

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044897**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.10**

(21) Номер заявки  
**201892339**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.12.10**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 38/02* (2006.01)  
*C07K 14/00* (2006.01)  
*C07K 14/735* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*C12N 15/00* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2015.01)  
*C12N 1/00* (2006.01)  
*C07K 1/00* (2006.01)

---

(54) **НЕСИАЛИРОВАННЫЙ ВЫДЕЛЕННЫЙ ПОЛИПЕПТИД, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
УКАЗАННОГО ПОЛИПЕПТИДА И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

---

(31) **61/577,361**

(32) **2011.12.19**

(33) **US**

(43) **2019.03.29**

(62) **201491215; 2012.12.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЗЕ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ  
(US)**

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

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) EA-A1-200870411  
WO-A2-2007117505  
GenBank: CAE45781.1 20.01.2005  
WO-A1-2011059684  
WO-A2-2007055916  
NZ-A-597651

---

(57) Настоящее изобретение касается противовоспалительных агентов, композиций и способов лечения воспалительных расстройств.

---

**B1**

**044897**

**044897**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на связанные заявки**

Это заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 61/577361 от 19 декабря 2011 г. Содержание заявки включено в данный документ ссылкой в полном объеме.

### **Государственные капиталовложения**

Изобретение, раскрытое в данном документе, было проведено, по меньшей мере, частично при поддержке государственного гранта № NIH AI035875 Национального института здравоохранения. Соответственно США обладают определенными правами на данное изобретение.

### **Область техники**

Изобретение относится к противовоспалительным агентам, композициям и способам лечения воспалительных расстройств.

### **Уровень техники**

Воспалительные расстройства, включающие аутоиммунные заболевания, представляют собой расстройства, включающие аномальную активацию и последующую миграцию лейкоцитов в пораженные области организма. Эти условия охватывают широкий спектр болезней, которые влияют на жизни миллионов людей по всему миру. Хотя в настоящее время доступны различные методы лечения, многие из них обладают значительными побочными эффектами или не очень эффективны в ослаблении симптомов. Таким образом, существует необходимость получения противовоспалительных агентов для лечения воспалительных расстройств, и существует необходимость в разработке методов идентификации и оценки таких агентов.

Давно известно, что иммуноглобулин G (IgG) опосредует как про-, так и противовоспалительные активности посредством взаимодействий, опосредованных его Fc-фрагментом. В то время как взаимодействия Fc-FcγR отвечают за провоспалительные свойства иммунных комплексов и цитотоксических антител, внутривенный гамма-глобулин (IVIg) и его Fc-фрагменты являются противовоспалительными и широко используются для подавления воспалительных заболеваний. Предполагалось, что гликозилирование IgG является критическим для регуляции цитотоксичности и воспалительного потенциала IgG. Например, предполагали, что противовоспалительная активность IVIg является свойством Fc-фрагмента и его связанного гликана, требующего концевых связей α-2,6-сиаловой кислоты, выявляющих совместное требование для специфичного полипептидного остова и структуры гликана, необходимое для иммуносупрессии. (Anthony, et al., 2008, Science 320: 373-376 и WO 2007/117505).

Однако только минорная популяция IgG в IVIg содержит гликаны, терминированные α-2,6-сиаловыми кислотами (sFc), и имеет противовоспалительную активность. В результате, для супрессии воспаления, вызванного аутоантителами, во множестве клинических случаев специалисту следует вводить IVIg в высоких дозах (1-2 г/кг) для обогащения сиалированных IgG, или другим способом повышая сиалирование IgG (заявки США № 20080206246 и 20090004179, и Nimmerjahn et al. Annu Rev Immunol 26, 513-533 (2008)).

Настоящее изобретение направлено на решение вышеупомянутых проблем путем идентификации противовоспалительных полипептидов, свободных от сиалирования.

### **Сущность изобретения**

Данное изобретение относится к агентам, таким как полипептиды и антитела, и к способам лечения воспалительных расстройств, например, аутоиммунных заболеваний.

Соответственно один аспект данного изобретения характеризует выделенный полипептид, включающий модифицированную последовательность, которая, по меньшей мере, на 75% (например, любое число между 75 и 100%, включая, например, 70, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) идентична последовательности Fc-участка IgG. Модифицированная последовательность свободна от сиалирования, и полипептид обладает противовоспалительной активностью, которая выше, чем противовоспалительная активность исходного полипептида. Исходный полипептид может включать Fc-участок IgG, такой как последовательность SEQ ID NO: 1, приведенная ниже. В некоторых воплощениях полипептид обладает способностью связываться с DC-SIGN, и связываться с hFcγRIIA или RIIB. В одном воплощении выделенный полипептид обладает способностью связываться с hFcγRIIA или RIIB при  $K_D$   $2 \times 10^{-5}$  М или ниже (то есть  $K_A$   $5 \times 10^4$  М<sup>-1</sup> или выше). Предпочтительно модифицированная последовательность содержит замену на аланин или консервативную аминокислоту в положении, соответствующем F241. Модифицированная последовательность может быть, по меньшей мере, на 75% (например, любое число между 75 и 100%, включая, например, 70, 80, 85, 90, 95, 99 и 100%) идентична SEQ ID NO: 2. В некоторых примерах модифицированная последовательность включает или по существу состоит из SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ получения полипептида, обладающего противовоспалительной активностью. Среди прочего способ включает стадии предоставления исходного полипептида, который на 75% идентичен Fc-участку hIgG1 с последовательностью SEQ ID NO: 1, или первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей исходный полипептид; и модификации исходного полипептида с получением модифицированного полипептида, последовательность которого свободна от сиалирования и имеет замену на аланин или консервативную аминокислоту в положении, соответствующем F241 последовательности SEQ ID NO: 1 согласно системе нумерации Kabat. Стадия

модификации может проводиться путем модификации первой последовательности нуклеотидов с получением второй последовательности нуклеотидов, кодирующей модифицированный полипептид. Изобретение также предоставляет полипептид, полученный только что описанным способом.

В третьем аспекте изобретение характеризует выделенную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, кодирующую полипептид, описанный выше, экспрессирующий вектор, включающий нуклеиновую кислоту, и клетку-хозяина, включающую нуклеиновую кислоту. Изобретение также характеризует способ получения полипептида. Способ включает культивирование клетки-хозяина в среде при условиях, дающих возможность экспрессии полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, и очистку полипептида из культивируемой клетки или из культуральной среды.

В четвертом аспекте в изобретении характеризуется фармацевтическая композиция, включающая (i) полипептид или нуклеиновую кислоту, описанные выше, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В пятом аспекте в изобретении предлагается способ лечения воспалительного заболевания. Способ включает введение нуждающемуся в этом объекту терапевтически эффективного количества вышеописанного полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Также предлагается применение полипептида или нуклеиновой кислоты в производстве лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. Изобретение также характеризует выделенный полипептид, нуклеиновую кислоту, экспрессирующий вектор, клетку-хозяина, композицию или способ лечения воспалительного заболевания, по существу как представлено и описано ниже.

Подробности одного или нескольких воплощений изобретения изложены в представленном ниже описании. Другие признаки, субъекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и из формулы изобретения.

#### Описание чертежей

Фиг. 1a-c представляют собой диаграммы и фотографии, демонстрирующие, что  $\alpha$ -2,6-связанная сиаловая кислота придает DC-SIGN-связывающую активность рекомбинантному человеческому IgG1 Fc.

Фиг. 2a-b представляют собой диаграммы фотографии, демонстрирующие, что нарушение взаимодействий Fc-гликана придает DC-SIGN-связывающую активность рекомбинантному человеческому IgG1 Fc.

Фиг. 3 представляет собой набор диаграмм, демонстрирующих, что мутация FA241 в hIgG1 Fc суммирует противовоспалительную активность  $\alpha$ -2,6 sFc.

Фиг. 4a-d представляют собой диаграммы, демонстрирующие отличительные черты противовоспалительной активности FA241.

Фиг. 5 представляет собой набор диаграмм, демонстрирующих, что мутация FA241 повышает связывание Fc $\gamma$  с рецептором.

Фиг. 6a-b представляют собой фотографии, демонстрирующие индуцирование IL-33 мРНК с помощью FA241 в макрофагах, выделенных из костного мозга.

#### Подробное описание

Данное изобретение основано, по меньшей мере, частично на неожиданном обнаружении того, что несиалированные варианты IgG Fc придают противовоспалительную активность и имитируют эффект 2,6-сиалированных Fc в качестве противовоспалительных медиаторов.

Сиалирование IgG и Fc.

