425				430			
100	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
			435					440				445				
105	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser
	450						455				460					
110	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu
	465					470					475					480

	Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr	
	485 490 495	
5	Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu	
	500 505 510	
	Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val	
	515 520 525	
10	Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu	
	530 535 540	
	Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr	
	545 550 555 560	
15	Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe	
	565 570 575	
20	Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr	
	580 585 590	
	<210> 18	
	<211> 1776	
	<212> ДНК	
25	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2	
30	<400> 18	
	gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
35	ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
40	ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
	ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
45	ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
	ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
	agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
50	aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
	actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc	720
55	ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
60	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
	gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
65	ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag	1080
	gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140

```

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtagctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
5 ttctcatgct ccgtagatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcgccgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
10 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
15 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaacttaaga 1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
20 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 19
<211> 215
25 <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

<220>
<223> DP47GS, LC
30 <400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
    20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
40          35          40          45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

45 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85          90          95
50 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
    100          105          110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
55          115          120          125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130          135          140

60 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145          150          155          160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165          170          175
65 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
    180          185          190

```

UA 120847 C2

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 5 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 20
 <211> 645
 <212> ДНК
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> DP47GS, LC
 15 <400> 20
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 20 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300
 25 cagggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 30 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 35 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645
 <210> 21
 <211> 466
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> злитий білок людський IL-2R-бета-Fc («западина»)
 45 <400> 21
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 50 Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
 20 25 30
 Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
 55 35 40 45
 Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
 50 55 60
 60 Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
 65 70 75 80
 Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
 85 90 95
 65 Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
 100 105 110

	Arg	Val	Met	Ala	Ile	Gln	Asp	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Asn	Leu	Arg	Leu	
			115					120					125				
5	Met	Ala	Pro	Ile	Ser	Leu	Gln	Val	Val	His	Val	Glu	Thr	His	Arg	Cys	
		130					135					140					
	Asn	Ile	Ser	Trp	Glu	Ile	Ser	Gln	Ala	Ser	His	Tyr	Phe	Glu	Arg	His	
	145					150					155					160	
10	Leu	Glu	Phe	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	His	Thr	Trp	Glu	Glu	
					165					170					175		
	Ala	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Glu	Trp	Ile	Cys	Leu	Glu	
15				180					185					190			
	Thr	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Gln	Tyr	Glu	Phe	Gln	Val	Arg	Val	Lys	Pro	
			195					200					205				
20	Leu	Gln	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Gln	Pro	Leu	Ala	
		210					215					220					
	Phe	Arg	Thr	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Thr	Gly	Ala	Gln	Asp	
	225					230					235					240	
25	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
					245					250					255		
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
30				260					265					270			
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
			275					280					285				
35	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		290					295					300					
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	305					310					315					320	
40	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
					325					330					335		
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
45				340					345					350			
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	
			355					360					365				
50	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
		370					375					380					
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	385					390					395					400	
55	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
					405					410					415		
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
60				420					425					430			
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
			435					440					445				
65	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		450					455					460					
	Gly	Lys															
	465																

	<210>	22	
	<211>	1401	
	<212>	ДНК	
5	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	злитий білок людський IL-2R-бета-Fc («западина»)	
10	<400>	22	
	atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc	60	
	agggtgtgcgg tgaatggcac ttcccagttc acatgcttct acaactcgag agccaacatc	120	
15	tcctgtgtct ggagccaaga tggggctctg caggacactt cctgccaaagt ccatgcctgg	180	
	ccggacagac ggcggtgga ccaaacctgt gagctgctcc ccgtgagtca agcatcctgg	240	
	gcctgcaacc tgatcctcgg agccccagat tctcagaaac tgaccacagt tgacatcgtc	300	
20	accctgaggg tgctgtgccg tgaggggggtg cgatggaggg tgatggccat ccaggacttc	360	
	aagccctttg agaaccttcg cctgatggcc cccatctccc tccaagttgt ccacgtggag	420	
25	accacagat gcaacataag ctgggaaatc tcccaagcct cccactactt tgaaagacac	480	
	ctggagttcg aggcccgac gctgtcccca ggccacacct gggaggaggc ccccctgctg	540	
	actctcaagc agaagcagga atggatctgc ctggagacgc tcaccccaga caccagtat	600	
30	gagtttcagg tgccgggtcaa gcctctgcaa ggcgagttca cgacctggag cccctggagc	660	
	cagcccctgg ccttcagaac aaagcctgca gcccttggga aggacaccgg agctcaggac	720	
35	aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	780	
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	840	
	gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900	
40	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960	
	gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1020	
45	aagggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1080	
	cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1140	
	caggtcagcc tctcgtgctg agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200	
50	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1260	
	ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1320	
55	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1380	
	tccctgtctc cgggtaaatg a	1401	
60	<210>	23	
	<211>	492	
	<212>	PRT	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
65	<223>	злитий білок людський IL-2R-гама-Fc («виступ»)	
	<400>	23	

	Met	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Pro	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Leu	
	1				5					10					15		
5	Pro	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Asn	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr	Pro	Asn	Gly	
				20					25					30			
	Asn	Glu	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Phe	Phe	Leu	Thr	Thr	Met	Pro	Thr	Asp	
			35					40					45				
10	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Gln	Cys	Phe	Val	
		50					55					60					
	Phe	Asn	Val	Glu	Tyr	Met	Asn	Cys	Thr	Trp	Asn	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	
	65					70					75					80	
15	Gln	Pro	Thr	Asn	Leu	Thr	Leu	His	Tyr	Trp	Tyr	Lys	Asn	Ser	Asp	Asn	
					85					90					95		
	Asp	Lys	Val	Gln	Lys	Cys	Ser	His	Tyr	Leu	Phe	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	
20				100					105					110			
	Ser	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln	Lys	Lys	Glu	Ile	His	Leu	Tyr	Gln	Thr	Phe	
			115					120					125				
25	Val	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Gln	
		130					135					140					
	Met	Leu	Lys	Leu	Gln	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Glu	Asn	Leu	
30						150					155					160	
	Thr	Leu	His	Lys	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Asn	Asn	
					165					170					175		
	Arg	Phe	Leu	Asn	His	Cys	Leu	Glu	His	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Thr	Asp	
35				180					185					190			
	Trp	Asp	His	Ser	Trp	Thr	Glu	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	His	Lys	Phe	
			195					200					205				
40	Ser	Leu	Pro	Ser	Val	Asp	Gly	Gln	Lys	Arg	Tyr	Thr	Phe	Arg	Val	Arg	
		210					215					220					
	Ser	Arg	Phe	Asn	Pro	Leu	Cys	Gly	Ser	Ala	Gln	His	Trp	Ser	Glu	Trp	
		225				230					235					240	
45	Ser	His	Pro	Ile	His	Trp	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Lys	Glu	Asn	Pro	Phe	
					245				250						255		
	Leu	Phe	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
50				260					265					270			
	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
			275					280					285				
55	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
			290				295					300					
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
		305				310					315					320	
60	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
					325					330					335		
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
65				340					345					350			
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
			355					360					365				

	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
	370 375 380	
5	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg	
	385 390 395 400	
	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly	
	405 410 415	
10	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
	420 425 430	
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
15	435 440 445	
	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
	450 455 460	
20	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
	465 470 475 480	
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	485 490	
25	<210> 24	
	<211> 1479	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> злитий білок людський IL-2R-гама-Fc («виступ»)	
	<400> 24	
35	atgttgaagc catcattacc attcacatcc ctcttattcc tgcagctgcc cctgctggga	60
	gtggggctga acacgacaat tctgacgccc aatgggaatg aagacaccac agctgatttc	120
	ttcctgacca ctatgccac tgactccctc agtggtttcca ctctgcccct cccagaggtt	180
40	cagtgttttg tgttcaatgt cgagtacatg aattgcactt ggaacagcag ctctgagccc	240
	cagcctacca acctcactct gcattattgg tacaagaact cggataatga taaagtccag	300
45	aagtgcagcc actatctatt ctctgaagaa atcacttctg gctgtcagtt gcaaaaaaag	360
	gagatccacc tctaccaaac atttgttggt cagctccagg acccacggga acccaggaga	420
	caggccacac agatgctaaa actgcagaat ctggtgatcc cctgggctcc agagaacct	480
50	acacttcaca aactgagtga atccagcta gaactgaact ggaacaacag attcttgaac	540
	cactgttttg agcacttggt gcagtaccgg actgactggg accacagctg gactgaacaa	600
55	tcagtggatt atagacataa gttctccttg cctagtgtgg atgggcagaa acgctacacg	660
	tttcgtgttc ggagccgctt taaccactc tgtggaagtg ctcagcattg gagtgaatgg	720
	agccacccaa tccactgggg gagcaatact tcaaagaga atcctttcct gtttgcattg	780
60	gaagccggag ctcaggacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	840
	gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	900
65	accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtgc	960
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	1020

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctgggtgaat 1080
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
 5 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1200
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tgggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1260
 10 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
 cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
 15 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479
 <210> 25
 <211> 219
 <212> PRT
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> альфа-субодиниця людського IL-2R + Avi-мітка + His-мітка
 25 <400> 25
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 30 Val His Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala
 20 25 30
 Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu
 35 35 40 45
 Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu
 50 55 60
 40 Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys
 65 70 75 80
 Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro
 85 90 95
 45 Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln
 100 105 110
 Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro
 115 120 125
 50 Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln
 130 135 140
 Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly
 55 145 150 155 160
 Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr
 165 170 175
 60 Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 65 195 200 205
 His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
 210 215

<210> 26
 <211> 660
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> альфа-субодиниця людського IL-2R + Avi-мітка + His-мітка

<400> 26

10 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60
 ctctgtgacg atgacccgcc agagatccca cagccacat tcaaagccat ggctacaag 120
 gaaggaacca tgttgaactg tgaatgcaag agagggttcc gcagaataaa aagcgggtca 180
 15 ctctatatgc tctgtacagg aaactctagc cactcgctcct gggaacca atgtcaatgc 240
 acaagctctg cactcgga cacaacgaaa caagtgcac ctcaacctga agaacagaaa 300
 20 gaaaggaataa ccacagaaat gcaaagtcca atgcagccag tggaccaagc gagccttcca 360
 ggtcactgca gggaacctcc accatgggaa aatgaagcca cagagagaat ttatcatttc 420
 25 gtggtggggc agatgggtta ttatcagtgc gtccagggat acagggtctt acacagaggt 480
 cctgctgaga gcgtctgcaa aatgaccac gggaagacaa ggtggacca gcccagctc 540
 atatgcacag gtgtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcaggcct gaacgacatc 600
 30 ttcgaggccc agaagatcga gtggcacgag gctcgagctc accaccatca ccatcactga 660

<210> 27
 <211> 473
 <212> PRT
 35 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> злитий білок мишачий IL-2R-бета-Fc («западина»)

40 <400> 27

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

45 Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Lys
 20 25 30

Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser
 35 40 45

50 Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val
 50 55 60

His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu Thr
 55 65 70 75 80

Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe
 85 90 95

60 Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val
 100 105 110

Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe
 115 120 125

65 His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser Leu Gln Val
 130 135 140

UA 120847 C2

	Leu	His	Ile	Asp	Thr	Gln	Arg	Cys	Asn	Ile	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
5	Val	Ser	His	Tyr	Ile	Glu	Pro	Tyr	Leu	Glu	Phe	Glu	Ala	Arg	Arg	Arg	
					165					170					175		
	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Trp	Glu	Asp	Ala	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Lys	Gln	
				180					185						190		
10	Arg	Gln	Gln	Trp	Leu	Phe	Leu	Glu	Met	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Ser	Tyr	
			195					200					205				
	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Val	Lys	Ala	Gln	Arg	Asn	Asn	Thr	Gly	Thr	Trp	
15		210					215					220					
	Ser	Pro	Trp	Ser	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe	Arg	Thr	Arg	Pro	Ala	Asp	Pro	
	225					230					235					240	
20	Met	Lys	Glu	Gly	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
					245					250					255		
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				260					265					270			
25	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			275					280					285				
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
30		290					295					300					
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	305					310					315					320	
35	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
					325					330					335		
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				340					345					350			
40	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			355					360					365				
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
45		370					375					380					
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	385					390					395					400	
50	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
				405					410						415		
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				420					425					430			
55	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
			435					440					445				
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
60		450					455					460					
	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	465					470											
65	<210>	28															
	<211>	1422															
	<212>	ДНК															
	<213>	Штучна послідовність															

<220>

<223> злитий білок мишачий IL-2R-бета-Fc («западина»)

<400> 28

5 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccctcctg 60
ctgctctggt tcccaggtgc caggtgtgca gtgaaaaact gttcccatct tgaatgcttc 120
10 tacaactcaa gagccaatgt ctcttgcatg tggagccatg aagaggctct gaatgtcaca 180
acctgccacg tccatgccaa gtcgaacctg cgacactgga acaaacctg tgagctaact 240
cttgtgaggc aggcacacct ggcctgcaac ctgatacctg ggtcggttccc agagtcccag 300
15 tcaactgacct ccgtggacct ccttgacata aatgtggtgt gctgggaaga gaagggttgg 360
cgtagggtaa agacctgcga cttccatccc tttgacaacc ttcgcctggt ggccctcat 420
20 tccctccaag ttctgcacat tgatacccag agatgtaaca taagctggaa ggtctcccag 480
gtctctcact acattgaacc atacttgaa tttgaggccc gtagacgtct tctggggcac 540
agctgggagg atgcatccgt attaagcctc aagcagagac agcagtggct cttcttgag 600
25 atgctgatcc ctagtacctc atatgaggtc caggtgaggg tcaaagctca acgaaacaat 660
accgggacct ggagtcctg gagccagccc ctgaccttcc ggacaaggcc agcagatccc 720
30 atgaaggagg gagctcagga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc 780
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 840
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900
35 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020
40 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gccccatcc 1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctctcgtgcg cagtcaaagg cttctatccc 1200
45 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctcgtga gcaagctcac cgtggacaag 1320
50 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1422

<210> 29

<211> 500

55 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> злитий білок мишачий IL-2R-гама-Fc («виступ»)

60

<400> 29

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
65 Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Trp Ser Ser
20 25 30

	Lys	Val	Leu	Met	Ser	Ser	Ala	Asn	Glu	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Leu	Ile	
			35					40					45				
5	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Pro	Glu	His	Leu	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu	
		50					55					60					
	Pro	Glu	Val	Gln	Cys	Phe	Val	Phe	Asn	Ile	Glu	Tyr	Met	Asn	Cys	Thr	
	65					70					75					80	
10	Trp	Asn	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Gln	Ala	Thr	Asn	Leu	Thr	Leu	His	Tyr	
					85					90					95		
	Arg	Tyr	Lys	Val	Ser	Asp	Asn	Asn	Thr	Phe	Gln	Glu	Cys	Ser	His	Tyr	
15				100					105					110			
	Leu	Phe	Ser	Lys	Glu	Ile	Thr	Ser	Gly	Cys	Gln	Ile	Gln	Lys	Glu	Asp	
			115					120					125				
20	Ile	Gln	Leu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Val	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Pro	Gln	Lys	
		130					135					140					
	Pro	Gln	Arg	Arg	Ala	Val	Gln	Lys	Leu	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Val	Ile	
	145					150				155						160	
25	Pro	Arg	Ala	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	
					165					170					175		
	Leu	Glu	Leu	Arg	Trp	Lys	Ser	Arg	His	Ile	Lys	Glu	Arg	Cys	Leu	Gln	
30				180					185					190			
	Tyr	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Ser	Asn	Arg	Asp	Arg	Ser	Trp	Thr	Glu	Leu	
			195					200					205				
	Ile	Val	Asn	His	Glu	Pro	Arg	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	
35			210				215					220					
	Lys	Arg	Tyr	Thr	Phe	Arg	Val	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ile	Cys	Gly	
	225					230					235					240	
40	Ser	Ser	Gln	Gln	Trp	Ser	Lys	Trp	Ser	Gln	Pro	Val	His	Trp	Gly	Ser	
					245					250					255		
	His	Thr	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Ser	Leu	Phe	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	
45				260					265					270			
	Gln	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
			275					280					285				
50	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
		290					295					300					
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
	305					310					315					320	
55	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
					325					330					335		
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
60				340					345					350			
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
			355					360					365				
65	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
		370					375					380					
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
	385					390					395					400	

	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	
	405 410 415	
5	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
	420 425 430	
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
	435 440 445	
10	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
	450 455 460	
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
15	465 470 475 480	
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
	485 490 495	
20	Ser Pro Gly Lys	
	500	
	<210> 30	
	<211> 1503	
25	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> злитий білок мишачий IL-2R-гама-Fc («виступ»)	
30	<400> 30	
	atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggctcctgc tgctctggtt cccctcctg	60
	ctgctctggt tcccaggtgc cagggtgttg agttccaagg tcctcatgtc cagtgcgaat	120
35	gaagacatca aagctgattt gatcctgact tctacagccc ctgaacacct cagtgtcct	180
	actctgcccc ttccagaggt tcagtgttt gtgttcaaca tagagtacat gaattgcaat	240
40	tggaaatagca gttctgagcc tcaggcaacc aacctcacgc tgcactatag gtacaaggta	300
	tctgataata atacattcca ggagtgcagt cactatttgt tctccaaaga gattacttct	360
	ggctgtcaga taaaaaaga agatatccag ctctaccaga catttggtgt ccagctccag	420
45	gacccccaga aacccagag gcgagctgta cagaagctaa acctacagaa tcttgtgatc	480
	ccacgggctc cagaaaatct aacactcagc aatctgagt aatcccagct agagctgaga	540
50	tggaaaagca gacatattaa agaacgctgt ttacaatact tgggtgcagta ccggagcaac	600
	agagatcgaa gctggacgga actaatagt aatcatgaac ctagattctc cctgcctagt	660
	gtggatgagc tgaaacggta cacatttcgg gttcggagcc gctataacct aatctgtgga	720
55	agttctcaac agtggagtaa atggagccag cctgtccact gggggagtca tactgtagag	780
	gagaatcctt ccttgtttgc actggaagct ggagctcagg aaaaaactca cacatgccca	840
60	ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacct	900
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc	960
	cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
65	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	1080
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	1140

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgtggtgc 1260

5 ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

10 agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500

tga 1503

15 <210> 31
<211> 213
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> альфа субодиниця мишачого IL-2R + Avi-мітка + His-мітка

<400> 31

25 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

30 Val His Ser Glu Leu Cys Leu Tyr Asp Pro Pro Glu Val Pro Asn Ala
20 25 30

Thr Phe Lys Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Ile Leu Asn Cys Glu
35 40 45

35 Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Leu Lys Glu Leu Val Tyr Met Arg Cys
50 55 60

Leu Gly Asn Ser Trp Ser Ser Asn Cys Gln Cys Thr Ser Asn Ser His
65 70 75 80

40 Asp Lys Ser Arg Lys Gln Val Thr Ala Gln Leu Glu His Gln Lys Glu
85 90 95

Gln Gln Thr Thr Thr Asp Met Gln Lys Pro Thr Gln Ser Met His Gln
100 105 110

45 Glu Asn Leu Thr Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Lys His Glu
115 120 125

50 Asp Ser Lys Arg Ile Tyr His Phe Val Glu Gly Gln Ser Val His Tyr
130 135 140

Glu Cys Ile Pro Gly Tyr Lys Ala Leu Gln Arg Gly Pro Ala Ile Ser
145 150 155 160

55 Ile Cys Lys Met Lys Cys Gly Lys Thr Gly Trp Thr Gln Pro Gln Leu
165 170 175

Thr Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn
180 185 190

60 Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His
195 200 205

65 His His His His His
210

<210> 32

<211> 642
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> альфа-субодиниця мишачого IL-2R + Avi-мітка + His-мітка