IgG представляет собой основной сывороточный иммуноглобулин. Он представляет собой гликопротеин, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей и двух легких цепей, которые в свою очередь состоят из переменного и константного домена. IgG содержит единственный N-связанный гликан в Asn<sup>297</sup> в CH2-домене на каждой из его двух тяжелых цепей. Ковалентно связанный комплексный углевод состоит из сердцевинной, биантеннального пентаполисахарида, содержащего N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и маннозу (man). Дополнительная модификация сердцевинной углеводной структуры наблюдается в сывороточных антителах в присутствии фукозы, разветвленной GlcNAc, галактозы (gal) и концевых компонентов сиаловой кислоты (sa), которые не всегда имеют место. Таким образом, детектировали около 40 различных гликоформ, которые ковалентно присоединены по данному единственному сайту гликозилирования (Fujii et al., J. Biol. Chem. 265, 6009, 1990). Было продемонстрировано, что гликозилирование IgG является существенным для связывания со всеми Fc $\gamma$ Rs путем поддержания открытой конформации двух тяжелых цепей. Jefferis and Lund, Immune. Lett. 82, 57 (2002), Sondermann et al., J. Mol. Biol. 309, 737 (2001). Считается, что данное гликозилирование IgG для связывания Fc $\gamma$ R отвечает за невозможность дегликозилированных IgG-антител опосредовать вызванные *in vivo* воспалительные реакции, такие как ADCC, фагоцитоз и высвобождение медиаторов воспаления. Nimmerjahn and Ravetch, Immunity 24, 19 (2006). Дополнительные наблюдения того, что индивидуальные гликоформы IgG могут способствовать модулированию воспалительного ответа, подтвердили с помощью различных аффинностей для индивидуальных Fc $\gamma$ Rs, известных для IgG-антител, содержащих или лишенных фукозы, и с помощью их последующего влияния на цитотоксичность. Shields et al., J. Biol. Chem. 277, 26733 (2002), Nimmerjahn and Ravetch, Science 310, 1510 (2005). Связь между аутоиммунными состояниями и специфичными профилями гликозилирования IgG-антител наблюдали у пациентов с ревматоидным артритом

и несколькими аутоиммунными васкулитами, при которых, как сообщалось, имело место пониженное галактозилирование и сиалирование IgG-антител. Parekh et al., Nature 316, 452 (1985), Rademacher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6123 (1994), Matsumoto et al., 128, 621 (2000), Holland et al., Biochim. Biophys. Acta December 27. Также сообщалось, что вариации IgG-гликоформ ассоциированы с возрастом и с иммунитетом, хотя *in vivo* значимость этих изменений не определена. Shikata et al., Glycoconj. J. 15, 683 (1998), Lastra, et al., Autoimmunity 28, 25 (1998).

Как обсуждалось в данном документе, неожиданно оказалось, что некоторые несиалированные Fc-варианты IgG также придавали противовоспалительную активность. Такие варианты, включающие вариант FA241, характеризуют виды внутри более крупного семейства молекул, которые имитируют структурные и биологические свойства сиалированных Fc, но не требуют сиалирования, и могут быть разработаны в качестве противовоспалительных терапевтических средств.

Полипептиды и нуклеиновые кислоты.

Полипептиды.

Как раскрыто в данном документе, в данном изобретении предлагаются выделенные полипептиды, содержащие последовательности Fc-вариантов IgG, которые лишены полисахаридной цепи, содержащей концевую сиаловую кислоту, связанную с галактозным компонентом посредством  $\alpha$ -2,6-связи по вышеупомянутому Asn<sup>297</sup>. Такие несиалированные Fc-варианты IgG могут быть либо выделенными из природного антитела, либо могут экспрессироваться в клеточной линии.

В одном варианте осуществления изобретения Fc-участок включает одну или более замен в аминокислотной последовательности hIgG1. В частности, типичные Fc-участки IgG1 представлены ниже:

Fc hIgG1 (начиная с аминокислоты 210 в системе Kabat):

```
KVDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1;
```

F241 и F243 подчеркнуты)

Fc hIgG1 FA241:

```
KVDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
```

2)

Fc hIgG1 FA243:

```
KVDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLAPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
```

3)

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для описания расположения аминокислотных остатков в полимере. Пептид, полипептид или белок могут состоять из 20 стандартных природных аминокислот дополнительно к редким аминокислотам и к их синтетическим аналогам. Они могут представлять собой любую цепь аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования). Пептид, полипептид или белок "по настоящему изобретению" включает рекомбинантно или синтетически полученные варианты, содержащие конкретные домены или участки, которые связываются с DC-SIGN, FcγRIIA и FcγRIIB. Термин также охватывает полипептиды, которые содержат добавленный N-концевой метионин (применяемый для экспрессии в прокариотических клетках).

"Выделенный" полипептид или белок относится к полипептиду или белку, которые отделены от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми они ассоциированы в естественной среде. Полипептид/белок может составлять, по меньшей мере, 10% (то есть любое процентное содержание между 10 и 100%, например, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 и 99%) сухого веса очищенного препарата. Чистота может измеряться с помощью подходящих стандартных методов, например с помощью колоночной хроматографии, электрофореза на полиакриламидном геле или ВЭЖХ. Выделенный полипептид/белок, описанный в изобретении, может быть очищен из природного источника, может быть получен с помощью технологии рекомбинантных ДНК или с помощью химических методов. Функциональный эквивалент IgG Fc относится к полипептидному производному IgG Fc, например, к участку, содержащему одну или более мутаций, вставок, делеций, укорачиваний, сшитый белок или их комбинации. Он по существу сохраняет активность IgG Fc, то есть способность связываться с соответствующим рецептором и вызывать соответствующий клеточный ответ. Выделенный полипептид может содержать SEQ ID NO: 2. Вообще, функциональный эквивалент, по меньшей мере, на 75% (например, любое число между 75 и 100%, включая, например, 70, 80, 85, 90, 95 и 99%) идентичен SEQ ID NO: 2.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот определяется с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, с модификацией как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы "NBLAST" и "XBLAST" (версии 2.0) Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Нуклеотидные поиски "BLAST" могут быть осуществлены с помощью программы "NBLAST" (сумма баллов =100, размера "слова" =12) для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по изобретению. Белковый поиск "Blast" может быть осуществлен с помощью программы "XBLAST" (сумма баллов =50, размер "слова" =3) для получения аминокислотных последовательностей гомологичных белковым молекулам по изобретению. В случае существования пропусков между двумя последовательностями может применяться Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ "BLAST" и "Gapped BLAST" могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, "XBLAST" и "NBLAST").

Аминокислотный состав полипептида, описанного в данном документе, может варьироваться без нарушения способности полипептида связываться с соответствующим рецептором и вызывать соответствующий клеточный ответ. Например, он может содержать одну или несколько консервативных аминокислотных замен. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую замену, в которой аминокислотный остаток замещается остатком, имеющим похожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи, известны в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), с кислыми боковыми цепями

(например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, предсказанный незначительный аминокислотный остаток, например в SEQ ID NO: 2, предпочтительно заменяется на другой аминокислотный остаток из аминокислоты того же семейства боковых цепей. Альтернативно мутации могут вводиться случайным образом по всей последовательности или в ее части, как, например, с помощью насыщенного мутагенеза, и полученные в результате мутанты могут скринироваться на способность связываться с соответствующим рецептором и вызывать соответствующий клеточный ответ для идентификации мутантов, которые сохраняют активность, как описано ниже в примерах. Полипептид, описанный в данном изобретении, может быть получен в виде рекомбинантного полипептида. Для получения рекомбинантного полипептида нуклеиновая кислота, кодирующая его (например, FA241, SEQ ID NO: 2), может быть связана с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей шитый партнер по взаимодействию, например, глутатион-S-трансферазу (GST), метку 6x-His эпитопа или белок гена 3 M13. Полученная в результате шитая нуклеиновая кислота экспрессирует в подходящих клетках-хозяевах шитый белок, который может быть выделен с помощью методов, известных в данной области. Выделенный шитый белок может быть дополнительно обработан, например, с помощью ферментативного гидролиза для удаления шитого партнера и с получением рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению.

Нуклеиновые кислоты.

Другой аспект изобретения характеризует выделенную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, которая кодирует полипептид или белок, описанный выше. Нуклеиновая кислота относится к молекуле ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекуле РНК (например, мРНК) или к аналогу ДНК или РНК. Аналог ДНК или РНК может быть синтезирован из нуклеотидных аналогов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. "Выделенная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, структура которой не идентична структуре любой природной нуклеиновой кислоты или структуре любого фрагмента природной геномной нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин охватывает, например, (а) ДНК, которая имеет последовательность части природной геномной молекулы ДНК, но не фланкированной обеими из кодирующих последовательностей, которые фланкируют эту часть молекулы в геноме организма, в котором она присутствует в естественной среде; (b) нуклеиновую кислоту, включенную в вектор или в геномную ДНК прокариотов или эукариотов таким образом, что полученная в результате молекула не идентична любому природному вектору или геномной ДНК; (с) отдельная молекула, такая как кДНК, геномный фрагмент, фрагмент, полученный полимеразной цепной реакцией (ПЦР), или фрагмент рестрикции; и (d) рекомбинантная нуклеотидная последовательность, которая является частью гибридного гена, т.е. гена, кодирующего шитый белок. Нуклеиновая кислота, описанная выше, может использоваться для экспрессии шитого белка по настоящему изобретению. Для этой цели специалист может функционально связать нуклеиновую кислоту с подходящими регуляторными последовательностями для генерации экспрессирующего вектора.

Вектор относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую

кислоту, с которой он связан. Вектор может быть способен к автономной репликации или к интеграции в ДНК хозяина. Примеры векторов включают плазмиду, космиду или вирусный вектор. Вектор включает нуклеиновую кислоту в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Предпочтительно вектор включает одну или несколько регуляторных последовательностей, функционально связанных с экспрессируемой последовательностью нуклеиновой кислоты.

"Регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Регуляторные последовательности включают те, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности, а также тканеспецифичные регуляторные и/или индуцируемые последовательности.

Конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, уровень экспрессии целевого белка или РНК и тому подобное. Экспрессирующий вектор может вводиться в клетки-хозяева с получением полипептида по настоящему изобретению. Промотор определяется как ДНК-последовательность, которая направляет РНК-полимеразу для связывания с ДНК и инициации синтеза РНК. Сильный промотор представляет собой такой промотор, который вызывает инициацию мРНК с высокой степенью частоты.

Любой полипептид, как упомянуто выше, или биологически эквивалентный полинуклеотид, доступный специалисту для таких же специальных целей, может вводиться в соответствующий экспрессирующий вектор и связываться с другими молекулами ДНК с образованием "рекомбинантных молекул ДНК", экспрессирующих данный рецептор. Эти векторы могут состоять из ДНК или РНК; для большинства целей клонирования ДНК-векторы являются предпочтительными. Типичные векторы включают плазмиды, модифицированные вирусы, бактериофаг и космиды, дрожжевые искусственные хромосомы и другие формы эпизомной или интегрированной ДНК. Специалисту в данной области хорошо известно, как определить подходящий вектор для конкретного применения.

Множество векторов, экспрессирующих в клетках млекопитающих, может использоваться для экспрессии вышеупомянутых IgG Fc в клетках млекопитающих. Как отмечено выше, экспрессирующие векторы могут представлять собой ДНК-последовательности, которые требуются для транскрипции клонированной ДНК и трансляции их мРНК в соответствующем хозяине. Такие векторы могут использоваться для экспрессии эукариотической ДНК во множестве хозяев, таких как бактерии, сине-зеленые водоросли, растительные клетки, клетки насекомых и животные клетки. Специфически сконструированные векторы дают возможность переноса ДНК между хозяевами, такими как бактериальные-дрожжевые клетки или бактериальные-животные клетки. Соответствующим образом сконструированный экспрессирующий вектор должен содержать: последовательность начала репликации для автономной репликации в клетках-хозяевах, селективируемые маркеры, ограниченное количество применяемых сайтов ферментов рестрикции, потенциал для высокого количества копий и активные промоторы. Экспрессирующие векторы могут включать в частности клонирующие векторы, модифицированные клонирующие векторы, специально сконструированные плазмиды и вирусы. Коммерчески доступные векторы, экспрессирующие в клетках млекопитающего, которые могут быть подходящими, включают в частности pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 and pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMClneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460) и IZD35 (ATCC 37565).

Также в рамках изобретения клетка-хозяин, которая содержит вышеописанную нуклеиновую кислоту. Примеры включают клетки E.coli, клетки насекомых (например, с использованием бакуловирусных экспрессирующих векторов), дрожжевых клеток или клеток млекопитающих. См., например, Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Для получения полипептида по настоящему изобретению специалист может культивировать клетку-хозяин в среде при условиях, дающих возможность экспрессии полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой по изобретению, и очистки полипептида из культивируемых клеток или из культуральной среды. Альтернативно нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, с использованием промоторных регуляторных последовательностей T7 и T7-полимеразы.

Все из природных IgG Fc, генетически сконструированных IgG Fc и химически синтезированных IgG Fc могут использоваться для практического осуществления изобретения, раскрытого в данном документе. IgG Fc, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК, могут содержать такую же аминокислотную последовательность, как [FA241] SEQ ID NO: 2) или ее функциональный эквивалент. Термин "IgG Fc" также охватывает химически модифицированные варианты. Примеры химически модифицированных IgG Fc включают IgG Fc, подвергнутые конформационному изменению, вставке или делеции сахарной цепи, и IgG Fc, с которым связано соединение, такое как полиэтиленгликоль.

Специалист может проверить эффективность полученного таким образом полипептида/белка с использованием животной модели, такой как трансгенная мышь, как описано ниже. Любое статистически значимое увеличение *in vivo* экспрессии IL-33 базофилами или экспрессии FcγRIIB рецептора на эф-

факторных макрофагах выявляет полипептид/белок, который является кандидатом для лечения расстройства, упомянутого ниже. В одном варианте осуществления изобретения вышеописанные анализы могут быть основаны на измерении связывания с белком DC-SIGN или с клетками DC-SIGN<sup>(+)</sup>. В данной области известно множество методов, доступных специалисту, которые подходят для измерения способности соединения связываться с DC-SIGN или с DC-SIGN<sup>(+)</sup> клетками и связанных с этим изменений в экспрессии гена, регулирующегося белками сигнального пути DC-SIGN, такого как IL-33. Специалист способен смешивать и комбинировать эти разнообразные исследовательские инструменты без излишнего экспериментирования. После очистки и тестирования с помощью стандартных методов или согласно анализам и методам, описанным в примерах ниже, несиалированные варианты IgG Fc могут быть включены в фармацевтическую композицию для лечения воспалительных расстройств.

При использовании в данном документе термин "антитело" используется в широком смысле и специфически охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и антигеновые фрагменты при условии, что они демонстрируют целевую биологическую активность.

При использовании в данном документе термин "антительные фрагменты" может включать часть интактного антитела, как правило, включающую антигенсвязывающий или переменный участок интактного антитела или Fc-участок антитела, который сохраняет FcR-связывающую активность. Примеры антительных фрагментов включают линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, образованные из антительных фрагментов. Антительные фрагменты предпочтительно сохраняют, по меньшей мере, часть шарнира и необязательно СН1-участок тяжелой цепи IgG. Более предпочтительно антительные фрагменты сохраняют цельный константный участок тяжелой цепи IgG и включают легкую цепь IgG.

При использовании в данном документе термин "Fc-фрагмент" или "Fc-участок" используется для определения C-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина. "Fc-участок" может представлять собой нативную последовательность Fc-участка или вариант Fc-участка. Хотя связи Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-участок тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как фрагмент от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до его карбоксильного конца.

"Нативная последовательность Fc-участка" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруженного в естественной среде. Специалисту в данной области понятно, что "вариант Fc-участка" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-участка посредством, по меньшей мере, одной "аминокислотной модификации". Предпочтительно вариант Fc-участка содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью Fc-участка или с Fc-участком исходного полипептида, например, примерно от одной примерно до десяти аминокислотных замен, и предпочтительно примерно от одной примерно до пяти аминокислотных замен в нативной последовательности Fc-участка или в Fc-участке исходного полипептида. В данном документе вариант Fc-участка предпочтительно будет иметь, по меньшей мере, примерно 75 или 80% гомологии с нативной последовательностью Fc-участка и/или с Fc-участком исходного полипептида и более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 90% гомологии с ним, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 95% гомологии, еще более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 99% гомологии.

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" используются для описания рецептора, который связывается с Fc-участком антитела. В одном воплощении изобретения FcR представляет собой нативную последовательность человеческого FcR. В другом воплощении FcR, включающий человеческий FcR, связывается с IgG-антителом (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включающие аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. FcγRII-рецепторы включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют похожие аминокислотные последовательности, которые отличаются главным образом в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене (см., обзор Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu Rev Immunol*, 9, 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4, 25-34 (1994); и de Haas et al., *J Lab Clin Med*, 126, 330-41 (1995), Nimmerjahn and Ravetch 2006, Ravetch Fc Receptors in *Fundamental Immunology*, ed William Paul 5th Ed., каждый из которых включен в данный документ ссылкой).

Термин "нативный" или "исходный" относится к немодифицированному полипептиду, включающему аминокислотную последовательность Fc. Исходный полипептид может включать нативную последовательность Fc-участка или Fc-участок с уже существующими аминокислотными модификациями (такими как вставки, делеции и/или замены).

Композиции.