<400> 32

10 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgaa 60
 ctgtgtctgt atgacccacc cgagggtccc aatgccacat tcaaagccct ctctacaag 120
 aacggcacca tcctaaactg tgaatgcaag agagggttcc gaagactaaa ggaattggtc 180
 15 tatatgcgtt gcttaggaaa ctctggagc agcaactgcc agtgcaccag caactcccat 240
 gacaaatcga gaaagcaagt tacagctcaa cttgaacacc agaaagagca acaaaccaca 300
 acagacatgc agaagccaac acagtctatg caccaagaga accttacagg tactgcagg 360
 20 gagccacctc cttggaaca tgaagattcc aagagaatct atcatttcgt ggaaggacag 420
 agtgttcact acgagtgtat tccgggatac aaggctctac agagaggtcc tgctattagc 480
 25 atctgcaaga tgaagtgtgg gaaaacgggg tggactcagc ccagctcac atgtgtcgac 540
 gaacagttat attttcaggg cggtcaggc ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatc 600
 gagtggcacg aggtctgagc tcaccacat caccatcact ga 642

<210> 33
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> злитий білок IL-2R (циномолгус)-Fc(«виступ») + Avi-мітка

<400> 33

40 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

45 Val His Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Phe Tyr Asn
 20 25 30

Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln
 35 40 45

50 Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn
 50 55 60

Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn
 65 70 75 80

55 Leu Ile Leu Gly Thr Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Ala Val Asp Ile
 85 90 95

60 Val Thr Leu Arg Val Met Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Met Met
 100 105 110

Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro
 115 120 125

65 Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser
 130 135 140

Trp Lys Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe

	145		150		155		160									
	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	His	Thr	Trp	Glu	Glu	Ala	Pro	Leu
					165					170					175	
5	Met	Thr	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Glu	Trp	Ile	Cys	Leu	Glu	Thr	Leu	Thr
				180					185					190		
10	Pro	Asp	Thr	Gln	Tyr	Glu	Phe	Gln	Val	Arg	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Gly
			195					200					205			
	Glu	Phe	Thr	Thr	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Gln	Pro	Leu	Ala	Phe	Arg	Thr
		210					215					220				
15	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Thr	Gly	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	His
	225					230					235					240
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
					245					250					255	
20	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
25			275					280					285			
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		290					295					300				
30	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	305					310					315					320
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
					325					330					335	
35	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				340					345					350		
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
40			355					360					365			
	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu
		370					375					380				
45	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	385					390					395					400
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
					405					410					415	
50	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				420					425					430		
	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
55			435					440					445			
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser
		450					455					460				
60	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	Glu
	465					470					475					480
	<210>	34														
	<211>	1443														
65	<212>	ДНК														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															

<223> злитий білок IL-2R-бета (циномолгус)-Fc («виступ») + Avi-мітка

<400> 34

5 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgcg 60

gtcaacggca cttcccgggtt cacatgcttc tacaactcga gagccaacat ctctgtgttc 120

tggagccaag atggggctct gcaggacact tcctgccaaag tccacgcctg gccggacaga 180

10 cggcgggtgga accaaacctg tgagctgctc cctgtgagtc aagcatcctg ggcttgcaac 240

ctgatcctcg gaaccccgaga ttctcagaaa ctgaccgcag tggatatcgt caccctgagg 300

gtgatgtgcc gtgaaggggt gcgatggagg atgatggcca tccaggactt caaacccctt 360

15 gagaaccttc gcctgatggc ccccatctcc ctccaagtcg tccacgtgga gaccacaga 420

tgcaacataa gctggaaaat ctccaagcc tcccactact ttgaaagaca cctggagttt 480

20 gaggcccgga cgctgtcccc aggccacacc tgggaggagg cccccctgat gacctcaag 540

cagaagcagg aatggatctg cctggagacg ctacccccag acaccagta tgagtctcag 600

gtgcggttca agcctctgca aggcgagttc acgacctgga gcccctggag ccagcccctg 660

25 gccttcagga caaagcctgc agcccttggg aaggacaccg gagctcagga caaaactcac 720

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 780

30 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg 840

gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960

35 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020

aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080

40 gaaccacagg tgtacacct gcccccatgc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140

ctgtggtgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200

gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggtccttc 1260

45 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320

tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380

50 ccgggtaaatt ccggaggcct gaacgacatc ttcgaggccc agaagattga atggcacgag 1440

tga 1443

<210> 35

55 <211> 489

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

60 <223> злитий білок IL-2R-гама (циномолгус)-Fc («западина»)

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

65 1 5 10 15

Val His Ser Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp

20 25 30

	Ala	Thr	Thr	Asp	Phe	Phe	Leu	Thr	Ser	Met	Pro	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	
			35					40					45				
5	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Gln	Cys	Phe	Val	Phe	Asn	Val	
		50					55					60					
	Glu	Tyr	Met	Asn	Cys	Thr	Trp	Asn	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Gln	Pro	Thr	
	65					70					75					80	
10	Asn	Leu	Thr	Leu	His	Tyr	Trp	Tyr	Lys	Asn	Ser	Asp	Asn	Asp	Lys	Val	
					85					90					95		
	Gln	Lys	Cys	Ser	His	Tyr	Leu	Phe	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	Ser	Gly	Cys	
15				100					105					110			
	Gln	Leu	Gln	Lys	Lys	Glu	Ile	His	Leu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Val	Val	Gln	
			115					120					125				
20	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Gln	Met	Leu	Lys	
		130					135					140					
	Leu	Gln	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu	Arg	
25	145					150					155					160	
	Lys	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Asn	Asn	Arg	Phe	Leu	
					165					170					175		
	Asn	His	Cys	Leu	Glu	His	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Thr	Asp	Trp	Asp	His	
30				180					185					190			
	Ser	Trp	Thr	Glu	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	His	Lys	Phe	Ser	Leu	Pro	
			195					200					205				
35	Ser	Val	Asp	Gly	Gln	Lys	Arg	Tyr	Thr	Phe	Arg	Val	Arg	Ser	Arg	Phe	
		210					215					220					
	Asn	Pro	Leu	Cys	Gly	Ser	Ala	Gln	His	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	His	Pro	
40	225					230					235					240	
	Ile	His	Trp	Gly	Ser	Asn	Ser	Ser	Lys	Glu	Asn	Pro	Phe	Leu	Phe	Ala	
					245					250					255		
45	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
				260					265					270			
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
			275					280					285				
50	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
		290					295					300					
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
55	305					310					315					320	
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
					325					330					335		
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
60				340					345					350			
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
			355					360					365				
65	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
		370					375					380					
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	

	385		390		395		400
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro						
		405			410		415
5	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn						
		420			425		430
10	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu						
		435			440		445
	Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val						
		450			455		460
15	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln						
		465			470		475
							480
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys						
		485					
20	<210> 36						
	<211> 1470						
	<212> ДНК						
	<213> Штучна послідовність						
25	<220>						
	<223> злитий білок IL-2R-гама (циномолгус)-Fc («западина»)						
	<400> 36						
30	atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccctg						60
	aacacgacaa ttctgacgcc caatgggaat gaagacgcca caactgattt cttcctgacc						120
35	tctatgcccc ctgactccct cagtgtttcc actctgcccc tcccagaggt tcagtgtttt						180
	gtgttcaatg tcgagtacat gaattgcact tggaacagca gctctgagcc ccagcctacc						240
	aacctcactc tgcattattg gtacaagaat tcggataatg ataaagtcca gaagtgcagc						300
40	cactatctat tctctgaaga aatcacttct ggctgtcagt tgcaaaaaaa ggagatccac						360
	ctctacaaaa cgtttggtgt tcagctccag gaccacggg aaccagag acaggccaca						420
45	cagatgctaa aactgcagaa tctgggtgat ccctgggctc cggagaaacct aacacttcgc						480
	aaactgagtg aatcccagct agaactgaac tggaacaaca gattcttgaa ccaactgtttg						540
	gagcacttgg tgcagtaccg gactgactgg gaccacagct ggactgaaca atcagtggat						600
50	tatagacata agttctcctt gcctagtgtg gatgggcaga aacgctacac gtttcgtgtc						660
	cggagccgct ttaaccact ctgtggaagt gctcagcatt ggagtgaatg gagccacca						720
55	atccactggg ggagcaatag ttcaaaagag aatcctttcc tgtttgcatt ggaagccgga						780
	gctcaggaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg						840
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag						900
60	gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac						960
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc						1020
65	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag						1080
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa						1140
	gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg						1200

accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1320
 5 gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
 10 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1470
 <210> 37
 <211> 217
 <212> PRT
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> альфа-субодиниця IL-2R (циномолгус) + Avi-мітка + His-мітка
 20 <400> 37
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Lys Ile Thr His Ala Thr Phe Lys
 20 25 30
 Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
 35 35 40 45
 30 Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Pro Tyr Met Leu Cys Thr Gly
 50 55 60
 Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
 35 65 70 75 80
 Ala Ala Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
 85 90 95
 40 Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Gln Met Gln Leu Ala Asp
 100 105 110
 Gln Val Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
 115 120 125
 45 Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Thr Val Tyr
 130 135 140
 Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
 50 145 150 155 160
 Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
 165 170 175
 55 Leu Ile Cys Thr Gly Glu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
 180 185 190
 Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 195 200 205
 60 Ala Arg Ala His His His His His His
 210 215
 <210> 38
 65 <211> 654
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> альфа-субодиниця IL-2R циномолгус + Avi-мітка + His-мітка

<400> 38
 5 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtga gctctgtgac 60
 gatgacccgc caaaaatcac acatgccaca ttcaaagcca tggcctacaa ggaaggaacc 120
 atgttgaact gtgaatgcaa gagaggtttc cgcagaataa aaagcgggtc accctatatg 180
 10 ctctgtacag gaaactctag ccaactcgtcc tgggacaacc aatgtcaatg cacaagctct 240
 gctgctcgga acacaacaaa acaagtgcaca cctcaacctg aagaacagaa agaaagaaaa 300
 15 accacagaaa tgcaaagtca aatgcagctg gcggaccaag tgagccttcc aggtcactgc 360
 agggaacctc caccgtggga aaatgaagcc acagaaagaa tttatcattt cgtgggtggg 420
 cagacggttt actaccagtg cgtccaggga tacagggtc tacacagagg tcctgtgag 480
 20 agcgtctgca aaatgaccca cgggaagaca agatggaccc agccccagct catatgcaca 540
 ggtgaagtcg acgaacagtt atattttcag ggcggctcag gcctgaacga catcttcgag 600
 25 gcccagaaga tcgagtggca cgaggctcga gctcaccacc atcaccatca ctga 654

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 30 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> лідерна послідовність

35 <400> 39
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 40 Ala His Ser

<210> 40
 <211> 57
 45 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> лідерна послідовність

50 <400> 40
 atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 41
 <211> 57
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> лідерна послідовність