В рамках настоящего изобретения композиция, которая содержит подходящий носитель и один или

более агентов, описанных выше, таких как несиалированные Fc-варианты IgG. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, или косметическую композицию, которая содержит косметически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, делающим композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*. "Фармацевтически приемлемый носитель" после введения объекту не вызывает нежелательных физиологических эффектов. Носитель в фармацевтической композиции должен быть "приемлемым" также в том смысле, что он совместим с активным ингредиентом и может быть способен его стабилизировать. Один или более стабилизирующих агентов могут применяться в качестве фармацевтических носителей для доставки активного соединения. Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают в частности биосовместимые носители, адъюванты, добавки и разбавители для доставки композиции, применяемой в качестве лекарственной формы. Примеры других носителей включают коллоидный оксид кремния, стеарат магния, целлюлозу и лаурил сульфат натрия.

Вышеописанная композиция, во многих формах описанная выше, может использоваться для лечения расстройств, характеризующихся воспалением. Эффективное количество относится к количеству активного соединения/агента, которое требуется для придания терапевтического эффекта объекту, подвергающемуся лечению. Специалисту в данной области понятно, что эффективные дозы будут варьироваться в зависимости от типов заболеваний, подвергаемых лечению, пути введения, применения эксципиента и возможности совместного использования с другим терапевтическим лечением.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться парентерально, перорально, назально, ректально, местно или буккально. При использовании в данном документе термин "парентеральный" относится к подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, внутриартериальной, внутрисиновиальной, надчревной, внутриоболочечной (внутри пораженных тканей) или внутричерепной инъекции, а также к любому подходящему методу инфузии.

Стерильная композиция для инъекций может представлять собой раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. Такие растворы включают в частности 1,3-бутандиол, маннит, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, фиксированные масла подходящим образом применяются в качестве растворителя или суспендирующей среды (например, синтетические моно- или диглицериды). Жирная кислота, такая как в частности олеиновая кислота и ее глицеридные производные, применимы в препарате для инъекций, поскольку являются природными фармацевтически приемлемыми маслами, такими как в частности оливковое масло или касторовое масло, их полиоксиэтилированные варианты. Эти масляные растворы или суспензии также могут содержать длинноцепочечный спиртовой разбавитель или диспергирующий агент, такой как в частности карбоксиметилцеллюлоза или похожие диспергирующие агенты. Другие широко используемые поверхностно-активные вещества, такие как в частности TWEENS или SPANS или другие похожие эмульгирующие агенты или усилители биодоступности, которые широко используются в производстве фармацевтически приемлемой твердой, жидкой или другой лекарственной формы, также могут использоваться для целей составления композиции.

Композиция для перорального введения может представлять собой любую перорально приемлемую лекарственную форму, включающую капсулы, таблетки, эмульсии и водные суспензии, дисперсии и растворы. В случае таблеток широко используемые носители включают в частности лактозу и кукурузный крахмал. Также, как правило, добавляют смазывающие агенты, такие как в частности стеарат магния. Для перорального введения в капсульной форме применяемые разбавители включают в частности лактозу и сухой кукурузный крахмал. При пероральном введении водных суспензий или эмульсий активный ингредиент может суспендироваться или растворяться в масляной фазе, объединяясь вместе с эмульгирующими или суспендирующими агентами. Если целесообразно, могут быть добавлены некоторые подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтические композиции для местного введения согласно описанному изобретению могут быть составлены в виде растворов, мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Альтернативно местные составы могут быть представлены в форме пластырей или повязок, пропитанных активным(и) ингредиентом(ами), которые необязательно могут включать один или несколько эксципиентов или разбавителей. В некоторых предпочтительных воплощениях местные составы включают материал, который будет усиливать абсорбцию или проникновение активного агента(ов) через кожу или другие подверженные воздействию области. Местная композиция применяется для лечения воспалительных расстройств на коже, включающих в частности экзему, акне, розацеа, псориаз, контактный дерматит и реакции на сумах ядоносный.

Местная композиция содержит безопасное и эффективное количество дерматологически приемлемого носителя, подходящего для применения на коже. "Косметически приемлемая" или "дерматологически приемлемая" композиция или компонент относится к композиции или компоненту, которые подходят для применения в контакте с человеческой кожей без нежелательной токсичности, несовместимости, нестабильности, аллергической реакции и так далее. Носитель дает возможность доставки активного агента и необязательного компонента на кожу в соответствующей концентрации. Таким образом, носи-

тель может действовать в качестве разбавителя, диспергирующего агента, растворителя или подобного для гарантии того, что активные материалы будут применимы и распределены по выбранной мишени в соответствующей концентрации. Носитель может быть твердым, полутвердым или жидким. Носитель может быть представлен в форме лосьона, крема или геля, конкретно в такой форме, которая имеет достаточную консистенцию и предел текучести для предотвращения седиментации активного материала. Носитель может быть инертным или обладает дерматологически полезными свойствами. Также он должен быть физически и химически совместимым с активными компонентами, описанными в данном документе, и не должен чрезмерно ослаблять стабильность, эффективность или другие полезные свойства, ассоциированные с композицией. Местная композиция может представлять собой косметический или дерматологический продукт в форме, известной в данной области для местного или трансдермального применения, включающей растворы, аэрозоли, кремы, гели, пластыри, мазь, лосьон или пенку.

Способы обработки (лечения).

В описанном изобретении предлагаются способы лечения у объекта воспалительного расстройства. Термин "воспалительное расстройство" относится к расстройству, которое характеризуется аномальным или нежелательным воспалением, такому как аутоиммунное заболевание. Аутоиммунные заболевания и расстройства характеризуются хронической активацией иммунных клеток при неактивирующих условиях. Примеры включают псориаз, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит), ревматоидный артрит, псориатический артрит, рассеянный склероз, волчанка, диабет I типа, билиарный первичный цирроз печени и трансплантация.

Другие примеры воспалительных расстройств, которые могут подвергаться лечению с помощью способов по настоящему изобретению, включают астму, инфаркт миокарда, инсульт, воспалительные дерматозы (например, дерматит, экзему, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивницу, некротический васкулит, кожный васкулит, гиперчувствительный васкулит, эозинофильный миозит, полимиозит, дерматомиозит и атонический фасциит), синдром острой дыхательной недостаточности, молниеносный гепатит, заболевания гиперчувствительности легких (например, гиперчувствительный пневмонит, эозинофильная пневмония, гиперчувствительность замедленного типа, интерстициальное заболевание легких (ILD), идиопатический фиброз легких и ILD, ассоциированное с ревматоидным артритом) и аллергический ринит. Дополнительные примеры также включают миастению гравис, юношеский диабет, гломерулонефрит, аутоиммунный тиреоидит, анкилозирующий спондилоартрит, склеродермию, острые и хронические воспалительные заболевания (например, системная анафилаксия или гиперчувствительные реакции, аллергии на лекарственные средства, аллергии на укусы насекомых, отторжение аллотрансплантата и реакция "трансплантат против хозяина") и синдром Шегрена.

"Объект" относится к человеку и к животному, отличному от человека. Примеры животных, отличных от человека, включают позвоночных, например млекопитающих, таких как млекопитающие, отличные от человека, приматы, отличные от человека (конкретно высшие приматы), собака, грызун (например, мышь или крыса), морская свинка, кошка и кролик, и не млекопитающие, такие как птицы, амфибии, рептилии и т.д. В одном варианте осуществления изобретения объектом является человек. В другом варианте осуществления изобретения объектом является экспериментальное животное, отличное от человека, или животное, подходящее в качестве модели заболевания.

Объект, подвергаемый лечению воспалительного расстройства, может быть идентифицирован с помощью стандартных методов диагностики расстройства. Необязательно объект может исследоваться на предмет уровня или процентное содержание одного или нескольких цитокинов или клеток тестируемого образца, полученных из объекта с помощью методов, известных в данной области. Если уровень или процентное содержание на уровне порогового значения или ниже (которое может быть получено для здорового объекта), то объект является кандидатом для лечения, описанного в данном документе. Для подтверждения ингибирования или лечения специалист может оценить и/или подтвердить уровень или процентное содержание одного или нескольких вышеупомянутых цитокинов или клеток у объекта после лечения.

"Лечение (treating)" или "лечение (обработка)(treatment)" относится к введению соединения или агента объекту, у которого есть расстройство с целью лечения, облегчения, ослабления, уменьшения, устранения, задержки приступа, предотвращения или улучшения состояния при расстройстве, предотвращения или улучшения симптома расстройства, болезненного состояния, вторичного по отношению к расстройству, или предрасположенности по отношению к расстройству.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения или агента, которое способно производить целевой с медицинской точки зрения результат у объекта, подвергаемого лечению. Способ лечения может осуществляться *in vivo* или *ex vivo*, индивидуально или совместно с другими лекарственными средствами или терапией. Терапевтически эффективное количество может вводиться за одно или несколько введений, применений или дозировок и не предназначено для ограничения конкретного состава или пути введения.