60 <400> 41
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

65 <210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність


```

<220>
<223> лідерна послідовність

5 <400> 42

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

10 Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 43
<211> 66
15 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> лідерна послідовність
20

<400> 43
atggacatga ggggtccscgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

25 <210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
30

<220>
<223> лідерна послідовність

<400> 44
35 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser
40

<210> 45
<211> 57
45 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> лідерна послідовність

50 <400> 45
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

<210> 46
<211> 57
55 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> лідерна послідовність
60

<400> 46
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaactggagt gcattcc 57

65 <210> 47
<211> 57
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

<220>
 <223> лідерна послідовність

<400> 47
 5 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 48
 <211> 592
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DP47GS, HC (Fc «виступ», P329G LALA)-IL2 N88D

15 <400> 48

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

25 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

40 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

50 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

55 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

65 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

UA 120847 C2

	275							280					285				
5	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	290						295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
10	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	
				340					345					350			
15	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360					365				
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					
20	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					405					410					415		
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				420					425					430			
30	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			435					440					445				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	
		450					455					460					
35	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	
	465					470					475					480	
	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	
					485					490					495		
	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	
				500					505					510			
45	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	
			515					520					525				
	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	
		530					535					540					
50	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	
	545					550					555					560	
	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	
					565					570					575		
	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	
				580					585					590			
60	<210>	49															
	<211>	1776															
	<212>	ДНК															
	<213>	Штучна послідовність															
65	<220>																
	<223>	DP47GS, HC (Fc «виступ»,P329G LALA)-IL2 N88D															
	<400>	49															

	gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120
5	ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
10	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
	ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
	ccatcggtct tccccctggc accctctctc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
15	ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
	ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
20	agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
	aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
	actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc	720
25	ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
30	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	960
	gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
35	ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag	1080
	gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
40	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
	tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
45	ctgtctccgg gtggcgcgga aggctccgga ggcgagggtt ctggaggcgg aggctccgca	1380
	cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta	1440
50	cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca	1500
	tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa	1560
	gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaactaaga	1620
55	cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca	1680
	acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg	1740
60	attacctttg cccaagcat catctcaaca ctgact	1776
	<210> 50	
	<211> 592	
	<212> PRT	
	<213> Штучна послідовність	
65	<220>	
	<223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA) -IL2 N88D	

<400> 50

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
10			35					40					45				
	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
15	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
20	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
25				115				120					125				
	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
		130					135					140					
30	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165				170						175		
35	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180					185					190			
	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
40			195					200					205				
	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
		210					215					220					
45	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
50	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
55			275					280					285				
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
60	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
65	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

5 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

10 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

15 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
435 440 445

20 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

25 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

30 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

35 Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

40 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

45 <210> 51
<211> 1776
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA) -IL2 N88D

<400> 51

55 gaggtgcaat tgttgagatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
60 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
65 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcgggcctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 5 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccacacgtg cccagcacct gaagctgcag ggggacgctc agtcttccctc 720
 10 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg 840
 15 gaggtgcata atgccaagac aaagccgctg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 20 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcgt acatcgccgt ggagtgggag 1140
 25 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgctc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 30 ctgtctccgg gtggcgccgg aggtccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggtccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 35 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 ttttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaacttaaga 1620
 40 cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagtctctg aactaaaggg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 45 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 52

<211> 592

<212> PRT

50 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A

55 <400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

60 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

65 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
5	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	100	105	110	
10	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	115	120	125	
	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	130	135	140	