Агент может вводиться *in vivo* или *ex vivo*, индивидуально или совместно с другими лекарственными средствами или терапиями, то есть терапия коктейля. При использовании в данном документе термин "совместное введение" или "совместно вводимые" относится к введению объекту, по меньшей мере, двух



Костномозговые клетки вымывали струей из большой берцовой кости и из бедренной мышцей DC-SIGNtg или SIGNR1<sup>-/-</sup> и высевали в 10см-планшеты, обработанные для нетканевых культур, в ростовой среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 1% Пен/Стреп, IL-3 (5 нг/мл, PEPROTECH) и M-CSF (5 нг/мл, PEPROTECH). После ночной инкубации при 37°C неприкрепленные клетки извлекали и переносили в 10см-планшеты, обработанные для нетканевых культур, содержащие ростовую среду RPMI с добавкой IL-3/M-CSF, и культивировали в течение 5-7 дней при 37°C. Зрелые макрофаги трипсинизировали и высевали в 6-луночные планшеты с плотностью  $2 \times 10^6$  клеток/на лунку и давали им возможность прикрепиться в течение ночи. На следующий день макрофаги стимулировали с использованием указанного препарата рекомбинантного Fc в течение 30 мин при 37°C. Клетки извлекали, промывали холодным PBS и внутривенно вводили  $1 \times 10^6$  клеток мышам C57BL/6 дикого типа. Через один час после инъекции реципиентных мышей заражали сывороткой K/BxN. Экспрессия и очистка растворимого человеческого DC-SIGN Плазида, содержащая кДНК-последовательность внеклеточного домена (ECD) человеческого DC-SIGN, была предоставлена К. Drickamer. Кодирующую последовательность DC-SIGN ECD модифицировали для введения N-концевой стреп-метки с помощью стандартных методов ПЦР и лигировали с pET28b(+). pET28b-strepDCSIGN трансформировали в E.coli штамм BL21/DE3 и растили в 3 л ростовой среды TB при 37°C до момента достижения бактериальной культурой OD<sub>600</sub> 0,7-0,8. Экспрессию белка индуцировали путем добавления 100 мг/л IPTG и культуры инкубировали при 37°C в течение 3,5 ч. Бактерии осаждали путем центрифугирования при 4000×g в течение 10 мин при 4°C. Осадки бактерий ресуспендировали в 10 мМ Трис-HCl, pH 7,8, и лизировали обработкой ультразвуком. Тельца включения осаждали путем центрифугирования при 10000×g в течение 15 мин при 4°C и солубилизировали в 100 мл 6 М гуанидин-HCl; 100 мМ Трис-HCl, pH 7,8; 0,2% TRITON X-100. Твердые примеси удаляли путем центрифугирования при 20000×g в течение 30 мин при 4°C, и надосадочную фракцию диализовали против 250 мМ NaCl; 25 мМ Трис-HCl, pH 7,8; 25 мМ CaCl<sub>2</sub>. После диализа нерастворимые осадки удаляли путем центрифугирования при 20000хd в течение 30 мин при 4°C, и надосадочную фракцию применяли к смоле strep-tactin (NOVAGEN) для сбора strep-меченных DC-SIGN ECD. Связанный белок элюировали из смолы с использованием элюирующего буфера, предоставленного производителем (NOVAGEN). Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE, и положительные фракции объединяли и загружали на манноза-агарозную колонку для селекции активных рецепторов. DC-SIGN ECD элюировали с помощью 250 мМ NaCl; 25 мМ Трис-HCl, pH 7,8; 5 мМ EDTA. Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE.

Поверхностный плазмонный резонанс.

Для определения взаимодействия между различными препаратами рекомбинантного Fc с растворимым hDC-SIGN или hFcγRs, записывали измерения равновесной аффинности на сенсор Biacore T100. Рецепторы, разведенные до 20-50 мкг/мл в NaOAc pH 5, иммобилизовали на чипах CM5 с высокой плотностью (2000 RU) с помощью стандартной конденсации аминогрупп. Для взаимодействий hDC-SIGN инъекции осуществляли при скорости потока 20 мкл/мин с коммерчески доступным буфером HBS-P+, доведенным до pH 9, и с добавлением 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ NaCl. Для взаимодействий hFcγRs инъекции осуществляли со скоростью потока 20 мкл/мин с коммерчески доступным буфером HBS-EP+. Поверхности регенерировали с использованием короткой обработки 50 мМ NaOH. Значения K<sub>d</sub> рассчитывали после вычитания фонового связывания с контрольной проточной ячейкой с использованием программного обеспечения Biacore Evaluation.

ОТ-ПЦР.

Суммарную РНК экстрагировали из костномозговых макрофагов с использованием набора реагентов RNeasy Mini kit (QIAGEN). Один микрограмм суммарной РНК использовали для анализа экспрессии IL-33 мРНК с помощью ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов OneStep RT-PCR kit (QIAGEN). Экспрессия GAPDH служила в качестве контроля загрузки. ПЦР-праймеры для mIL-33: 5'-gaagatccsaagaagacc-3' (SEQ ID NO: 6) и 5'-ttccggagcgcagacgtcac-3' (SEQ ID NO: 7); и mGAPDH: 5'-gscgcctggagaacactgc-3' (SEQ ID NO: 8) и 5'-tgaggtcaccaccctgttg-3' (SEQ ID NO: 9). Условия ПЦР: 94°C в течение 30 с; 55°C в течение 30 с; 72°C в течение 60 с×35 циклов (IL-33) или 25 циклов (GAPDH).

Пример 2. α-2,6-связанная сиаловая кислота придавала DC-SIGN-связывающую активность рекомбинантному человеческому IgG1 Fc.

Минорная популяция антител в IVIG-препаратах подавляет воспаление, индуцированное аутоантигенами. Эти антитела, содержащие концевую α-2,6-связанную сиаловую кислоту на Fc-гликаны, опосредуют противовоспалительный ответ путем связывания с SIGNR1 на макрофагах периферической области или с его человеческим ортологом DC-SIGN, на миелоидных клетках.

Для изучения взаимодействия sFc с DC-SIGN растворимую форму внеклеточного домена DC-SIGN (DC-SIGN ECD) очищали из бактерий и иммобилизовали на CM5-чипах. sFc получали из полноразмерных антител IDEC-114 и сиалировали *in vitro* (фиг. 1b) и специфично связывали с DC-SIGN-конъюгированной поверхностью (фиг. 1a). Измерения равновесной аффинности проводили, и значение K<sub>D</sub> для данного взаимодействия рассчитывали как  $\sim 1,3 \times 10^{-6}$  М (фиг. 1c). Напротив, несиалированная гликоформа IDEC-114 Fc продемонстрировала отсутствие связывающей активности с DC-SIGN, предпо-

лагающее, что сиалирование индуцирует конформационные изменения в остове Fc с обнаружением сайта связывания DC-SIGN.

Как представлено на фиг. 1а, было обнаружено, что рекомбинантный  $\alpha$ -2,6-sFc связывался с растворимым DC-SIGN согласно измерениям поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Fc получали с помощью папаинового расщепления полноразмерного человеческого моноклонального антитела IgG1 (IDEC-114) с последующими *in vitro* реакциями галактозилирования и сиалирования. Сенсограммы SPR для антитела, связывающегося с иммобилизованным DC-SIGN, представлены для сиалированных и галактозилированных гликоформ hIgG1 Fes, как описано выше в примере 1. Было обнаружено, что концентрация Fc, проходящая потоком через DC-SIGN ECD, колеблется в интервале 3-0,8 мкм. Как представлено на фиг. 1b, лектиновый блот с SNA подтвердил прикрепление сиаловой кислоты с 2,6-связью на Fc (верхняя панель); окрашенные кумасси контроли представлены на нижней панели. Измерение равновесной  $K_D$  связывания sFc с DC-SIGN (как представлено в а) рассчитывали с помощью пакета программ Biacore Evaluation.

Пример 3. Мутация, разрушающая взаимодействия Fc-гликан, придавала DC-SIGN-связывающую активность рекомбинантному человеческому IgG1 Fc.

Сердцевинная олигосахаридная цепь, присоединенная к Asn<sup>297</sup>, делает экстенсивными нековалентные взаимодействия с аминокислотным остовом Fc. Конформационные изменения в Fc, индуцированные с помощью различных сахарных остатков, присоединенных к сердцевинному гликану, опосредуются с помощью этих белок-углеводных взаимодействий. Замены аланина, которые ликвидируют ключевые контактные точки между остовом Fc и остатками гликана, по-видимому, обеспечивают DC-SIGN-связывающую активность.