15	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	145	150	155	160
	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	165	170	175	
20	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	180	185	190	
	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	195	200	205	
	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	210	215	220	
30	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255	
35	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	260	265	270	
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285	
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300	
45	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315	320
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335	
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350	
55	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365	
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	370	375	380	
60	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	385	390	395	400
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	405	410	415	
65	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	420	425	430	

	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly	
	435 440 445	
5	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser	
	450 455 460	
	Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu	
	465 470 475 480	
10	Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr	
	485 490 495	
	Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu	
15	500 505 510	
	Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val	
	515 520 525	
20	Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu	
	530 535 540	
	Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Pro Leu Lys Gly Ser Glu Thr	
	545 550 555 560	
25	Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe	
	565 570 575	
	Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr	
30	580 585 590	
	<210> 53	
	<211> 1776	
	<212> ДНК	
35	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> DP47GS, HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A	
40	<400> 53	
	gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120
45	ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
50	ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
	ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
55	ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc	480
	ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
	agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
60	aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa	660
	actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc	720
65	ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg	840

	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgtaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
5	gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
	ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc ccatcccggtg atgagctgac caagaaccag	1080
10	gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
	tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
15	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
	ctgtctccgg gtggcggcgg aggtccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggtccgca	1380
20	cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta	1440
	cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca	1500
	tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa	1560
25	gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tactttaaga	1620
	cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtctctg cactaaaggg atctgaaaca	1680
30	acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg	1740
	attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact	1776
35	<210> 54 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> прями́й праймер для FOXP3 <400> 54 tgtaaaacga cggccagttt tagaagttgt atgggggatg tt	42
45	<210> 55 <211> 44 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
50	<220> <223> зворотний праймер для FOXP3 <400> 55 caggaacag ctatgaccaa aatatctacc ctcttctctt cctc	44
55	<210> 56 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
60	<220> <223> прями́й праймер для CTLA-4 <400> 56 tgtaaaacga cggccagtgg gtttggttat gaaggagtat ga	42