Как представлено на фиг. 2А, мутации FA241 и FA243 демонстрируют DC-SIGN-связывающую активность без *in vitro* ферментативной обработки. Истинные значения  $K_D$  колеблются от  $6 \times 10^{-7}$  М для FA241 до  $3 \times 10^{-7}$  М для FA243. Предыдущие сообщения выявляют, что эти мутации повышают сиалирование антител, в основном делая гликан более доступным гликозилтрансферазам при экспрессии в клетках млекопитающего. Для подтверждения этого осуществляли опыт с лектиновым блотом для определения того, что связывание FA241 и FA243 с DC-SIGN осуществляется благодаря повышенному сиалированию транзитивно экспрессированных белков. Как представлено на фигуре 2В, SNA-блоты не детектировали концевых остатков сиаловой кислоты в очищенных FA241 и FA243, указывая, что взаимодействие DC-SIGN было независимым от модификации сиаловой кислоты.

Более конкретно остатки F241, F243, D265 и R301 аминокислотного остова IgG1 Fc заменяли аланином для нарушения нековалентных взаимодействий с олигосахаридными остатками. Fc экспрессировали и очищали из клеток 293Т и анализировали на предмет DC-SIGN-связывающей активности с использованием поверхностного плазмонного резонанса, как описано выше. Было обнаружено, что Fc, несущие мутации FA241 или FA243, демонстрировали повышенную аффинность к DC-SIGN по отношению к измерениям аффинности для sFc (фиг. 1а). Проводили опыты с лектиновыми блотами с ECL (фиг. 1b, средняя панель) и SNA (верхняя панель) для определения концевых сахарных компонентов на Fc, очищенных из клеток 293Т. В качестве положительного контроля для сиалированных Fc FA241 сиалировали *in vitro*, как описано на фиг. 1а. Окрашенные кумасси контроли загрузки представлены на нижней панели фиг. 1b.

Пример 4. Мутация FA241 в hIgG1 Fc повторяла противовоспалительную активность  $\alpha$ -2,6 sFc.

Если мутации FA241 и FA243 имитируют DC-SIGN-связывающую активность sFc, то проводили анализы для исследования того, могут ли эти мутации повторять противовоспалительную активность sFc *in vivo*. Подобранных по возрасту и полу мышей SIGNR1<sup>-/-</sup> и hDC-SIGN<sup>+</sup>/SIGNR1<sup>-/-</sup> заражали с помощью артритогенной сыворотки К/ВхN и обрабатывали с помощью sFc, FA241 или FA243 с эффективной дозой 0,033 г/кг. Согласно с предыдущими открытиями, sFc подавлял опухоль стопы у мышей DC-SIGN<sup>+</sup>, но не у мышей SIGNR1<sup>-/-</sup>. Аналогично мутация FA241 демонстрировала противовоспалительную активность, сравнимую с противовоспалительной активностью sFc у мышей hDC-SIGN<sup>+</sup>/SIGNR1<sup>-/-</sup>. Мыши, которым вводили FA243, демонстрировали отсутствие уменьшения воспаления сустава. Эти открытия предполагают, что рекомбинантные Fc, несущие мутацию F241A (FA241), повторяли связывание DC-SIGN и противовоспалительную активность sFc в отсутствие модификации сиаловой кислоты.

Как представлено на фигуре 3, мышам hDC-SIGN<sup>+</sup>/SIGNR1<sup>-/-</sup> (белые квадраты) и SIGNR1<sup>-/-</sup> (черные квадраты) вводили с помощью 0,7 мг/на мышь sFc, FA241 или FA243 внутривенной инъекции. Затем мышей заражали с помощью К/ВхN сыворотки через 1 ч. Опухание стоп отслеживали и оценивали в течение нескольких дней. Как сообщалось ранее, противовоспалительная активность sFc является DC-SIGN-зависимой (левая панель). FA241 также подавляла артритное воспаление у зараженных мышей К/ВхN DC-SIGN-зависимым образом, FA243 не уменьшала в значительной степени опухания стопы на 6-й день. Средние значения и SEM клинических бальных оценок 4-5 мышей на группу наносили на график на 6-й день.

Пример 5. Отличительные требования для противовоспалительной активности FA241.

Для идентификации детерминант для противовоспалительной активности FA241 костномозговые

макрофаги (ВММФ) из мышей CD11c.DC-SIGN<sup>+</sup> и SIGNR1<sup>-/-</sup> стимулировали с помощью FA241 или других Fc-препаратов и переносили реципиентным мышам WT C57BL/6, зараженным сывороткой K/BxN.

Вкратце костномозговые макрофаги из мышей CD11c.DC-SIGN<sup>+</sup> и SIGNR1<sup>-/-</sup> культивировали в присутствии IL-3 (5 нг/мл) и M-CSF (5 нг/мл) в течение 5-7 дней. Как представлено на фигуре 4, DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ стимулировали с помощью 0,5 мг/мл несиалированных (черные полоски) или сиалированных (белые полоски) гликоформ указанных Fc-препаратов. Fc-обработанные ВММФ переносили реципиентным мышам WT C57BL/6 с последующим заражением K/BxN. Как представлено на фигуре 4b SIGNR1<sup>-/-</sup> (черные полоски) и DC-SIGN<sup>+</sup> (белые полоски) ВММФ стимулировали с помощью 0,5 мг/мл указанного Fc-препарата и переносили реципиентным мышам WT C57BL/6 с последующим заражением K/BxN. Аналогично, DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ стимулировали с помощью либо 0,5 мг/мл FA241 или дегликозилированного FA241 (фиг. 4с, белые полоски) либо с помощью PBS (фиг. 4с, черная полоска) и переносили реципиентным мышам WT C57BL/6 с последующим заражением K/BxN. FA241 дегликозилировали с помощью PNG-азы F и удаление гликана подтверждали с помощью лектинового блоттинга. DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ стимулировали с помощью указанного несиалированного Fc-препарата или с помощью PBS (фиг. 4d, черный круг) и переносили реципиентным мышам WT C57BL/6 с последующим заражением K/BxN. Во всех случаях опухоль стоп отслеживали и оценивали в течение нескольких дней. Средние значения и стандартные ошибки средних значений (SEM) клинических бальных оценок 4-5 мышей на группу наносили на график. \*P<0,05, как определено с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), с последующим апостериорным тестом Тьюки.

Как представлено на фиг. 4А, несиалированные и сиалированные FA241-препараты были эффективны в равной степени в подавлении воспаления сустава по сравнению с sFc. Однако WT Fc-препараты требовали  $\alpha$ -2,6-связанной сиаловой кислоты, так как DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ, стимулированные асилированным WT Fc, не передавали защиту реципиентным мышам. Соответственно результатам, представленным на фиг. 3, обоим, sFc и FA241, требовалась экспрессия DC-SIGN на ВММФ для передачи защиты (фиг. 4B). Хотя FA241 не требует сиаловой кислоты для передачи защиты, дегликозилирование с помощью PNG-азы F отменяло противовоспалительные свойства FA241 (фиг. 4C), предполагая, что Fc гликан все равно необходим. Кроме того, для демонстрации того, что наблюдаемая противовоспалительная активность специфична для мутации F241A, DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ стимулировали с помощью Fc, несущих альтернативные мутации, которые не придают повышенного связывания DC-SIGN. Только PA241-стимулированные ВММФ защищали зараженных реципиентных мышей K/BxN.

Пример 6. Мутация FA241 повышала связывание рецептора Fc $\gamma$ .

Если замена аланина в положении 241 индуцирует конформационное изменение в Fc, то возможно будет изменяться аффинность к человеческим рецепторам Fc $\gamma$ . Ранее сообщалось, что сиалирование уменьшает аффинность IgG к Fc $\gamma$ R, ослабляя вследствие этого активность ADCC *in vivo*.

Связывание рекомбинантных IgG1 Fc с растворимыми Fc $\gamma$ R измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Fc готовили способом, описанным выше. Сенсограммы SPR для связывания антитела с иммобилизованным hFc $\gamma$ RIIA<sub>131R</sub> и hFc $\gamma$ RIIB представлены на фиг. 5 для несиалированных и сиалированных гликоформ WT hIgG1 Fc и для несиалированной формы FA241 Fc.

Как представлено на фиг. 5, несиалированные гликоформы WT Fc связывались с hFc $\gamma$ RIIA и RIIB с наблюдаемым значением  $K_D \sim 2-3 \times 10^{-5}$  М. Однако sFc, по-видимому, не связывались ни с hFc $\gamma$ RIIA, ни с RIIB. Неожиданно обнаружилось, что FA241, по-видимому, связываются с обоими, hFc $\gamma$ RIIA и RIIB, с аффинностью более высокого порядка ( $K_D \sim 2 \times 10^{-6}$  М).