65	<210> 57 <211> 45 <212> ДНК	

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> зворотний праймер для CTLA-4

5

<400> 57
caggaacag ctatgacctt cacttaattt ccactaaaaa taccc 45

<210> 58

10 <211> 133
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 58

20 Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

25 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

30 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

35 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

40 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

45

<210> 59

<211> 399

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

50

<220>

<223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 59

55 gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60

ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120

acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180

60 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240

agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300

65 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360

tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399

<210> 60
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> IL-2 N88D
 <400> 60
 10
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 15 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 20 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 25 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 30 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 35 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 61
 <211> 399
 40 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> IL-2 N88D
 45 <400> 61
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
 55 agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact 399
 60
 <210> 62
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 65 <220>
 <223> IL-2 N88D C125A

<400> 62

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

5 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

10 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

15 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

20 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

25 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

30 <210> 63
<211> 399
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> IL-2 N88D C125A

<400> 63
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60

40 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120

acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180

45 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240

agacccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300

acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360

50 tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399

<210> 64
<211> 133
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> IL-2 N88D T3A

60 <400> 64

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

65 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

5 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

10 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

15 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

20

<210> 65
 <211> 399
 <212> ДНК
 25 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A

30 <400> 65
 gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 35 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcata aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
 agaccacagg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 40 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact 399

45 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> (G4S)3 лінкер
 <400> 66

55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

60 1. Злитий білок, що містить: (I) молекулу імуноглобуліну, яка не має здатності специфічно зв'язуватися з антигеном, і (II) дві мутантні молекули інтерлейкіну-2 (IL-2), які містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора 1L-2, який має проміжну афінність, у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, причому зазначені мутантні молекули IL-2 містять послідовність SEQ ID NO: 58.