Пример 7. Индуцирование IL-33 мРНК в костномозговых макрофагах с помощью FA241.

sFc индуцирует T<sub>H</sub>2-зависимый противовоспалительный путь, который требует секреции IL-4 из популяции лейкоцитов Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup>, вероятно, базофилов, для положительной регуляции Fc $\gamma$ RIIB на регуляторных макрофагах. Введение IL-33 *in vivo* или *in vitro* стимулирует базофилы для высвобождения запасов IL-4. Экспрессия IL-33 мРНК положительно регулируется в селезенке мышей WT C57BL/6, обработанных с помощью sFc или IVIG, но не у мышей SIGNR1<sup>-/-</sup>. Это предполагает, что sFc может индуцировать экспрессию IL-33 в клетках SIGNR1<sup>+</sup> или DC-SIGN<sup>+</sup>. В данном примере анализы проводили и продемонстрировали, что стимулирование DC-SIGN<sup>+</sup> ВММФ с помощью FA241, по-видимому, положительно регулирует экспрессию IL-33.

Более конкретно, костномозговые макрофаги из мышей CD11c.DC-SIGN<sup>+</sup> и SIGNR1<sup>-/-</sup> культивировали способом, описанным выше. ВММФ высевали на 12-луночные планшеты в бессывороточной среде RPMI и давали возможность прикрепиться в течение ночи при 37°C. На следующий день клетки стимулировали с помощью 0,5 мг/мл указанного Fc в бессывороточной среде RPMI в течение 1 ч (фиг. 6a) или 4 ч (фиг. 6b) при 37°C. мРНК собирали из клеток в конкретные моменты времени и 1 мкг суммарной РНК использовали для ОТ-ПЦР амплификации IL-33 мРНК (верхние панели). Амплификация GAPDH служила в качестве контроля загрузки (нижние панели). Плазмидой, совместно экспрессирующей DA265 Fc и человеческую сиалилтрансферазу (ST6Gal1), трансфецировали в клетки 293T с получением высоко-сиалированного рекомбинантного Fc (ST6-DA265).

Как представлено на фигуре б, стимулирование DC-SIGN<sup>+</sup> ВММф с помощью FA241, по-видимому, положительно регулирует экспрессию IL-33. Несмотря на высокий базальный уровень экспрессии IL-33 по сравнению с DC-SIGN<sup>+</sup> ВММф, SIGNR1<sup>-/-</sup> ВММф отрицательно регулировали экспрессию IL-33 мРНК в ответ на обработку FA241.

Вышеописанный пример и описание предпочтительных вариантов осуществления следует понимать в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения настоящего изобретения, определенного формулой изобретения. Все публикации, процитированные в данном документе, включены в настоящий документ ссылкой в полном объеме. Понятно, что многочисленные вариации и комбинации признаков, представленных выше, могут применяться, не выходя при этом за рамки настоящего изобретения, представленного в формуле изобретения. Такие вариации не рассматриваются как выходящие за рамки изобретения, и подразумевается, что все такие вариации включены в рамки следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сиалированный полипептид, включающий модифицированную последовательность, которая, по меньшей мере, на 75% идентична Fc-участку IgG1, включающему SEQ ID NO: 2, где аминокислотный остаток 241 (пронумерованный согласно системе Kabat) полипептида, который соответствует аминокислотному остатку 32 SEQ ID NO: 2, представляет собой аланин (A).

2. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность, по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO: 2.

3. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентична SEQ ID NO: 2.

4. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность, по меньшей мере, на 95% идентична SEQ ID NO: 2.

5. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность, по меньшей мере, на 99% идентична SEQ ID NO: 2.

6. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность включает SEQ ID NO: 2.

7. Полипептид по п.1, где модифицированная последовательность по существу состоит из SEQ ID NO: 2.

8. Применение выделенной нуклеиновой кислоты, включающей последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.1-7, в способе получения указанного полипептида.

9. Экспрессирующий вектор, включающий нуклеиновую кислоту, охарактеризованную в п.8.

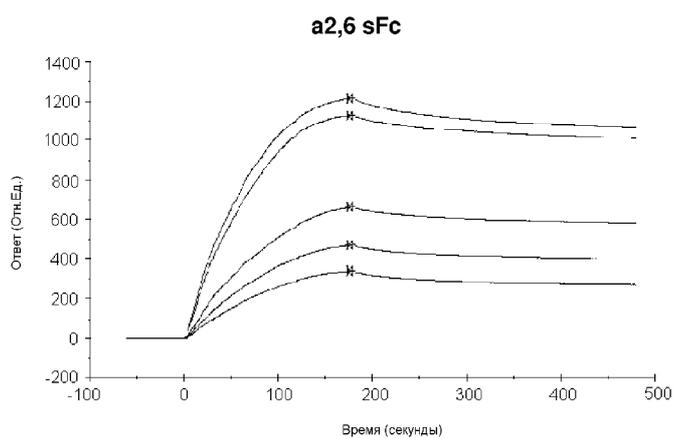
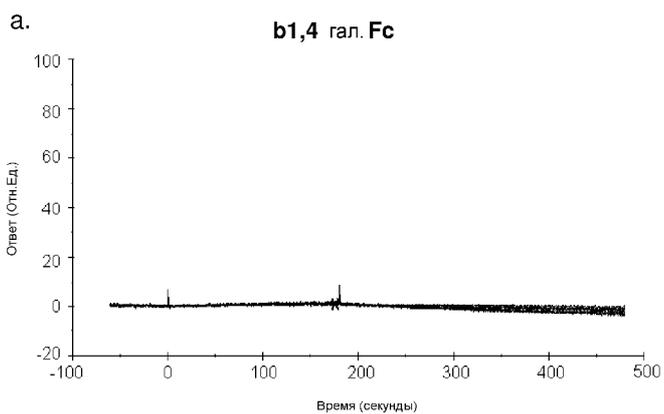
10. Применение клетки-хозяина, включающей нуклеиновую кислоту, охарактеризованную в п.8, в способе получения полипептида по любому из пп.1-7.

11. Способ получения полипептида, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 в среде при условиях, дающих возможность экспрессии полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, охарактеризованной в п.8, и очистку полипептида из культивируемой клетки или из культуральной среды.

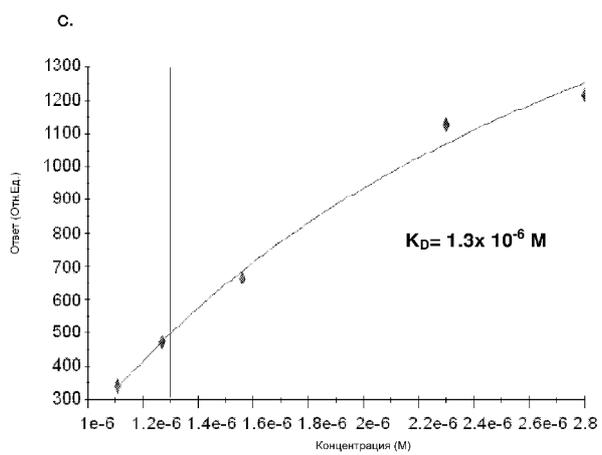
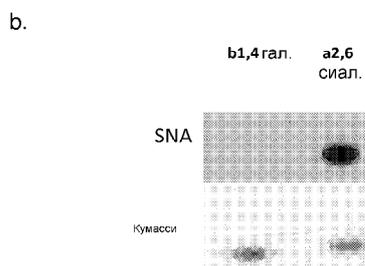
12. Фармацевтическая композиция, включающая: (i) полипептид по любому из пп.1-7 или нуклеиновую кислоту, охарактеризованную в п.8, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп.1-7 или нуклеиновой кислоты, охарактеризованной в п.8.