65 2. Злитий білок за п. 1, в якому зазначена молекула імуноглобуліну являє собою молекулу імуноглобуліну IgG-класу, переважно молекулу імуноглобуліну IgG₁-підкласу.

3. Злитий білок за п. 1 або п. 2, в якому зазначена молекула імуноглобуліну являє собою людську молекулу імуноглобуліну.
4. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vh3-23.
5. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 9.
6. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга, основою якого є послідовність людської зародкової лінії Vk3-20.
7. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 11.
8. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить модифікацію, яка знижує афінність зв'язування молекули імуноглобуліну з Fc-рецептором у порівнянні з відповідною молекулою імуноглобуліну без зазначеної модифікації.
9. Злитий білок за п. 8, де зазначений Fc-рецептор являє собою Fc γ -рецептор, зокрема людський Fc γ -рецептор.
10. Злитий білок за п. 8 або п. 9, де зазначений Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор.
11. Злитий білок за одним з пп. 8-10, де зазначений Fc-рецептор вибраний з групи, яка містить Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) і Fc α RI (CD89).
12. Злитий білок за одним з пп. 8-11, де зазначений Fc-рецептор являє собою Fc γ RIIIa, насамперед людський Fc γ RIIIa.
13. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотну заміну в положенні 329 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну.
14. Злитий білок за п. 13, в якому зазначена амінокислотна заміна являє собою P329G.
15. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни в положеннях 234 і 235 (EU-нумерація) важких ланцюгів імуноглобуліну.
16. Злитий білок за п. 15, в якому зазначені амінокислотні заміни являють собою L234A і L235A (LALA).
17. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому зазначена молекула імуноглобуліну містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G (EU-нумерація) у важких ланцюгах імуноглобуліну.
18. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому кожна із зазначених мутантних молекул IL-2 злита на своїй N-кінцевій амінокислоті з C-кінцевою амінокислотою одного з імуноглобулінових важких ланцюгів зазначеної молекули імуноглобуліну, необов'язково через пептидний лінкер.
19. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, в якому кожна із зазначених мутантних молекул IL-2 злита із зазначеною молекулою імуноглобуліну через пептидний лінкер.
20. Злитий білок за п. 19, в якому зазначений пептидний лінкер містить щонайменше 10, зокрема щонайменше 15 амінокислот.
21. Злитий білок за п. 19 або п. 20, в якому зазначений пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).
22. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, де злитий білок містить поліпептидні послідовності SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 50.
23. Злитий білок за одним з попередніх пунктів, де зазначений злитий білок вибірково активує регуляторні Т-клітини.
24. Полінуклеотид, що кодує злитий білок за одним з попередніх пунктів.
25. Вектор, зокрема експресійний вектор, що містить полінуклеотид за п. 24.
26. Клітина-хазяїн, що містить полінуклеотид за п. 24 або вектор за п. 25.
27. Спосіб одержання злитого білка, який містить молекулу імуноглобуліну і дві мутантні молекули IL-2, які містять амінокислотну мутацію, яка знижує афінність мутантної молекули IL-2 до рецептора IL-2, який має проміжну афінність у порівнянні з молекулою IL-2 дикого типу, що містить стадії, на яких (I) культивують клітину-хазяїна за п. 26 в умовах, придатних для експресії злитого білка, і (II) виділяють злитий білок.
28. Злитий білок, одержаний способом за п. 27.
29. Фармацевтична композиція, що містить злитий білок за одним з пп. 1-23 або п. 28 і фармацевтично прийнятний носій.

30. Злитий білок за одним з пп. 1-23 або п. 28 або фармацевтична композиція за п. 29, призначений/призначена для застосування як лікарського засобу.

31. Злитий білок за одним з пп. 1-23 або п. 28 або фармацевтична композиція за п. 29, призначений/призначена для застосування для лікування або профілактики аутоімунного захворювання.

32. Злитий білок або фармацевтична композиція за п. 31, де зазначене аутоімунне захворювання вибране з групи, що містить діабет типу 1, системний червоний вовчак, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, неспецифічний виразковий коліт і розсіяний склероз.

33. Злитий білок за одним з пп. 1-23 або п. 28 або фармацевтична композиція за п. 29, призначений/призначена для застосування для лікування або профілактики відторгнення трансплантату або реакції "трансплантат проти хазяїна".

34. Злитий білок за одним з пп. 1-23 або п. 28, призначений для застосування для вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

35. Злитий білок за п. 34, в якому зазначена активація охоплює індукцію проліферації регуляторних Т-клітин і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор в регуляторних Т-клітинах.

36. Спосіб вибіркової активації регуляторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo*, що містить контактування зазначених регуляторних Т-клітин зі злитим білком за одним з пп. 1-23 або п. 28.

37. Спосіб за п. 36, в якому зазначена активація охоплює індукцію проліферації регуляторних Т-клітин і/або індукцію передачі сигналів через IL-2-рецептор в регуляторних Т-клітинах.

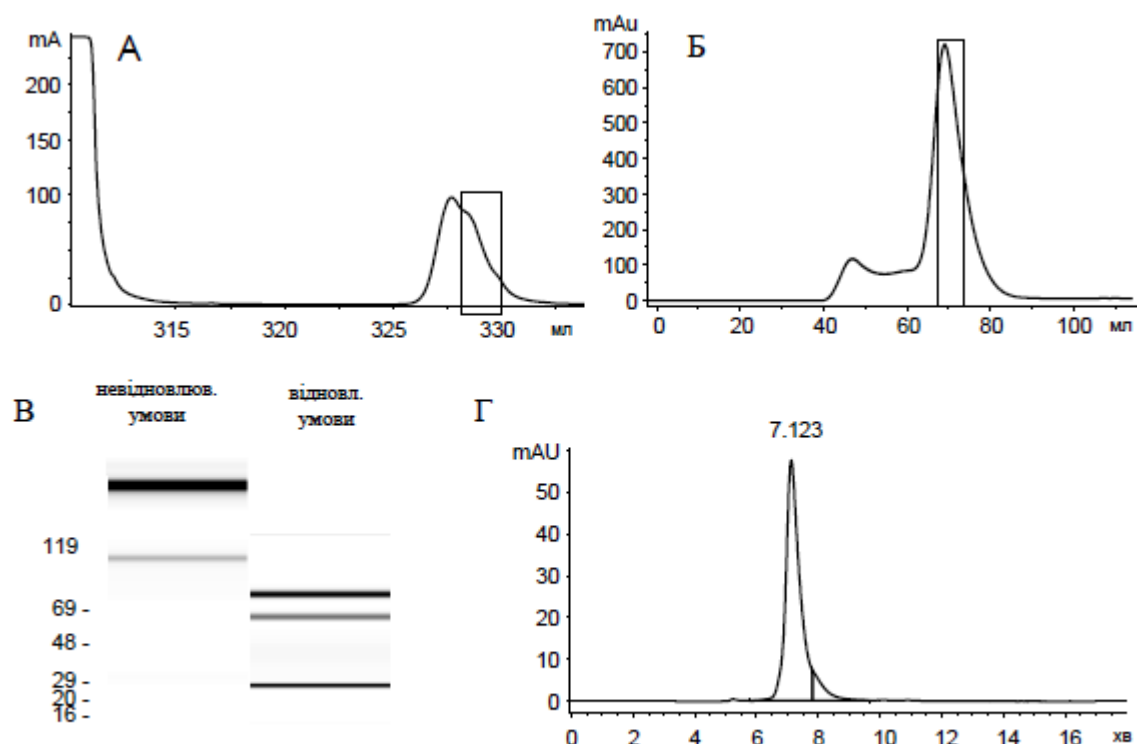
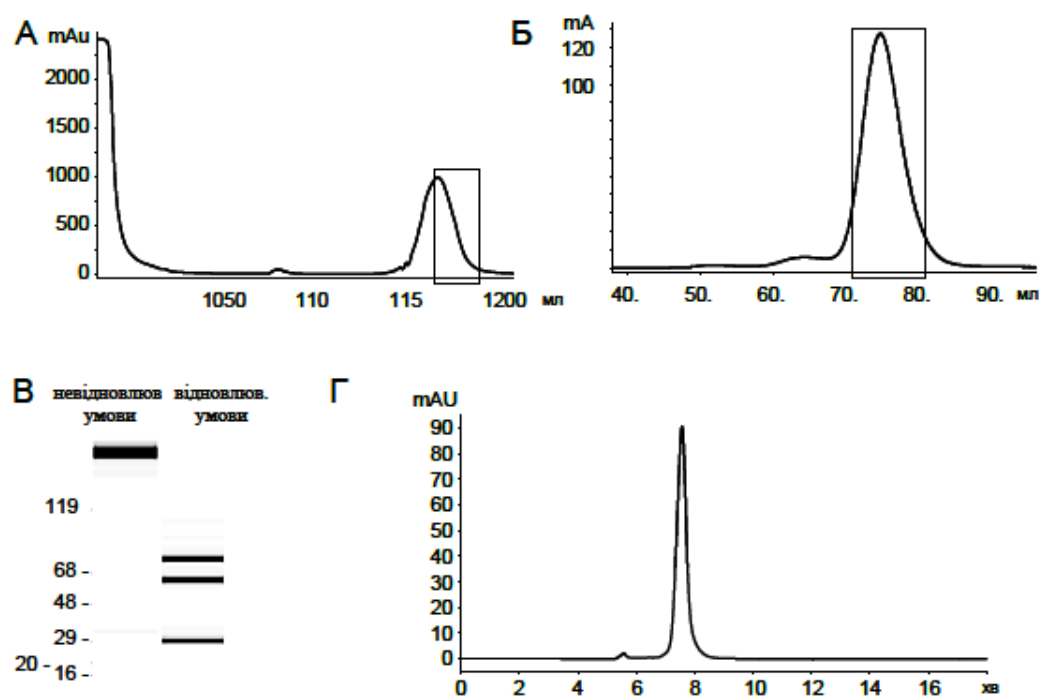
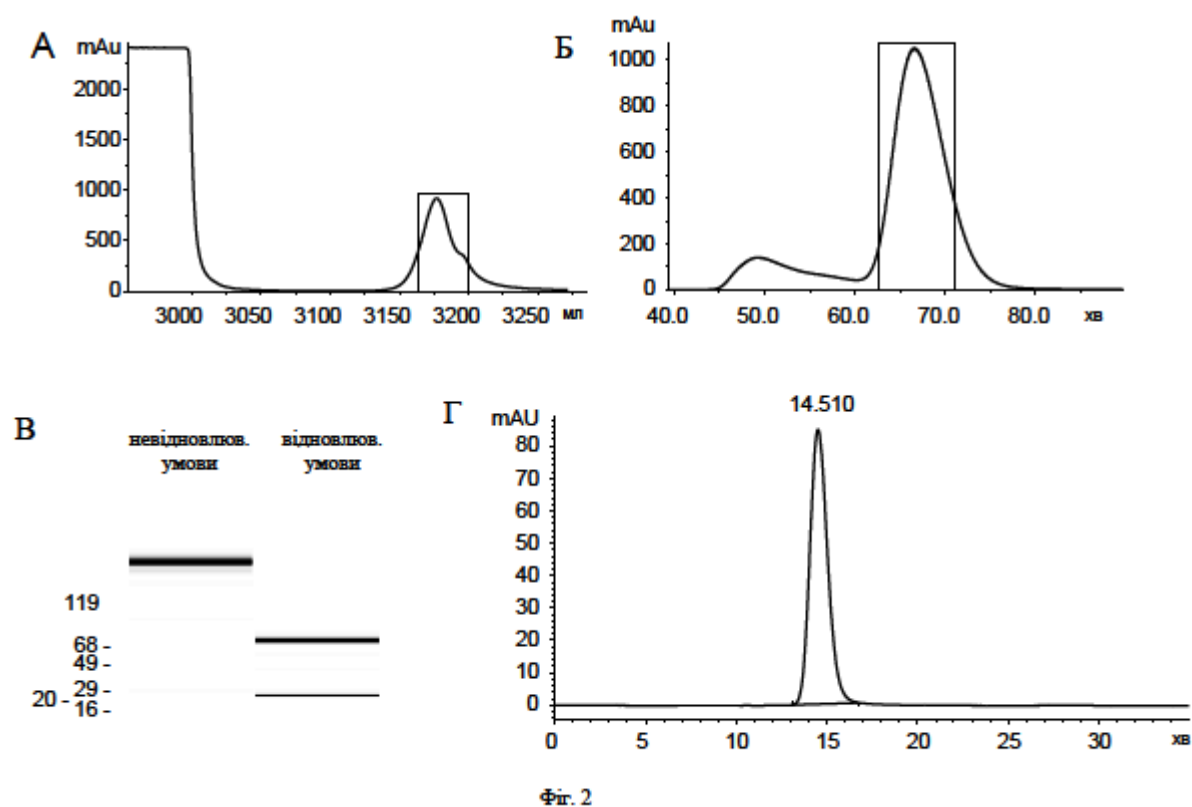
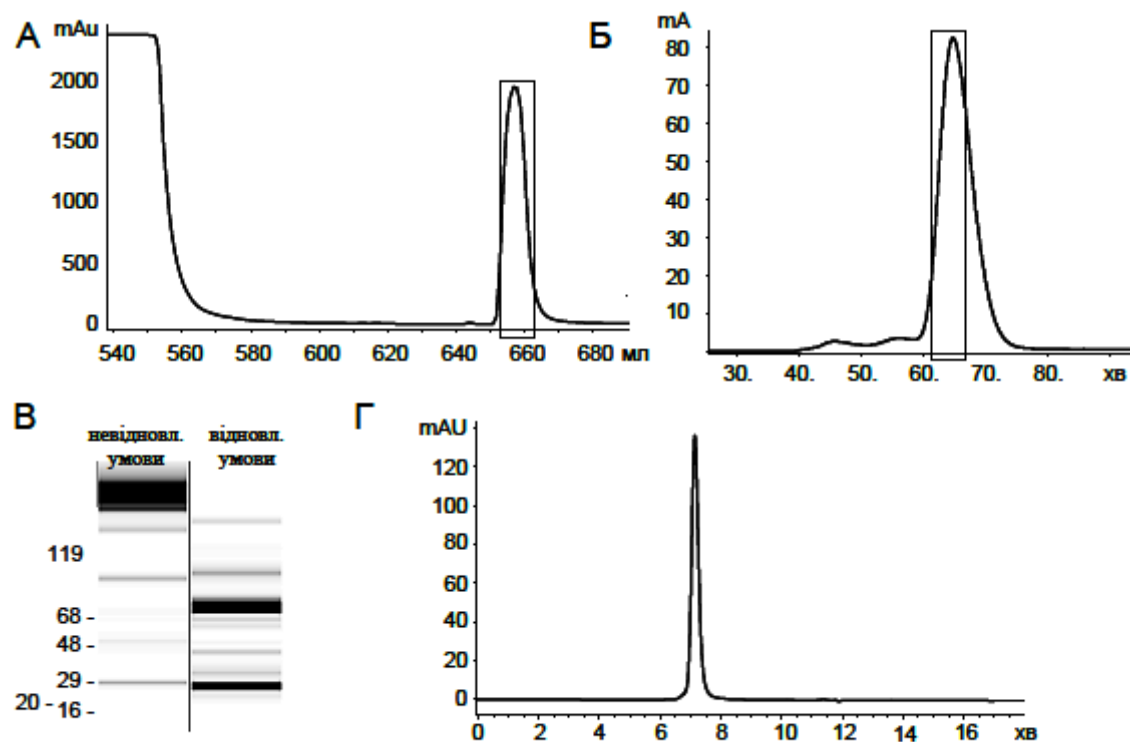
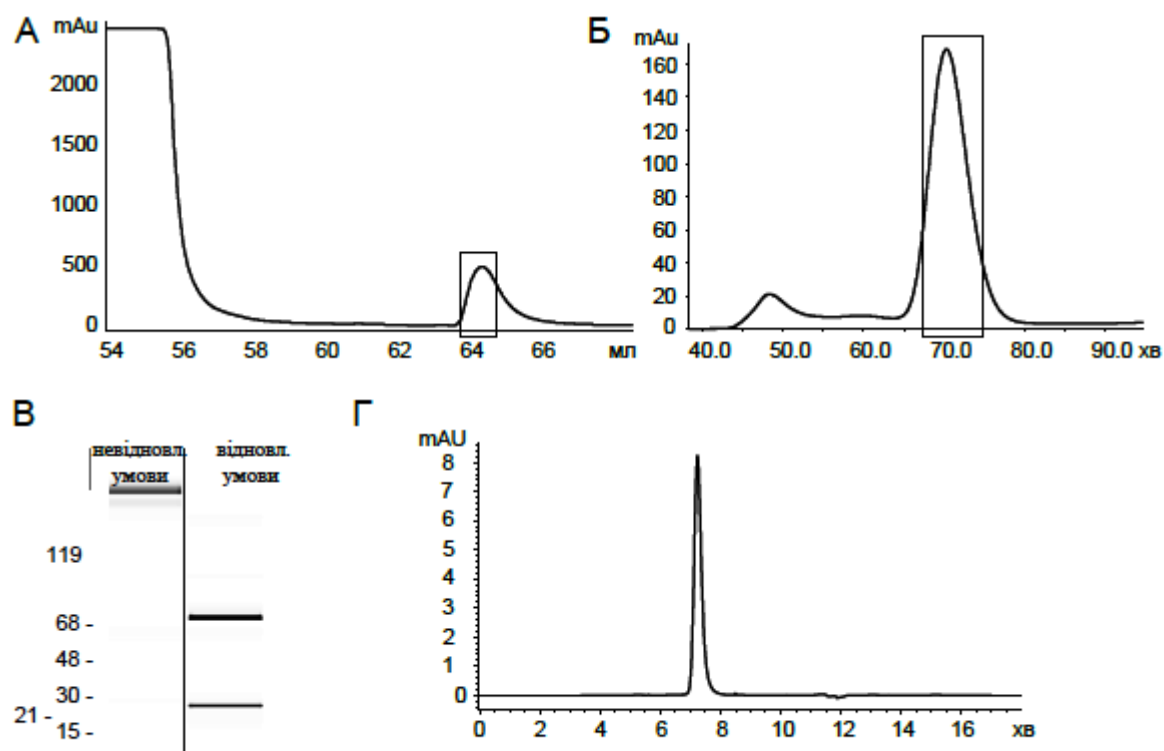


Fig. 1

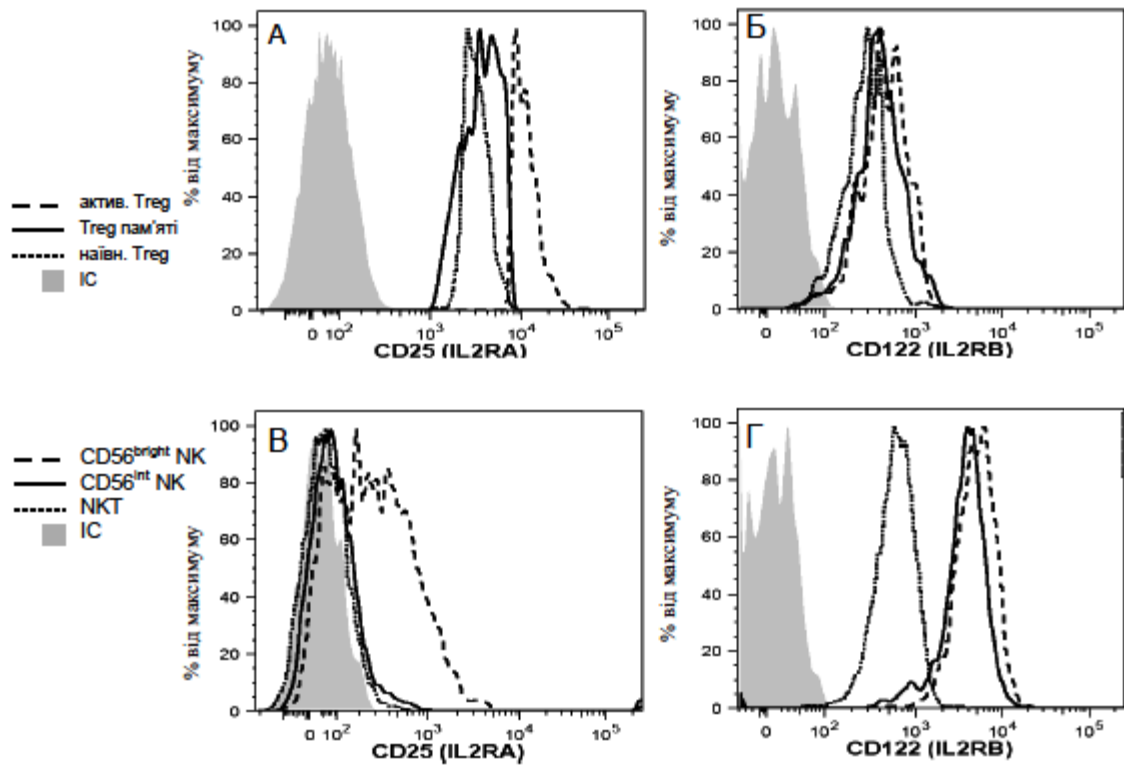




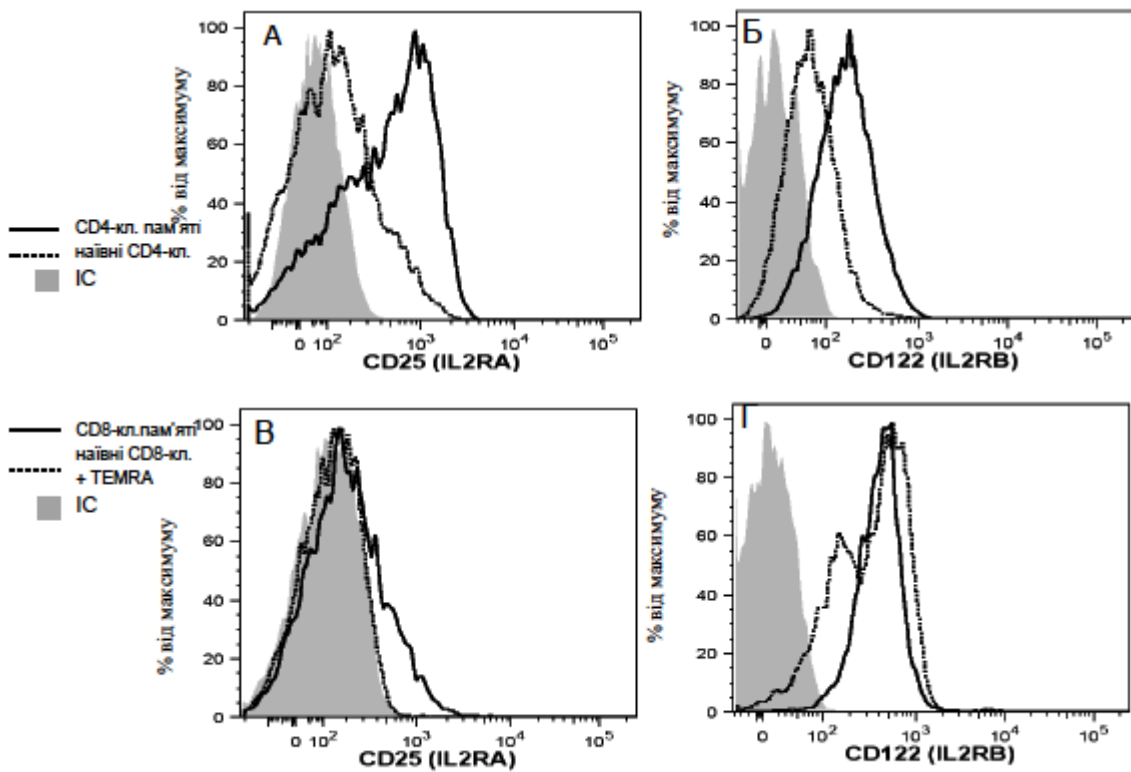
Фіг. 4



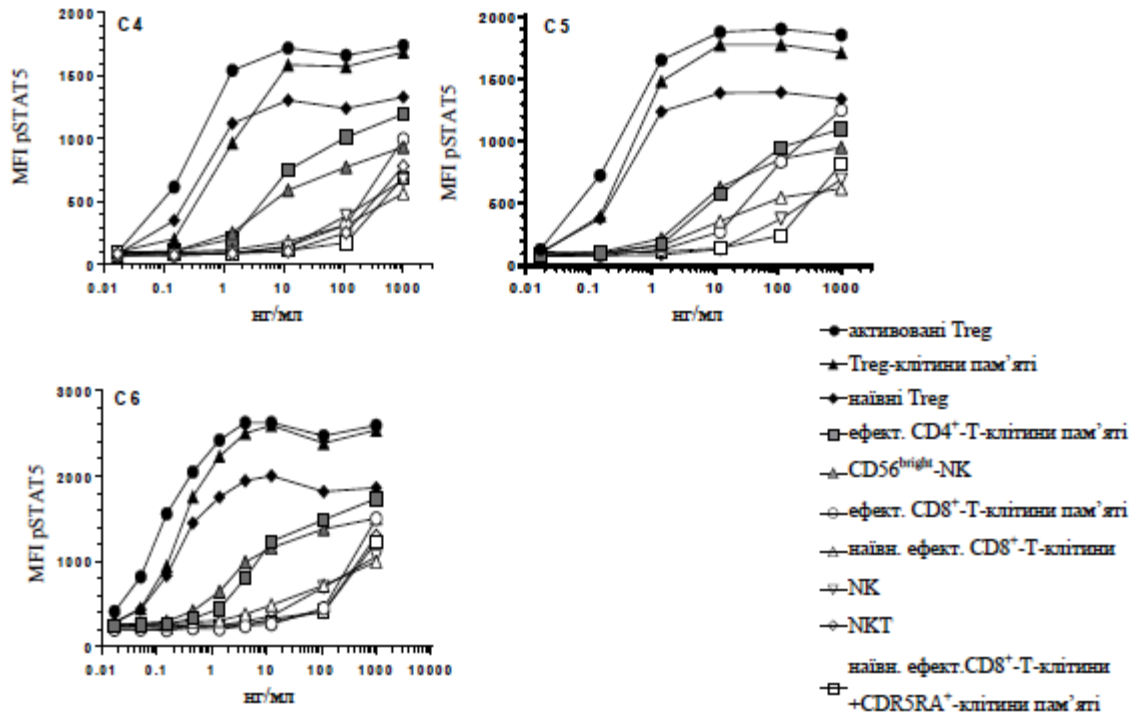
Фіг. 5



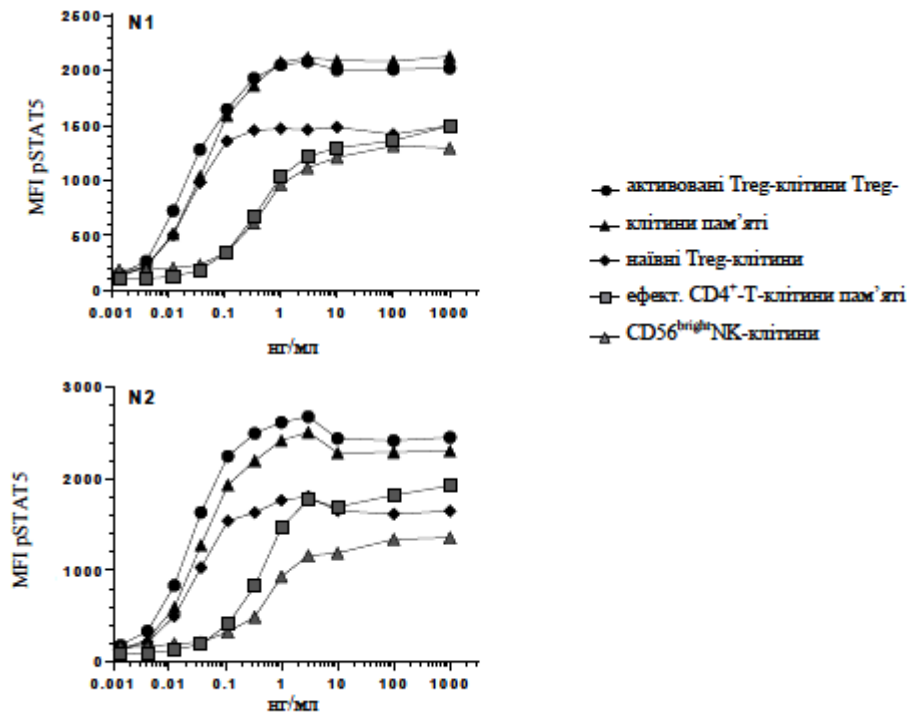
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

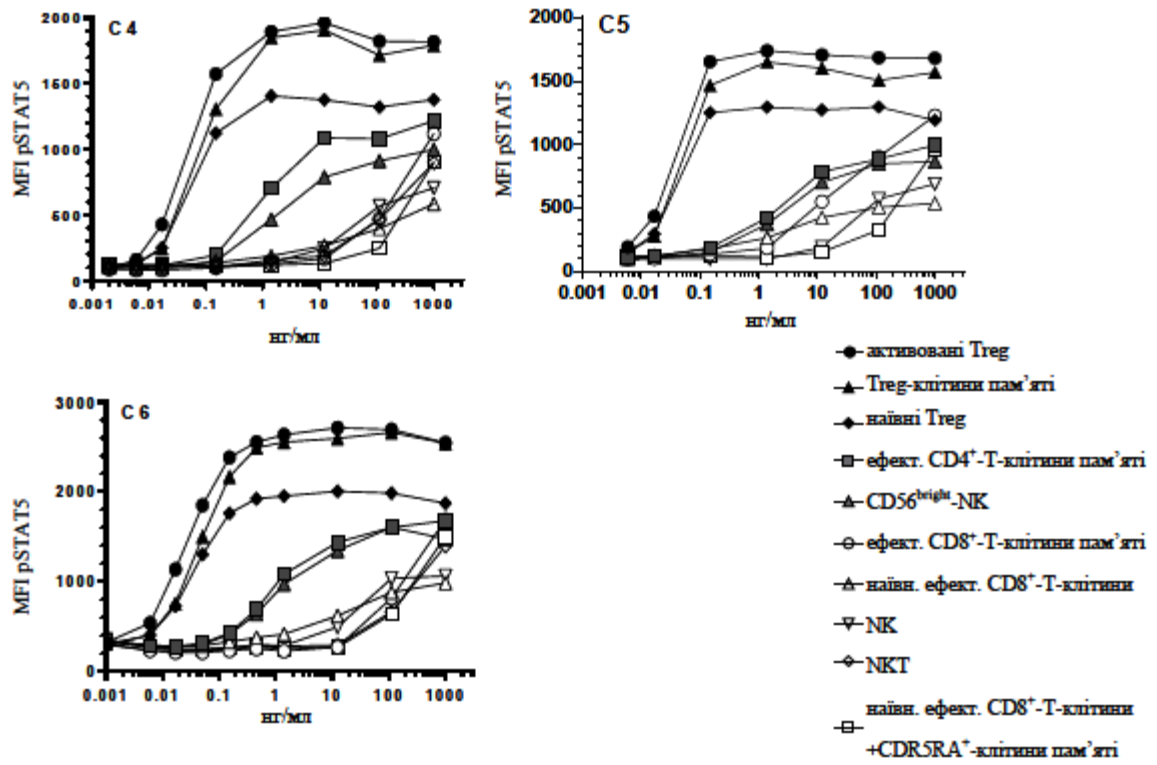


Fig. 9

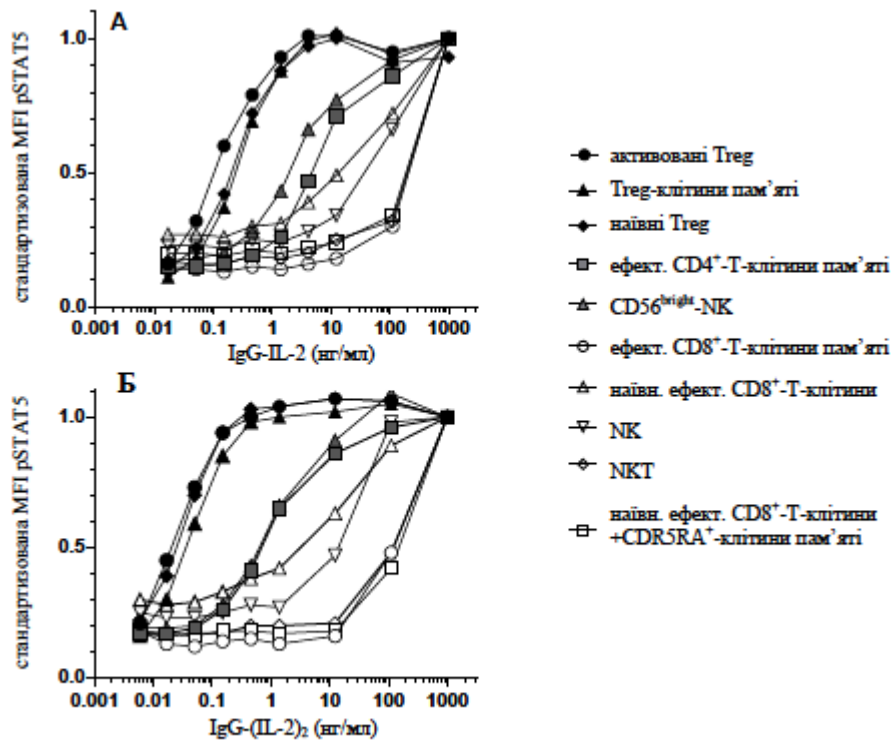
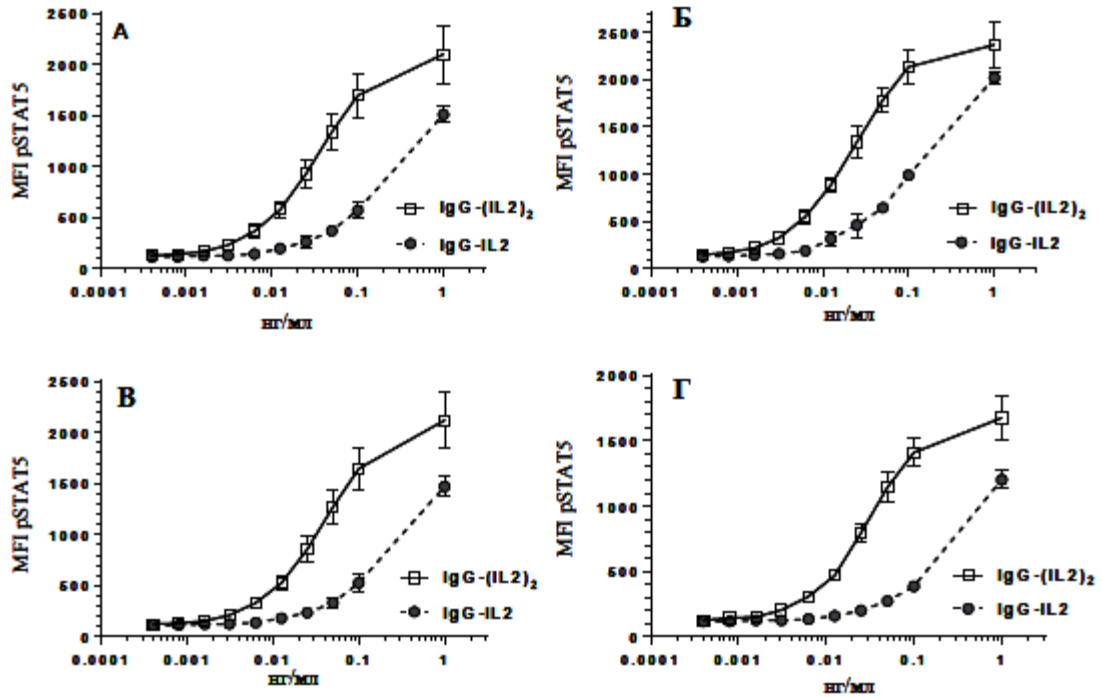
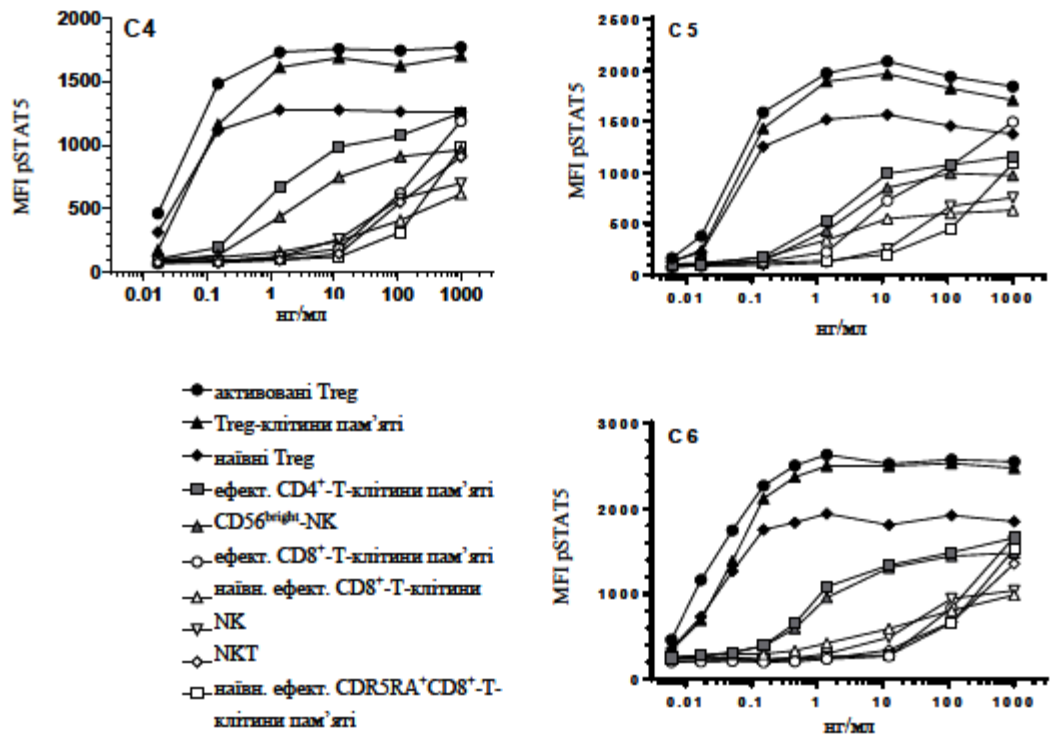


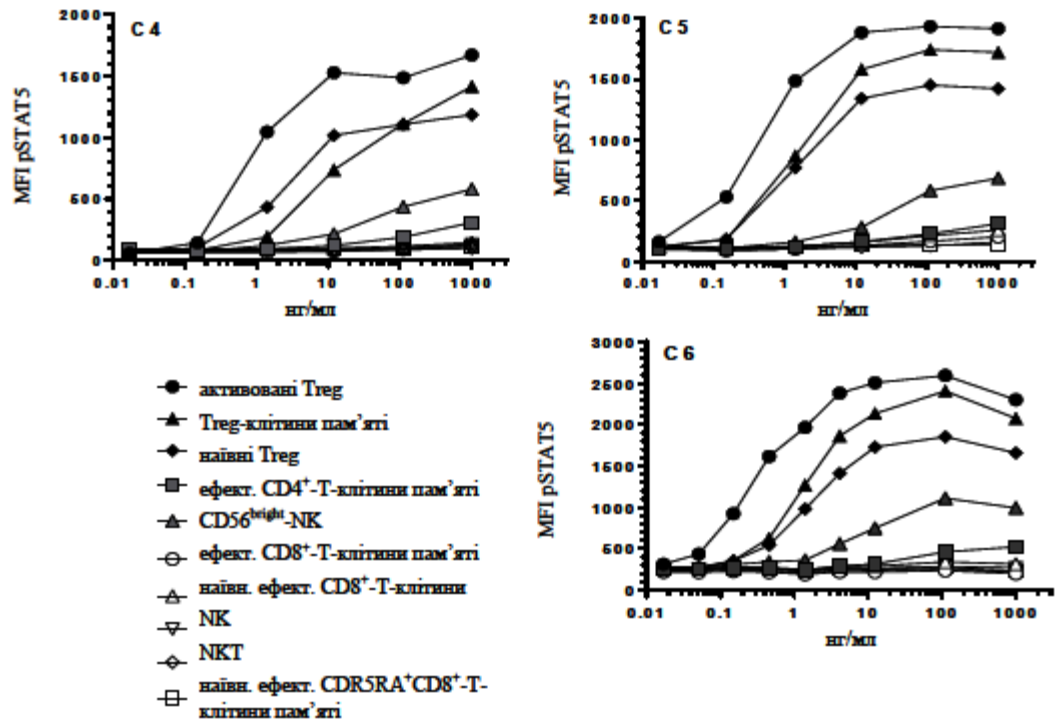
Fig. 10



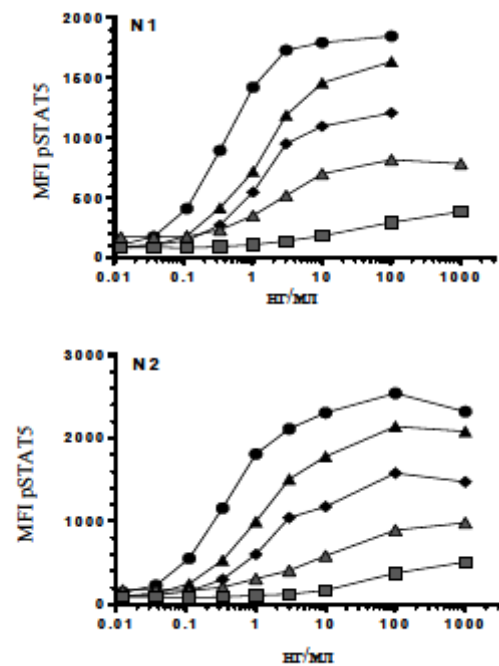
Фиг. 11



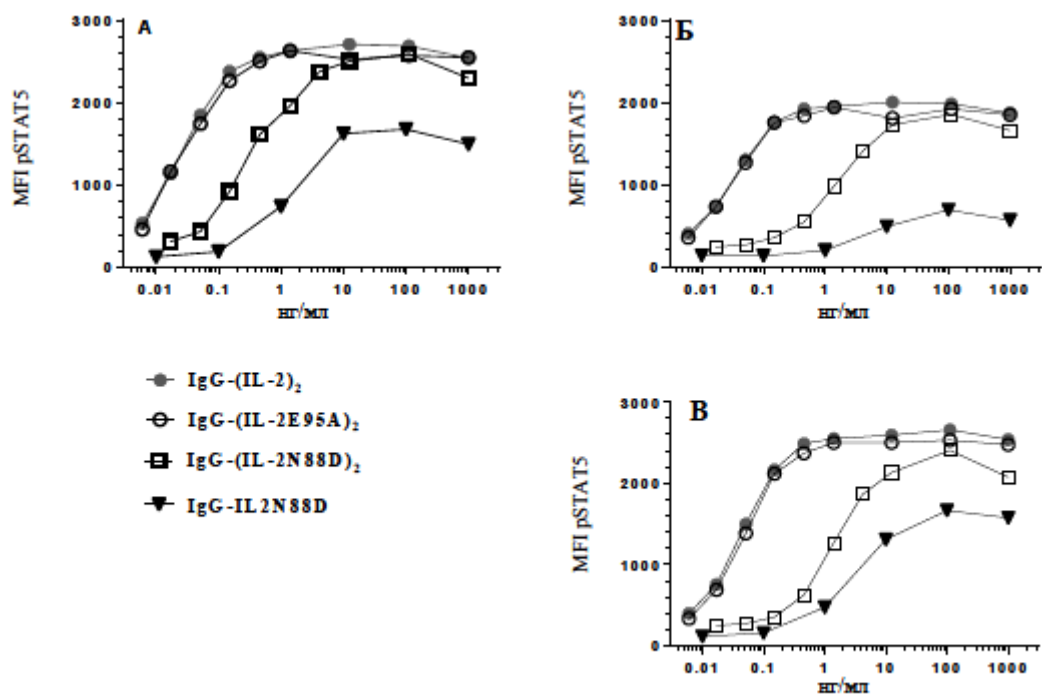
Фиг. 12



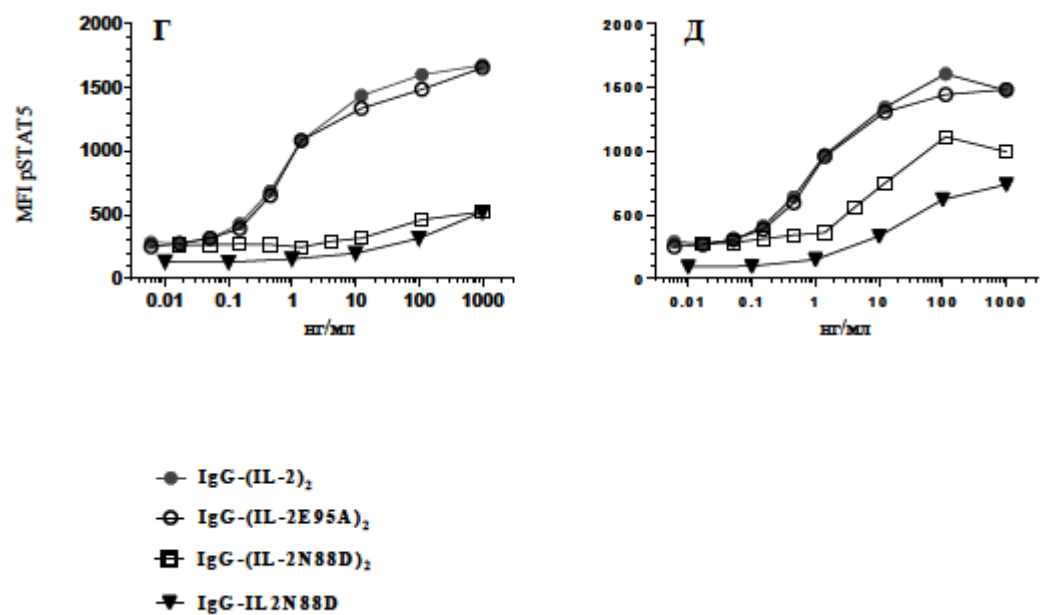
Фіг. 13



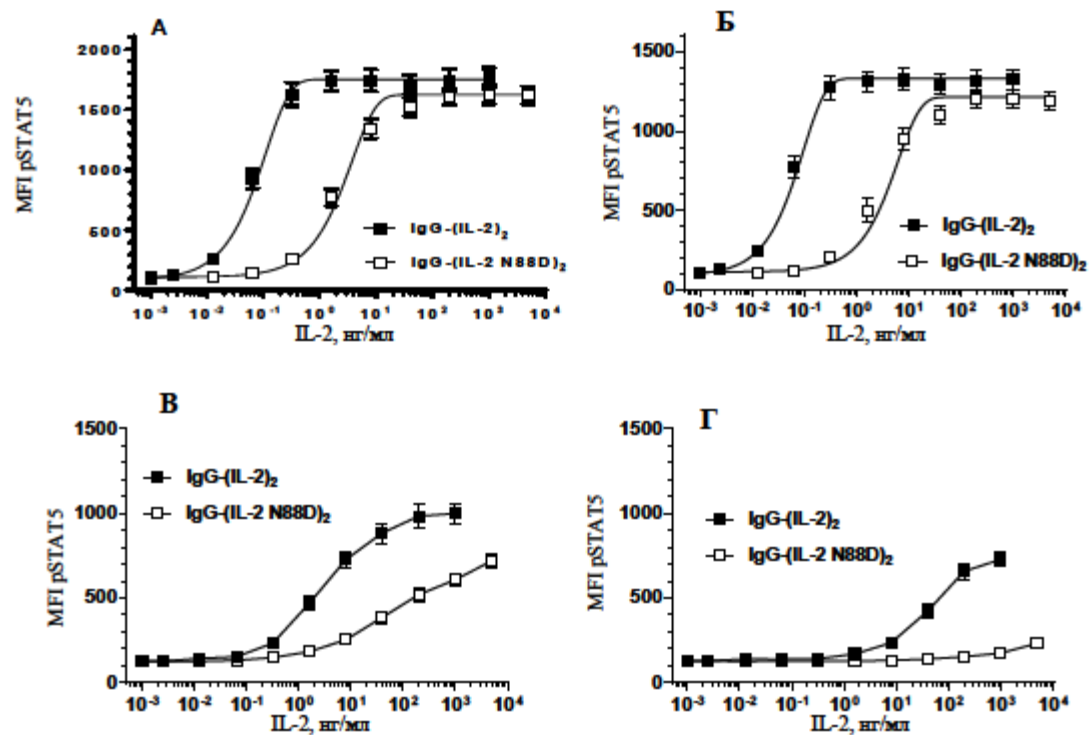
Фіг. 13



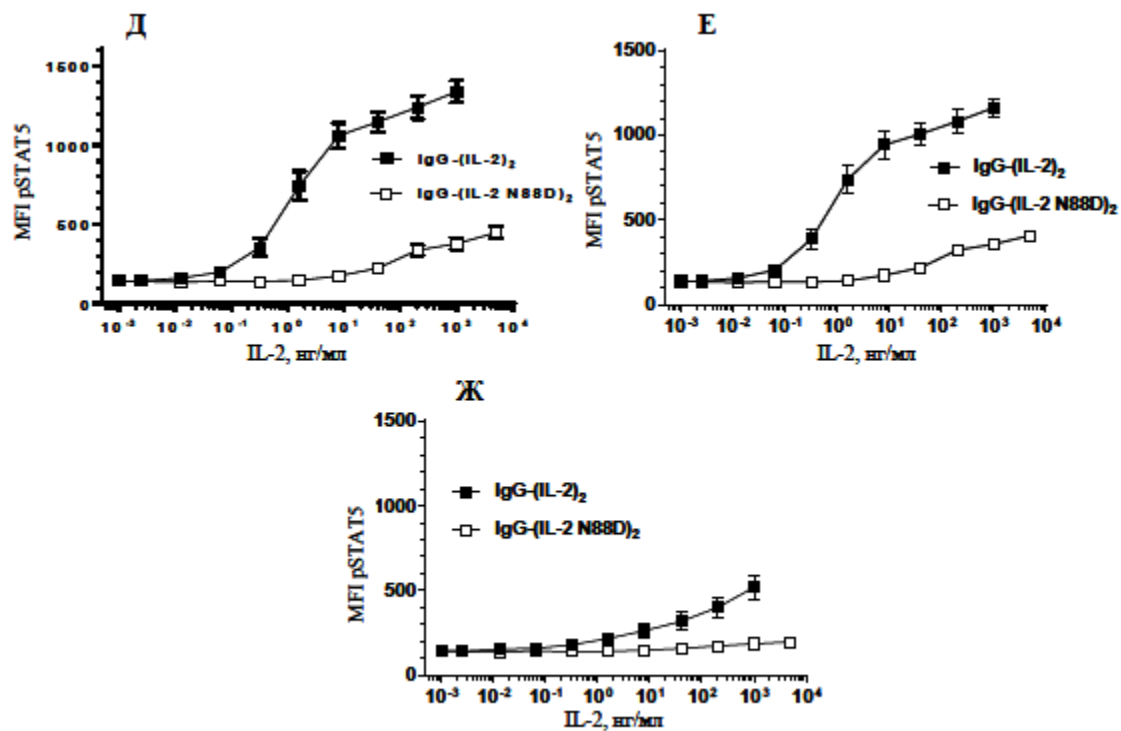
Фиг. 14



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 15

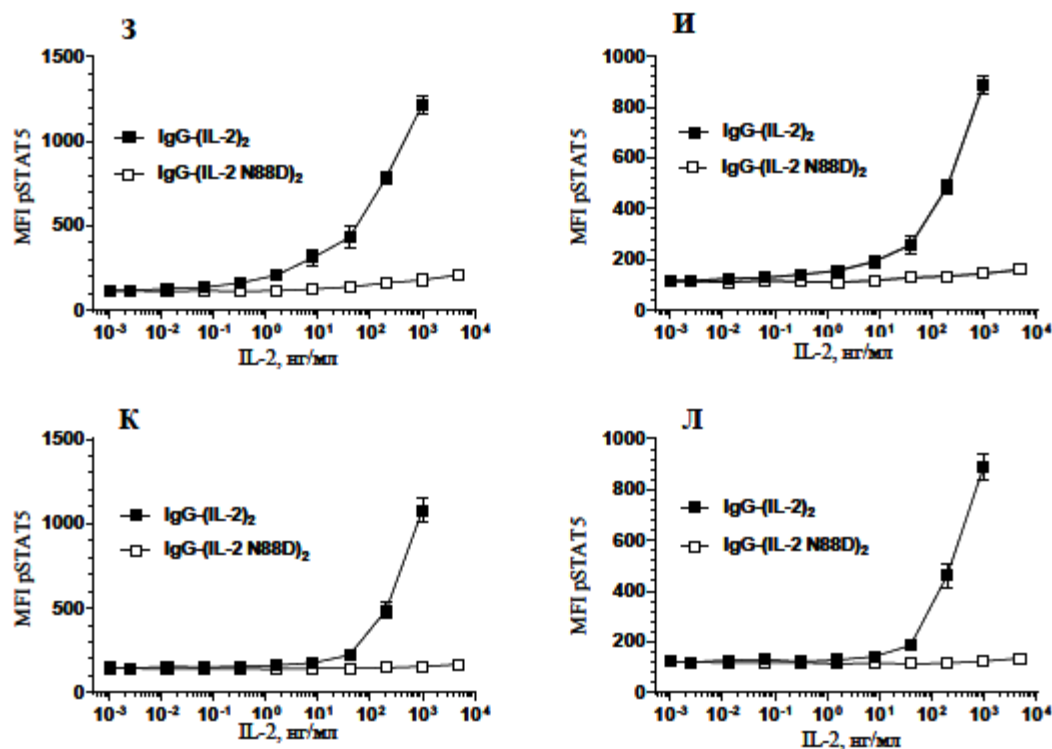


Fig. 15

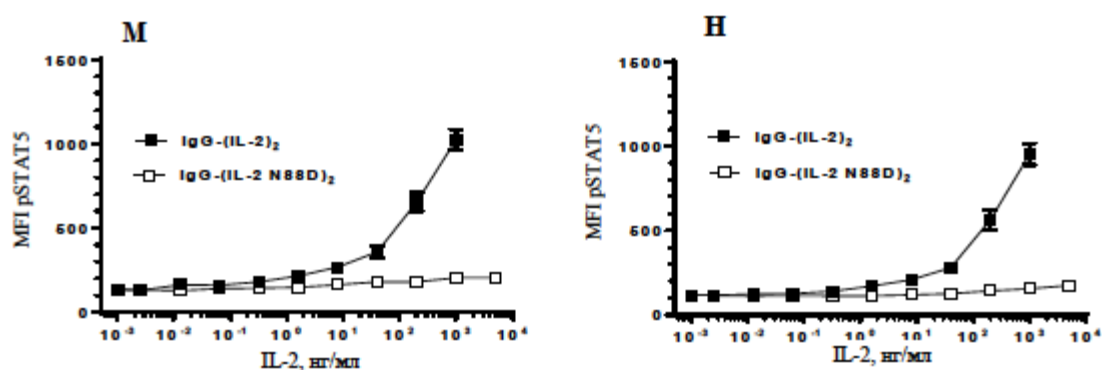


Fig. 15

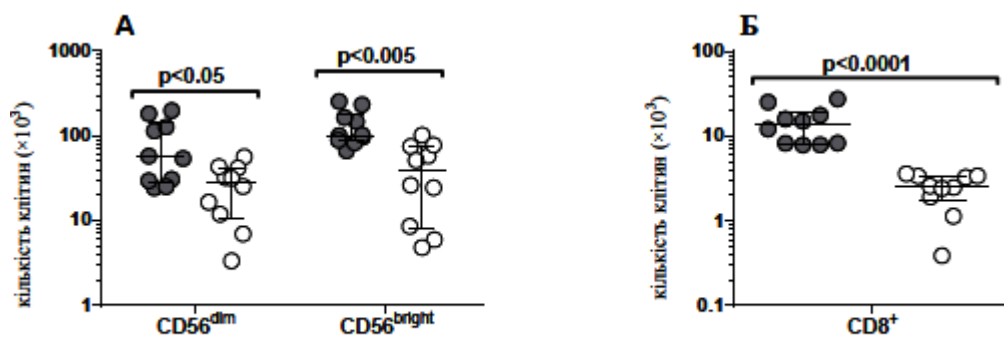
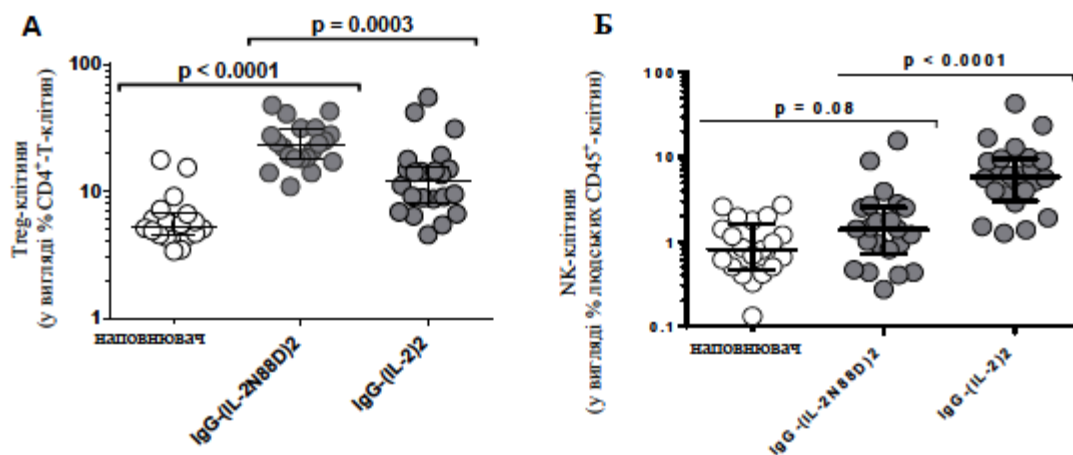
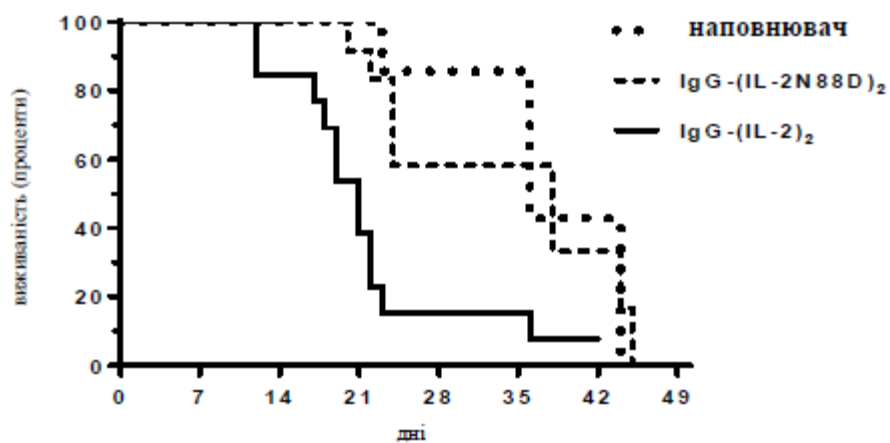


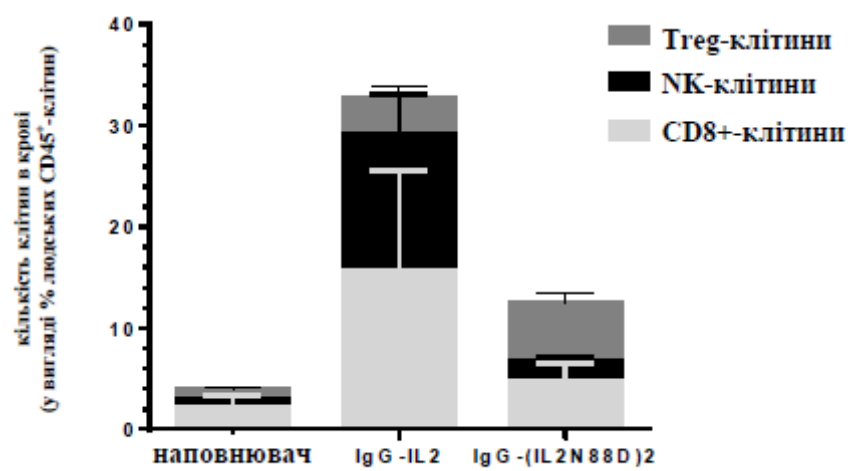
Fig. 16



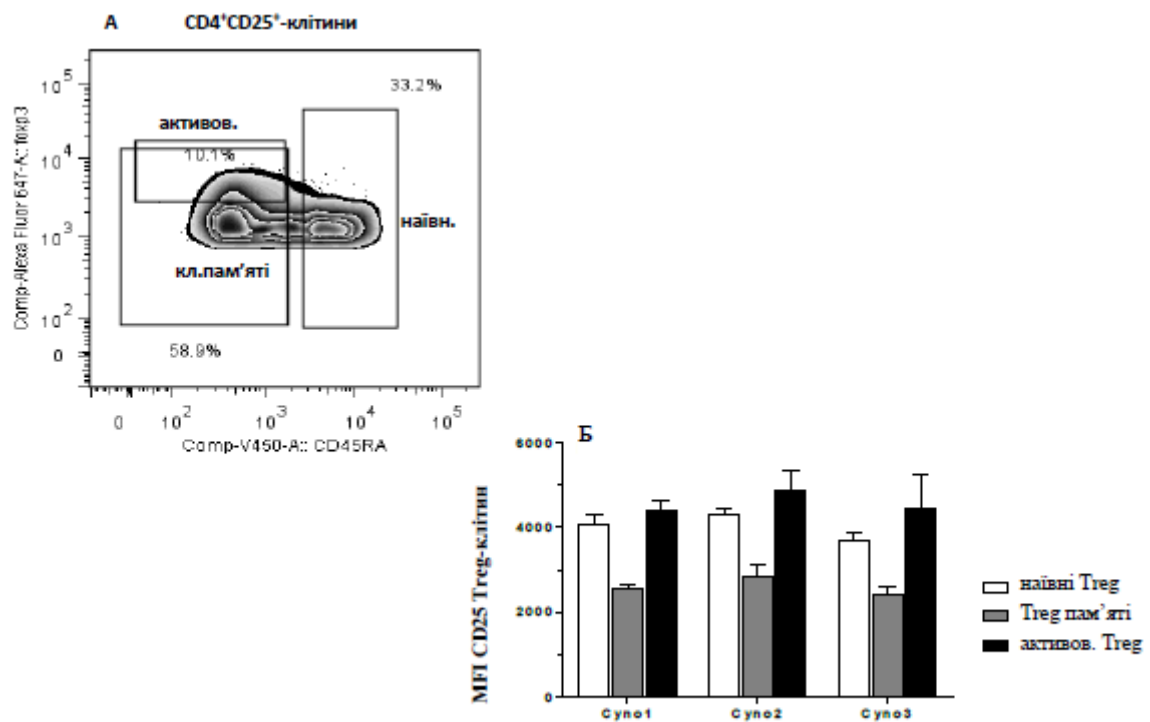
Фіг. 17



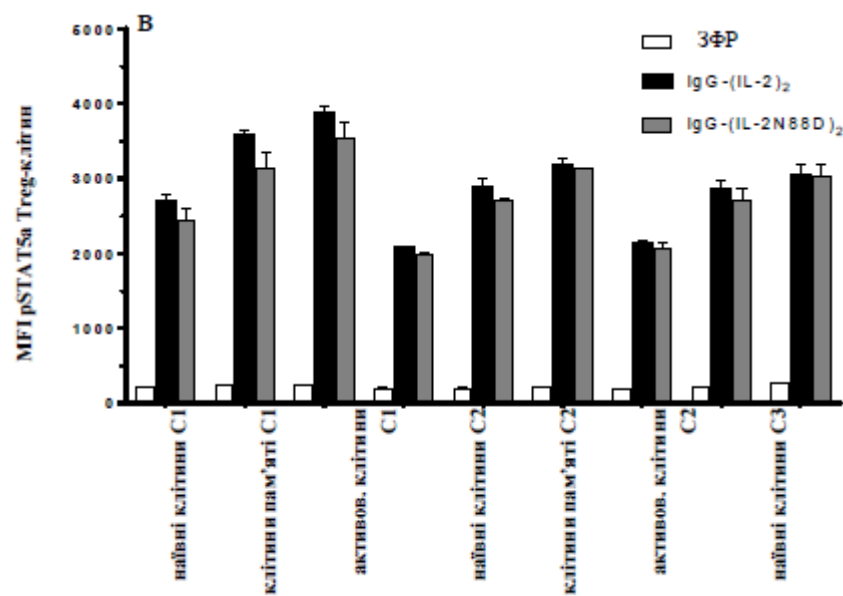
Фіг. 18



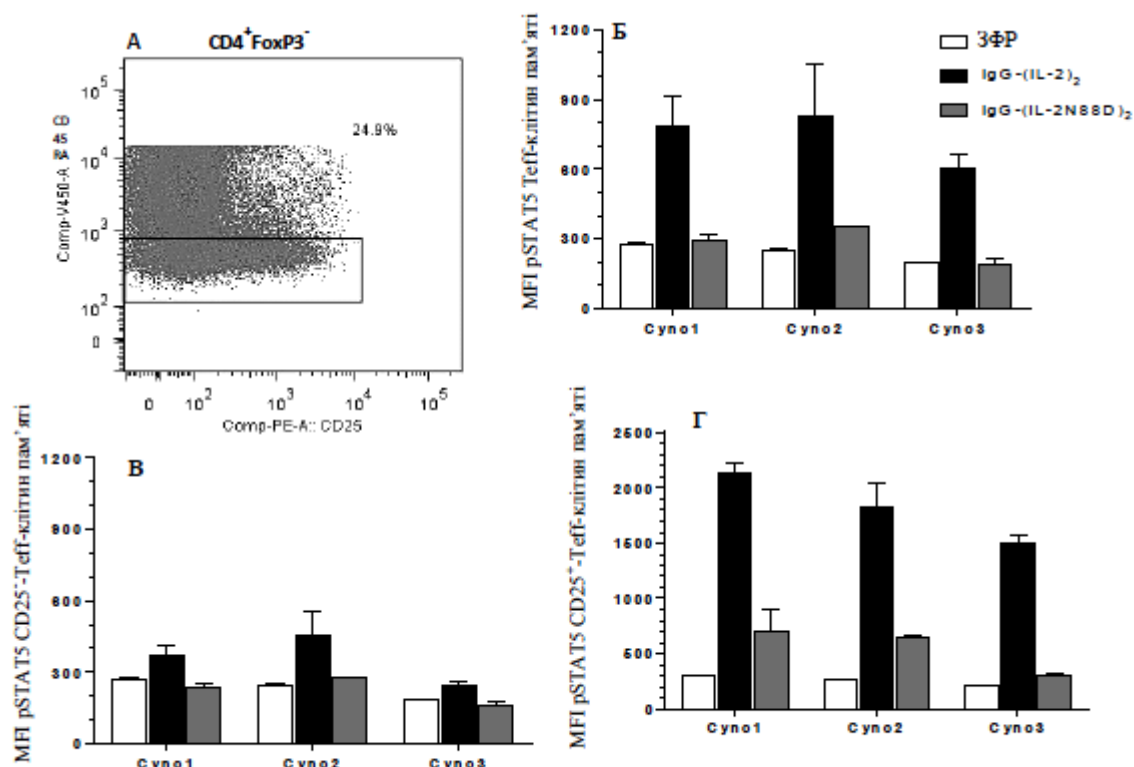
Фіг. 19



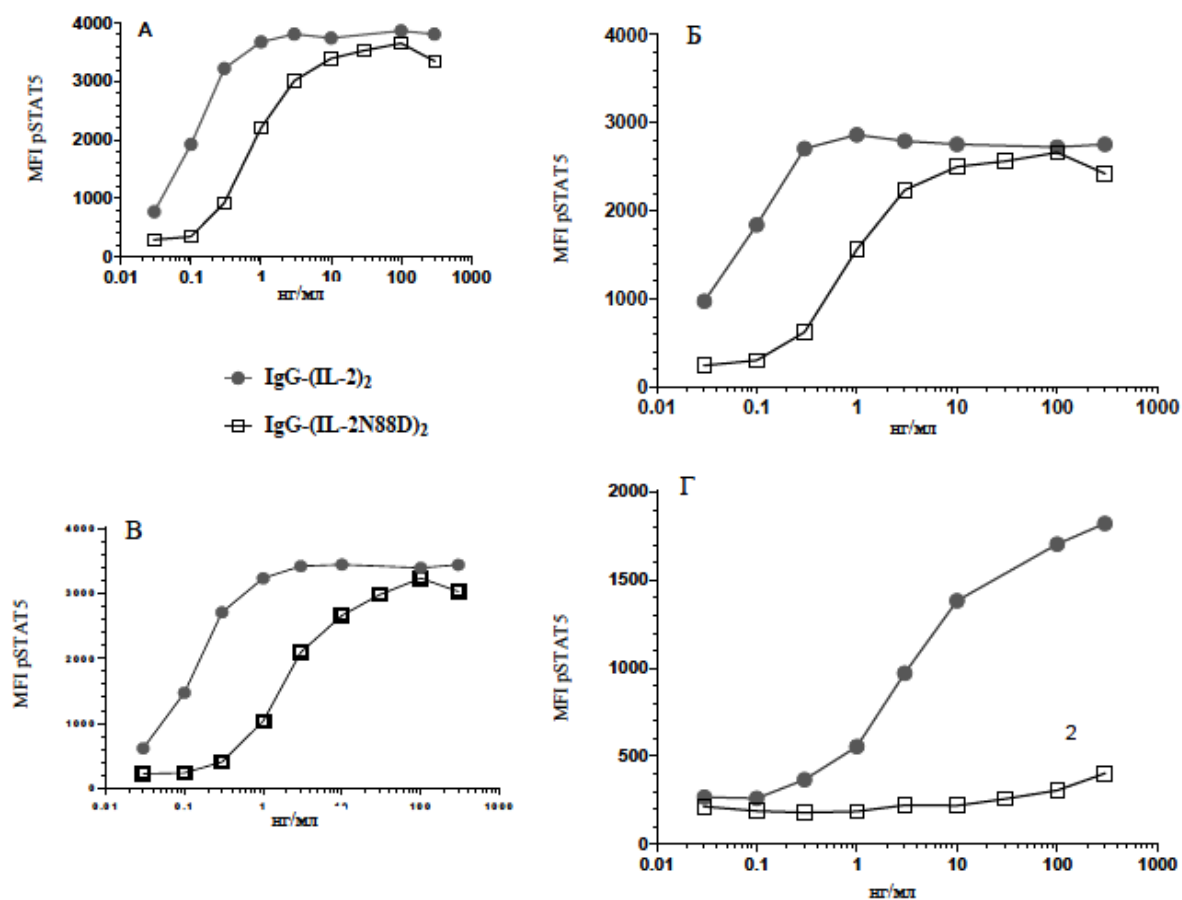
Фіг. 20



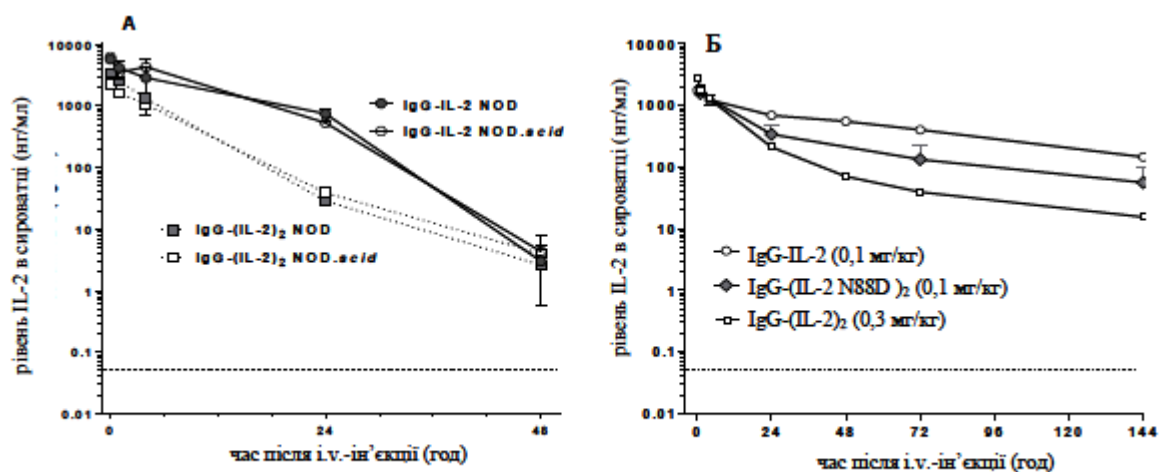
Фіг. 20



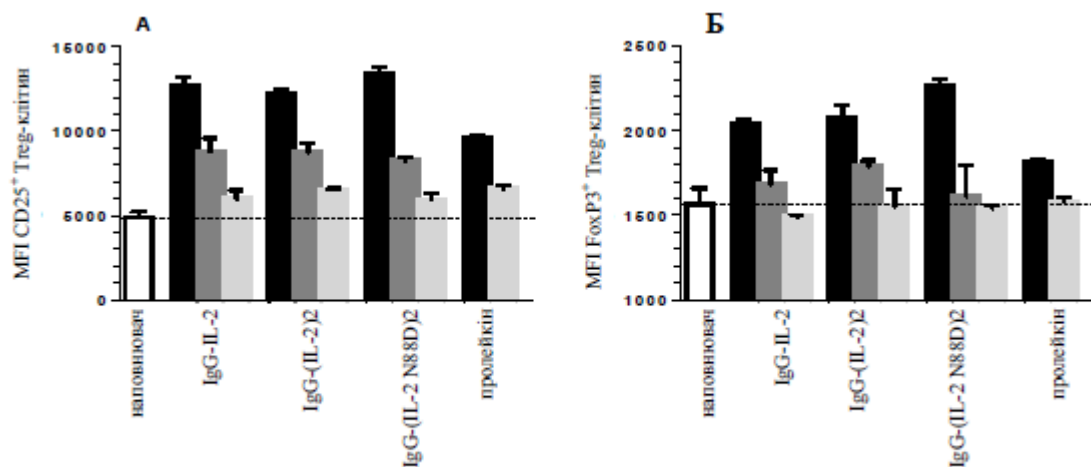
Фиг. 21



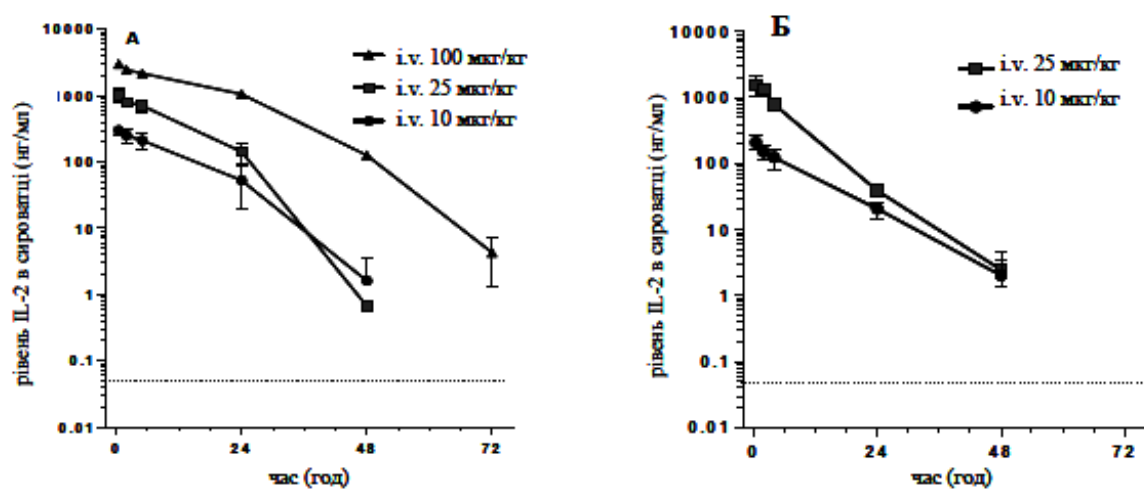
Фиг. 21



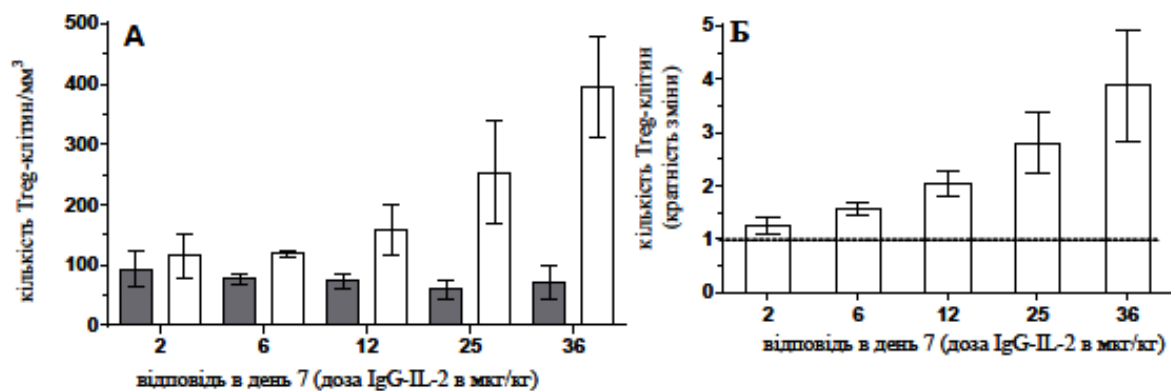
Фіг. 23



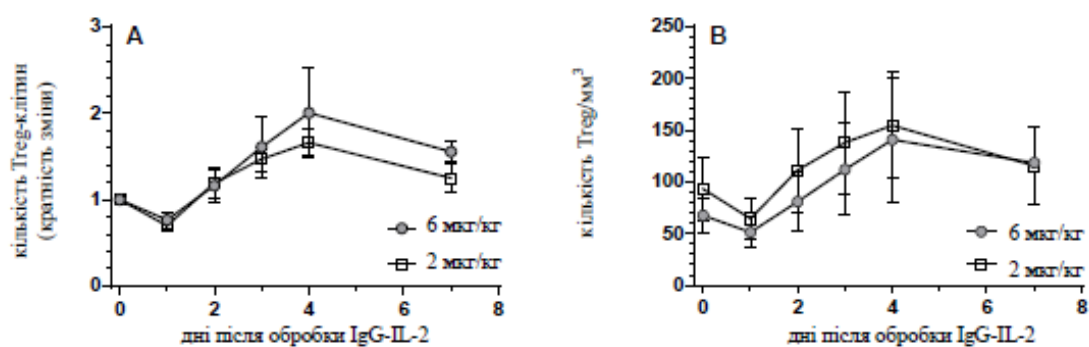
Фіг. 24



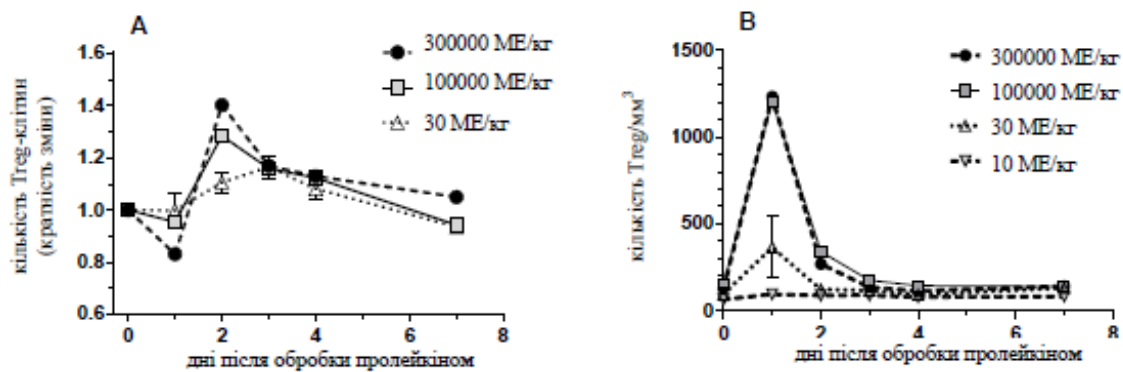
Фіг. 25



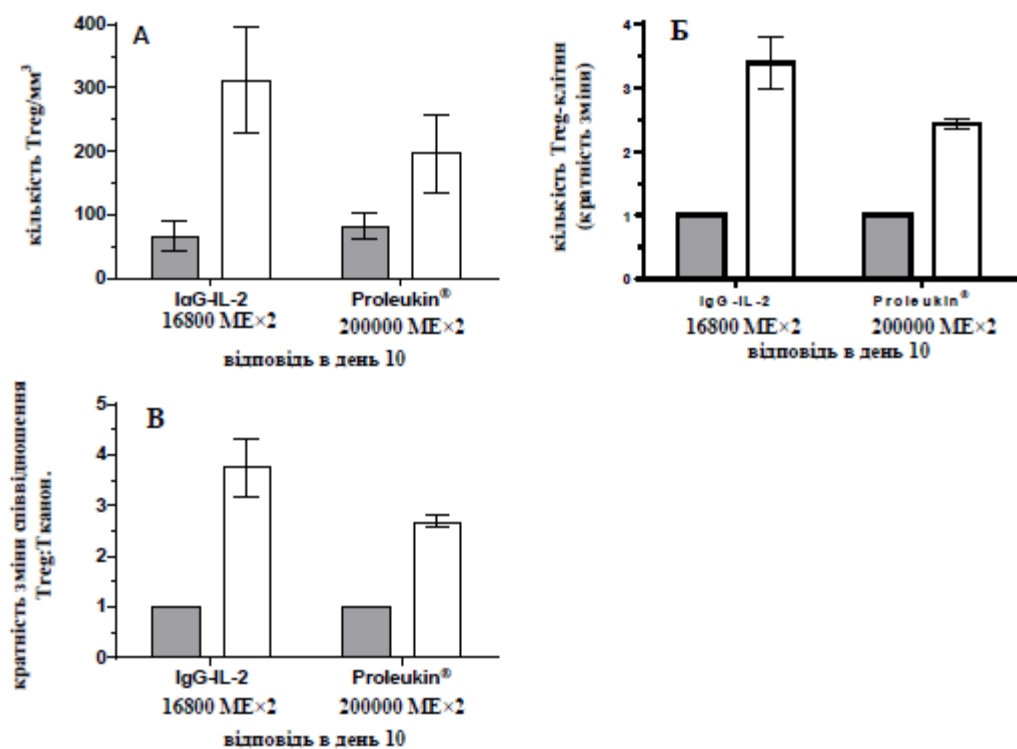
Фіг. 26



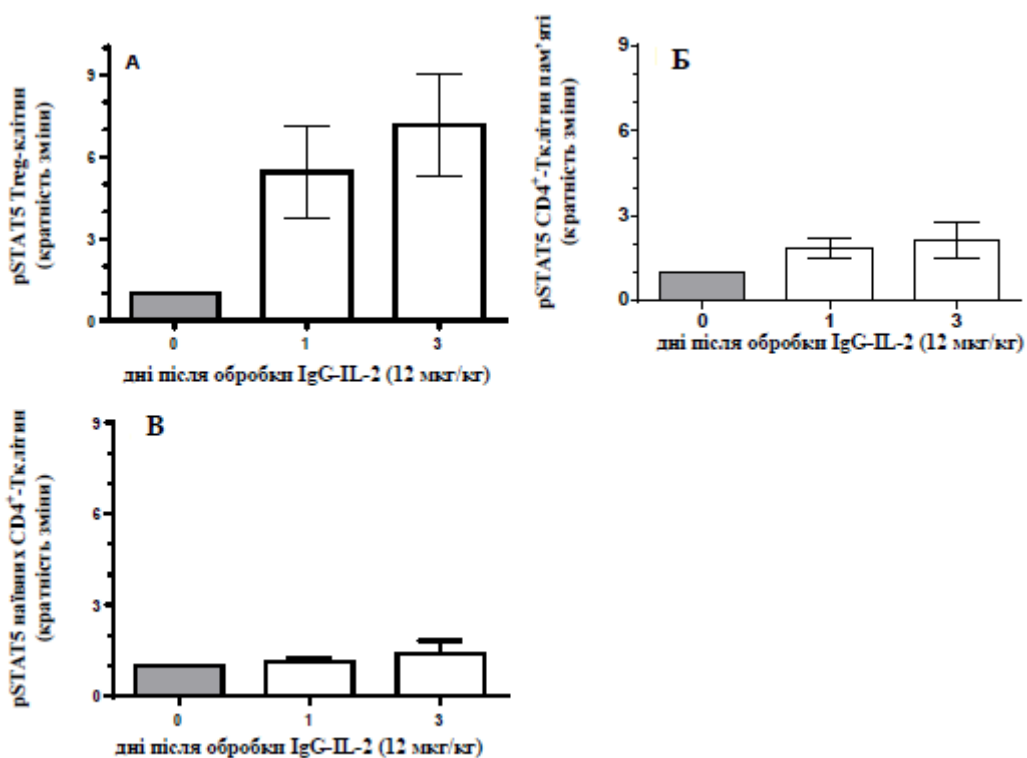
Фіг. 27



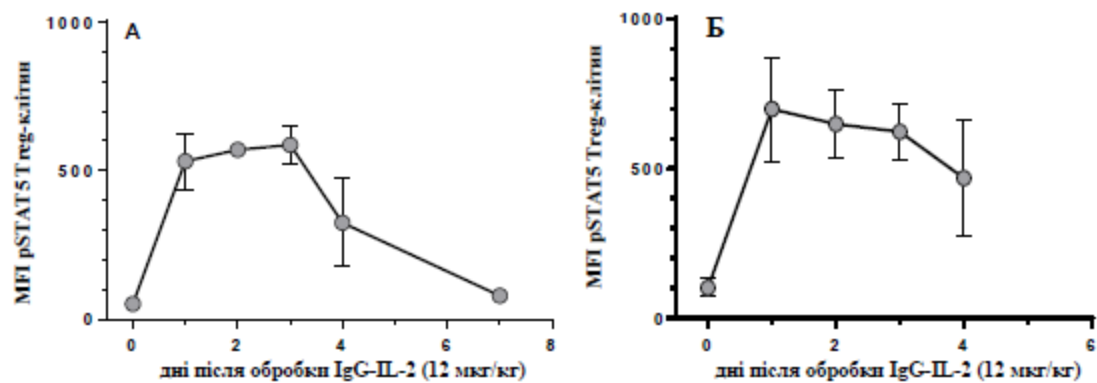
Фіг. 28



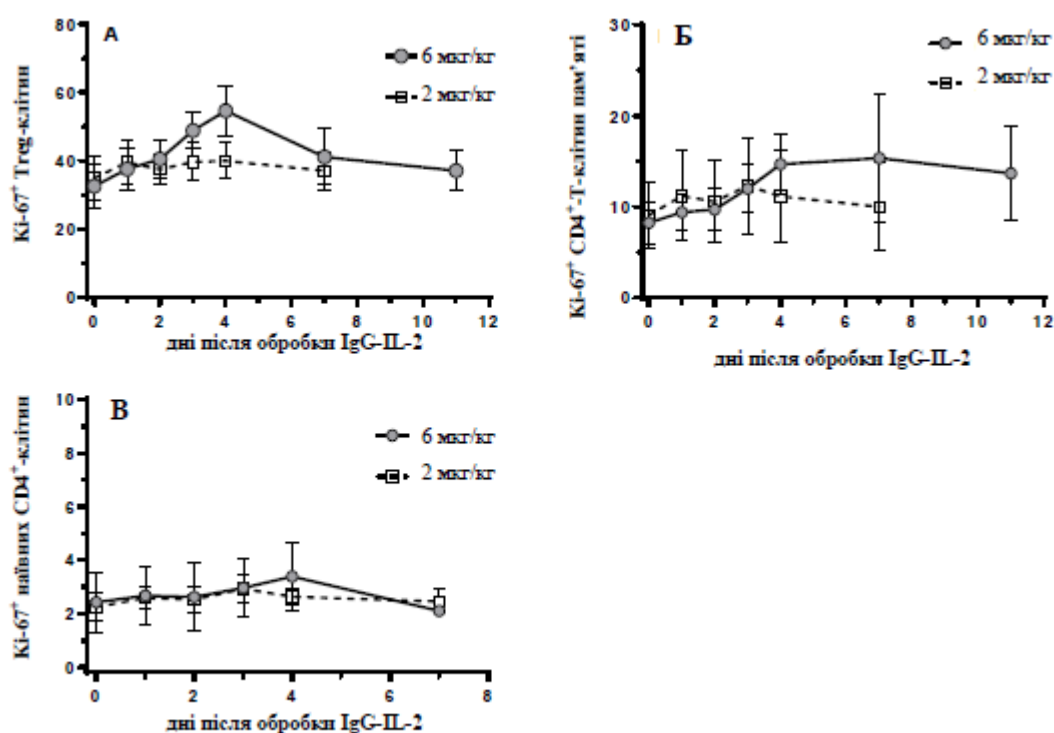
Фіг. 29



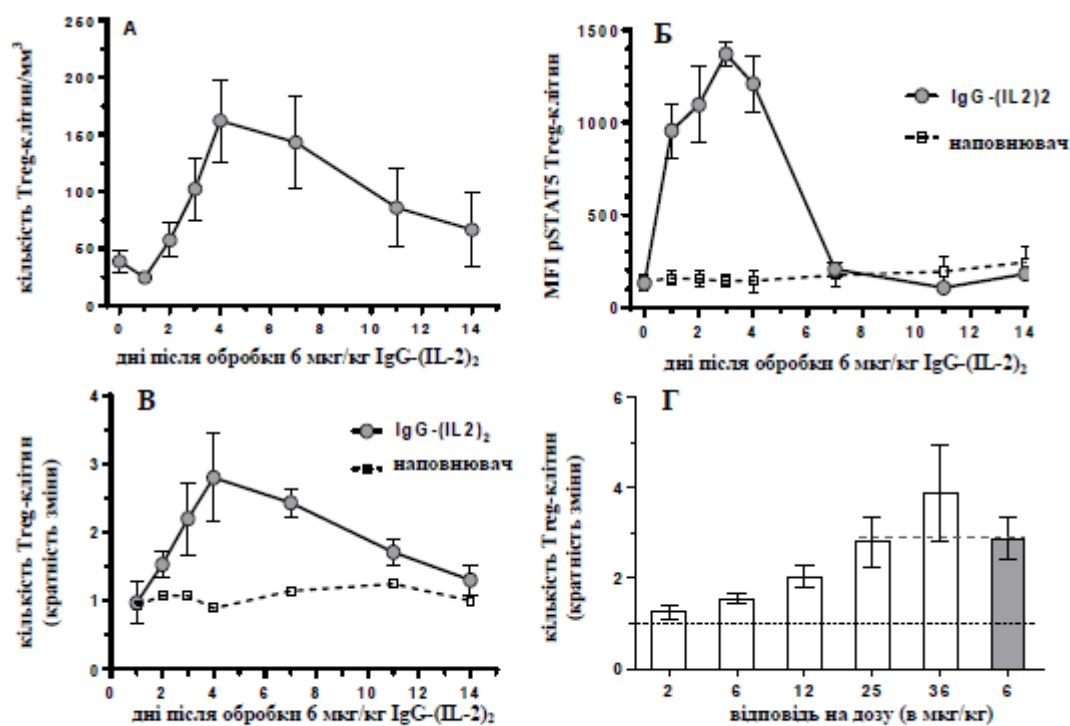
Фіг. 30



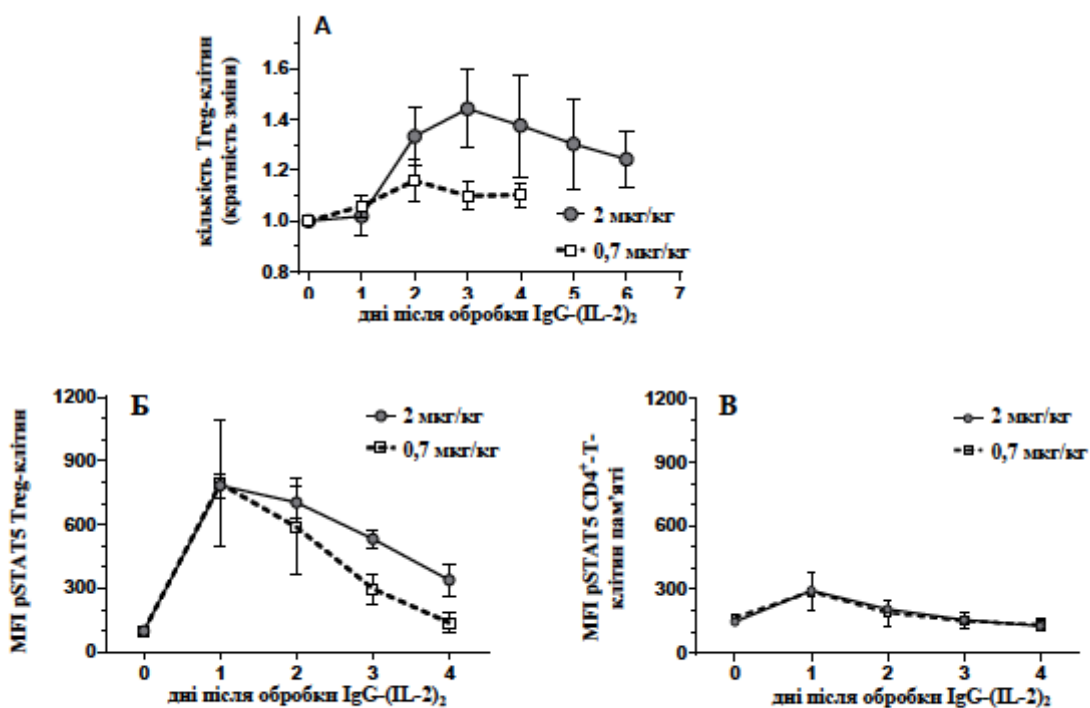
Фіг. 31



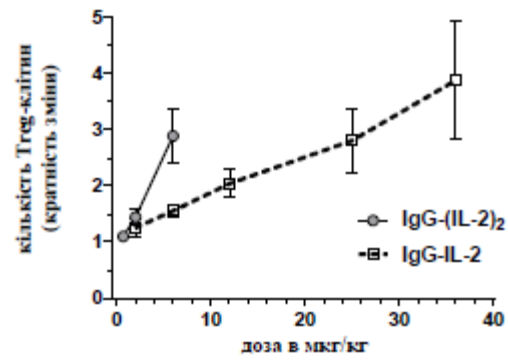
Фіг. 32



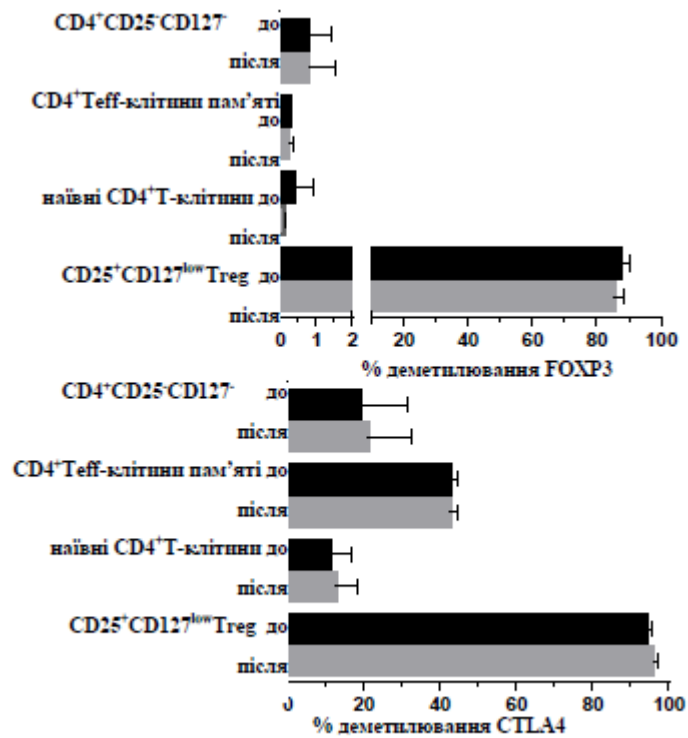
Фіг. 33



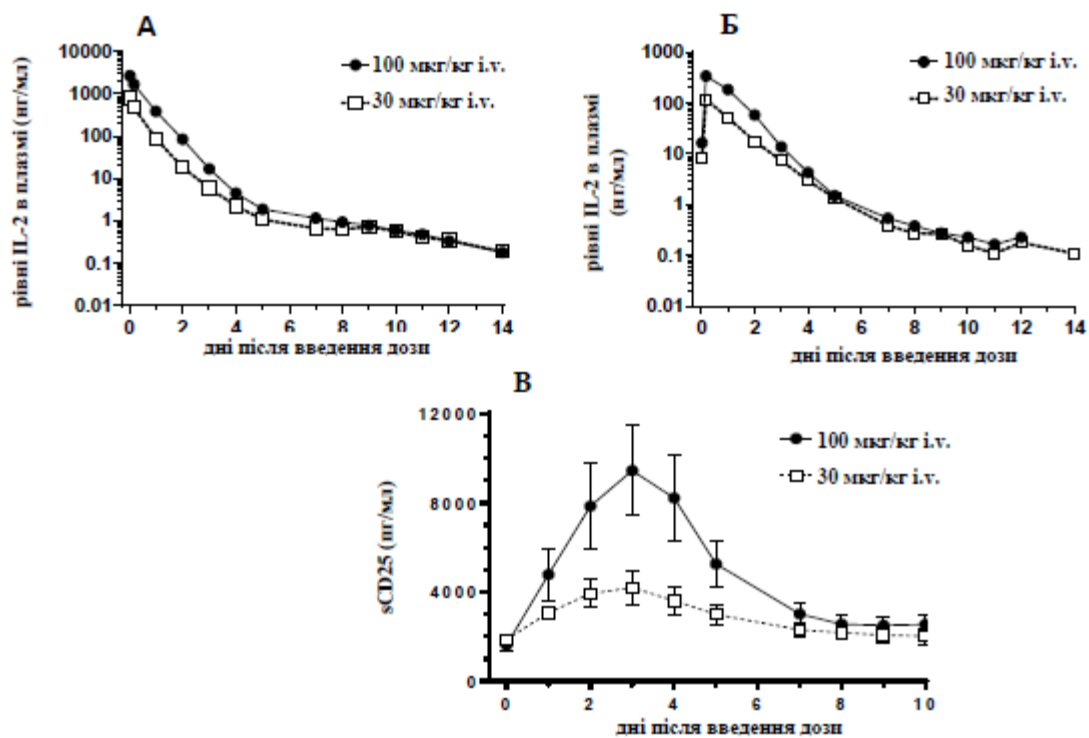
Фіг. 34



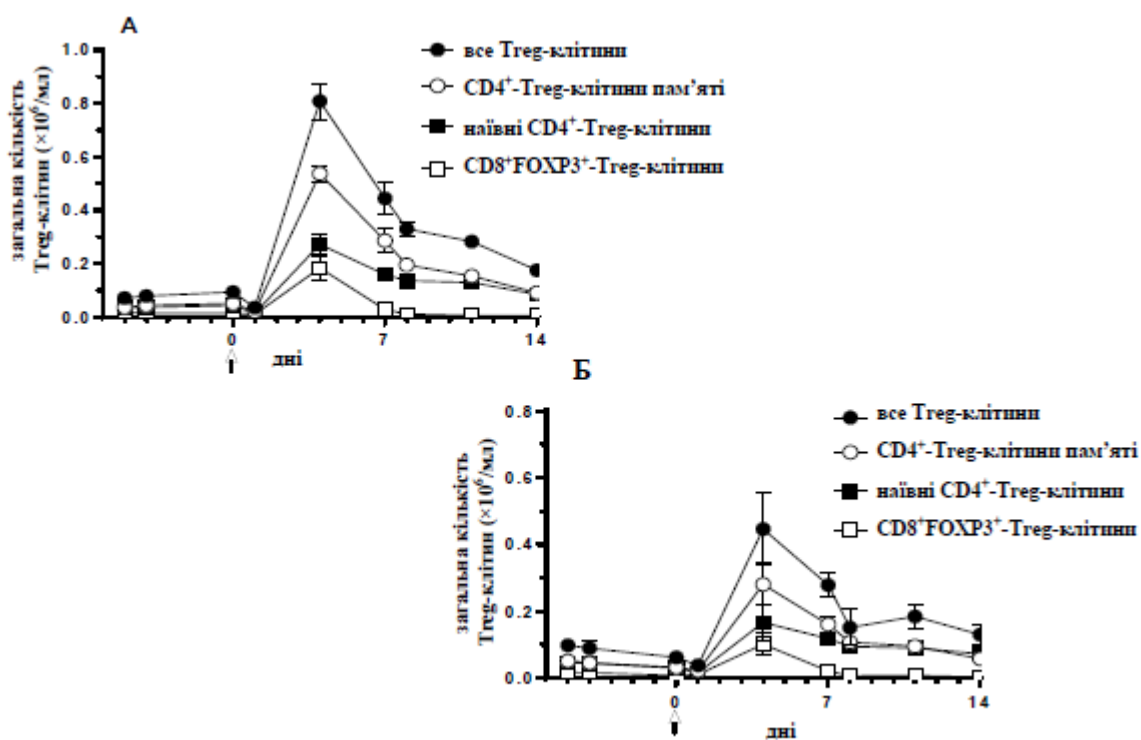
Фіг. 35



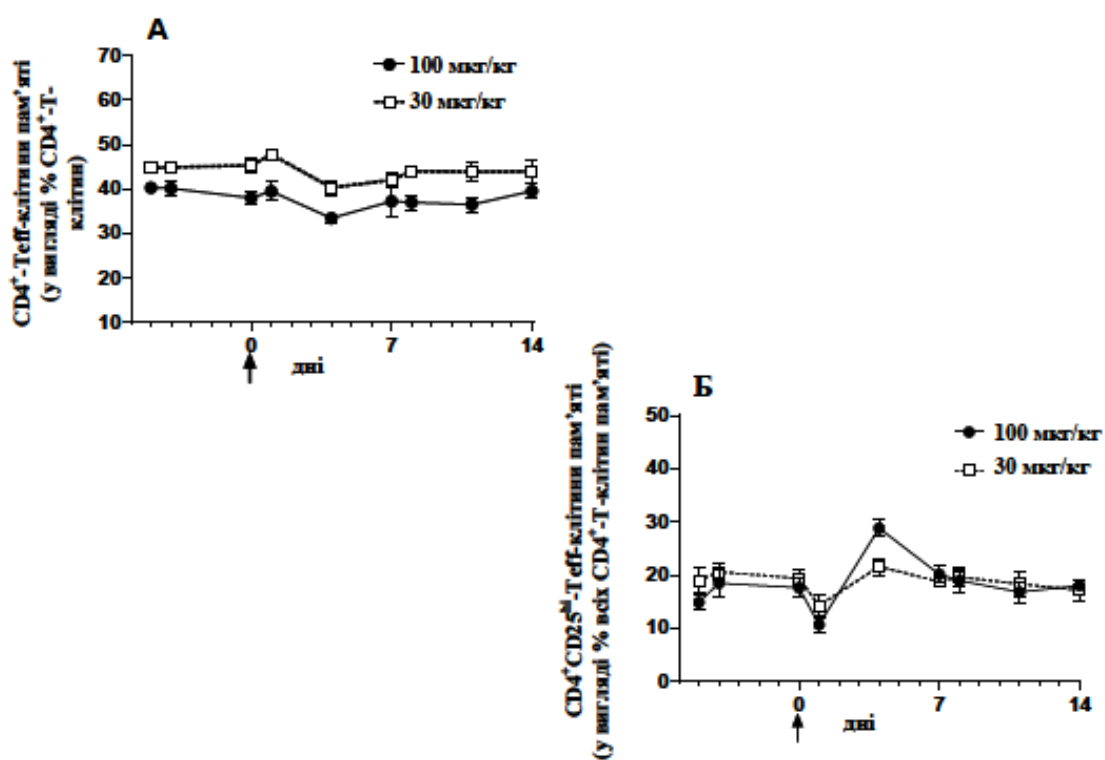
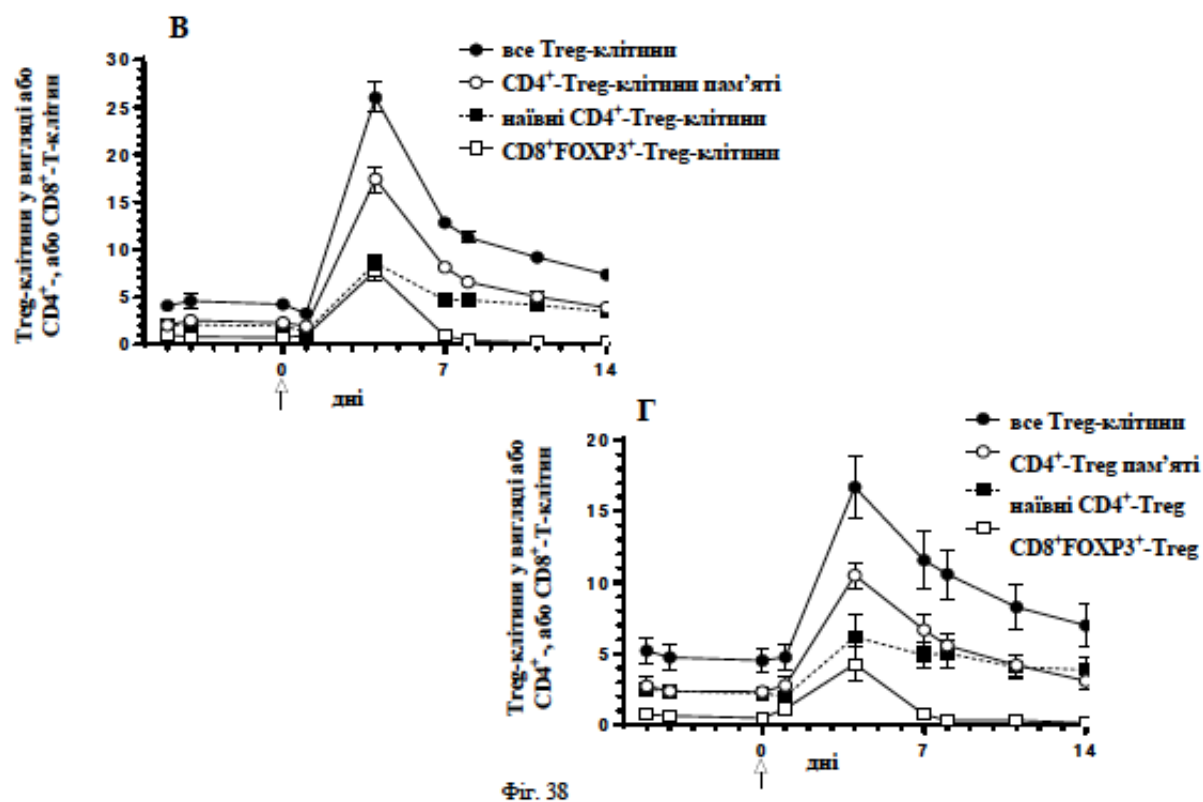
Фіг. 36

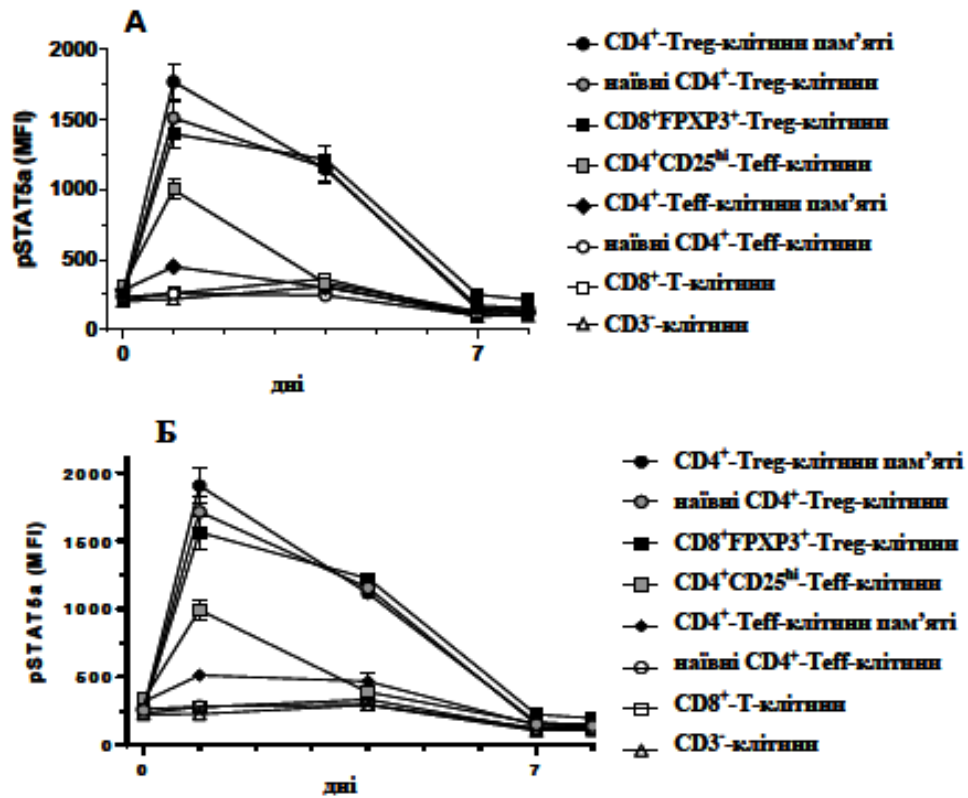


Фіг. 37

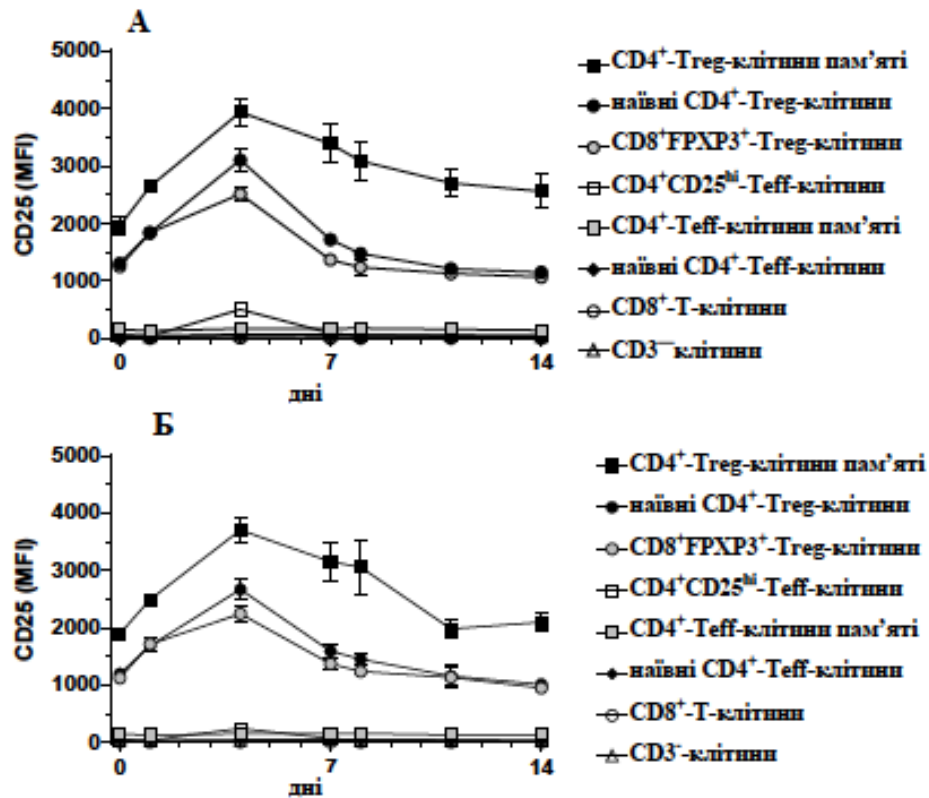


Фіг. 38

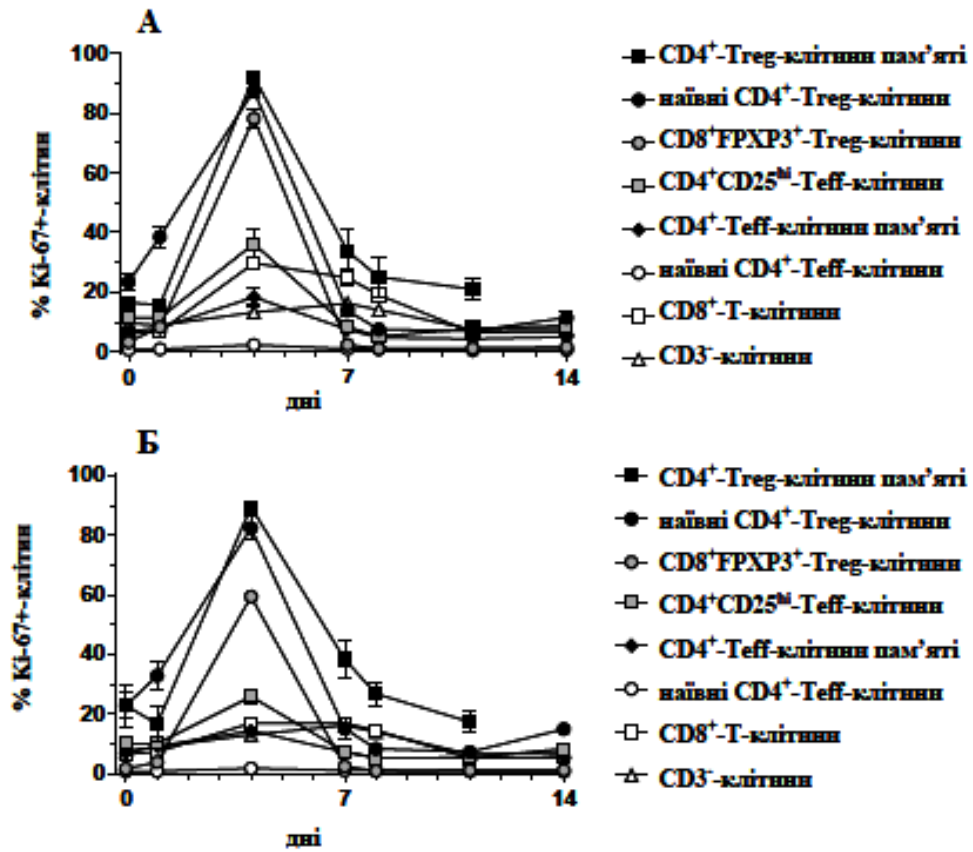




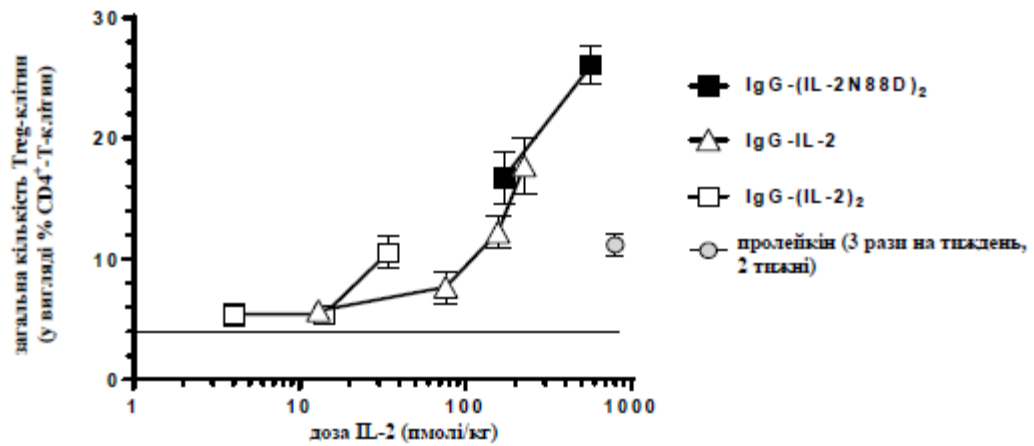
Фіг. 40



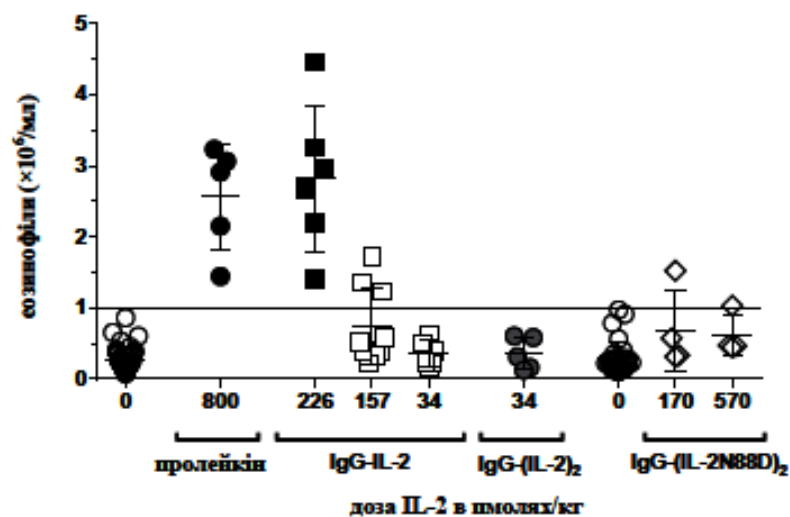
Фіг. 41



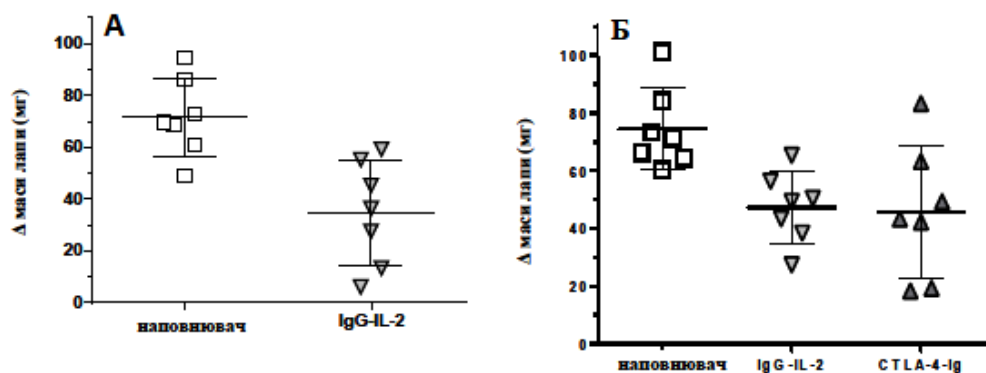
Фіг. 42



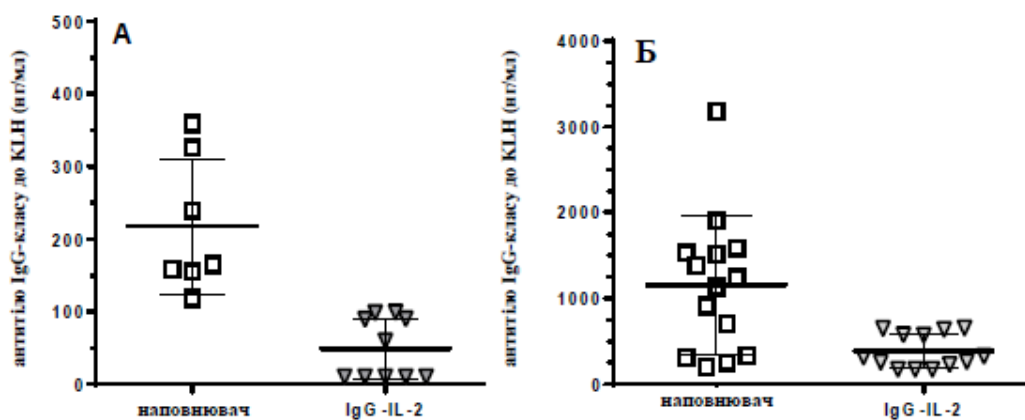
Фіг. 43



Фіг. 44



Фіг. 45



Фіг. 46

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601