14. Применение полипептида по любому из пп.1-7 или нуклеиновой кислоты по п.8 в производстве лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

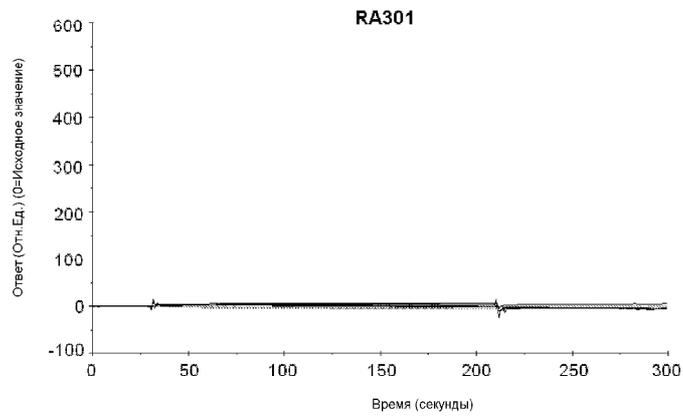
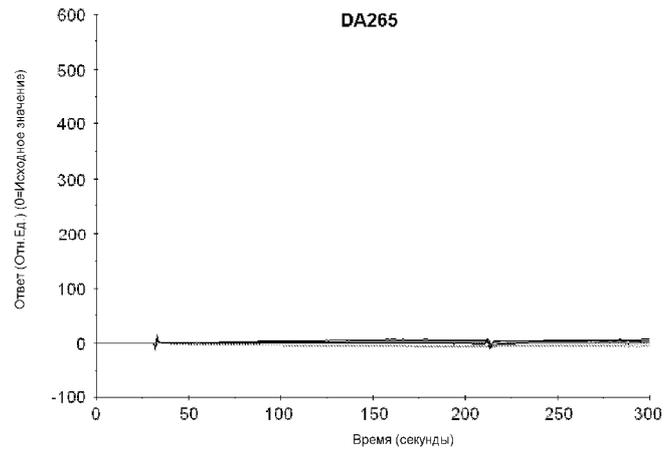
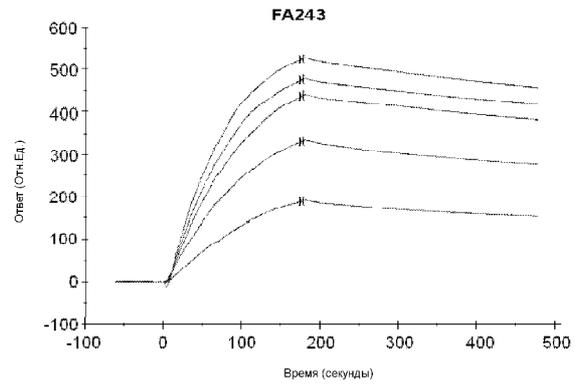
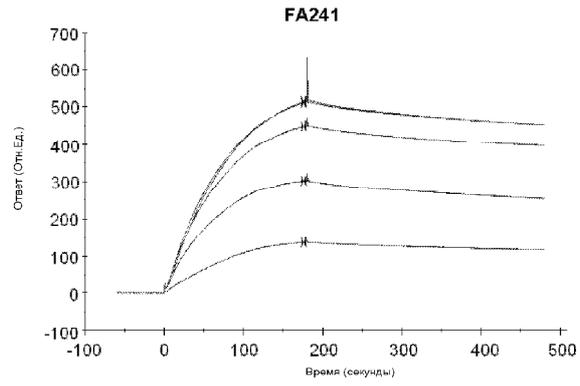


Фиг. 1А

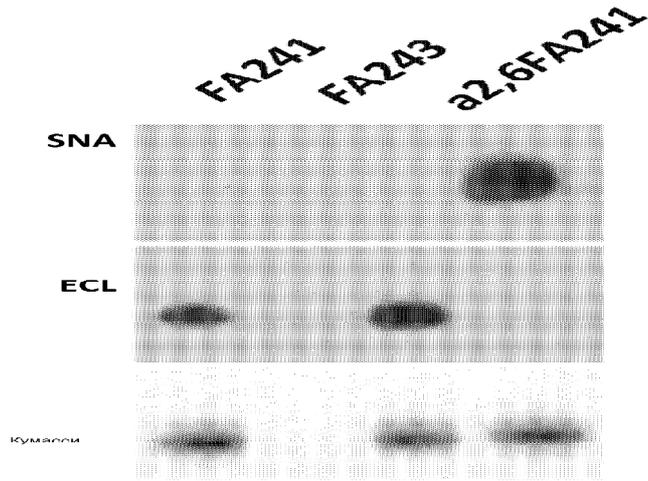


Фиг. 1В-С

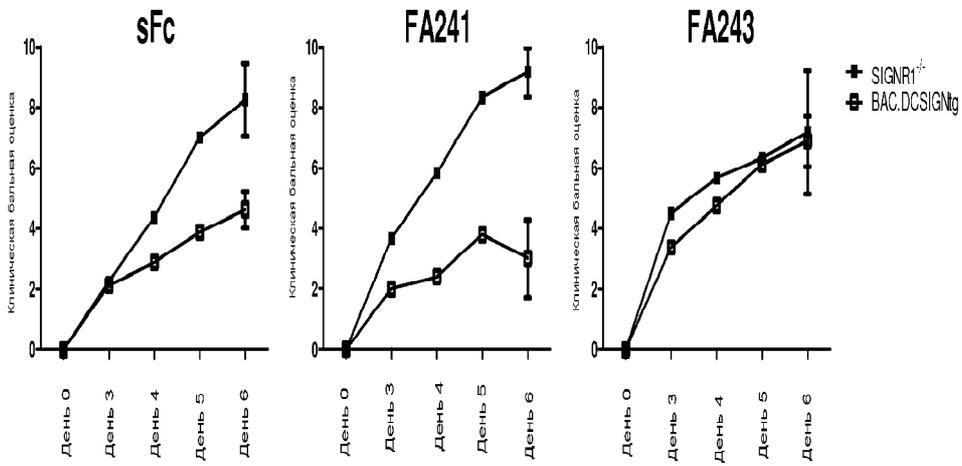
044897



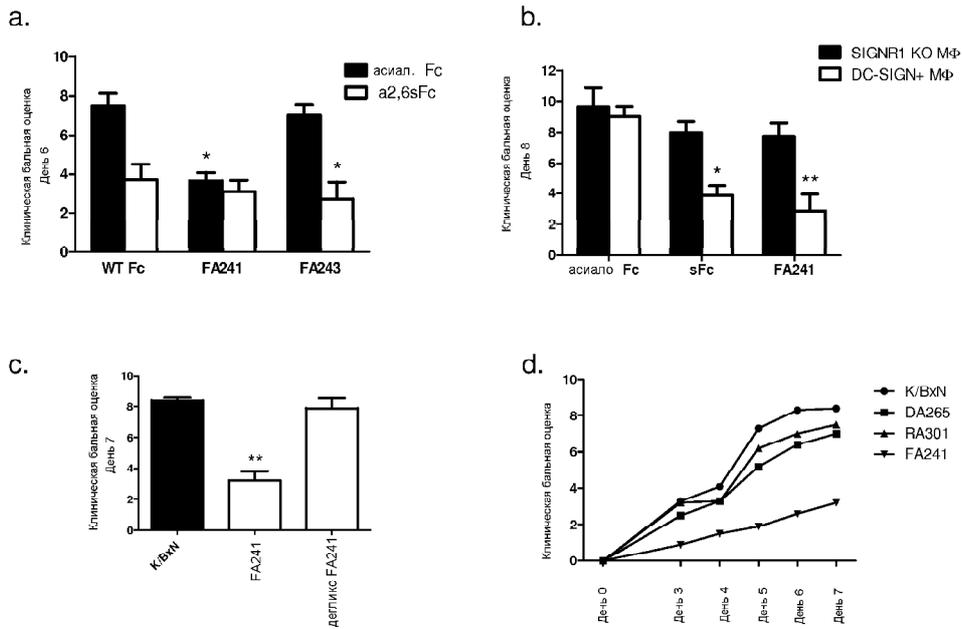
Фиг. 2А



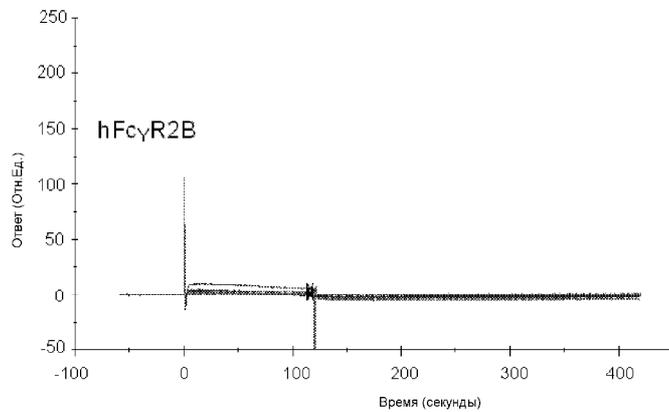
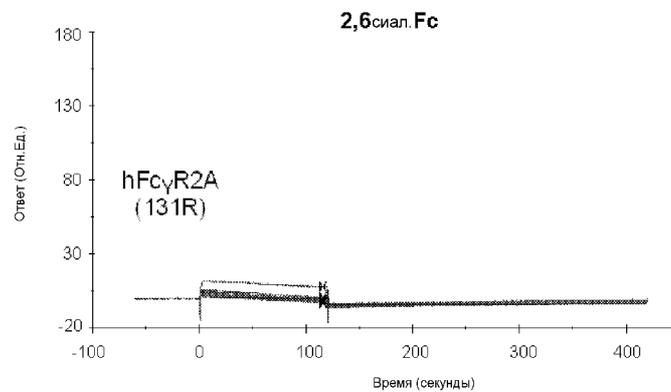
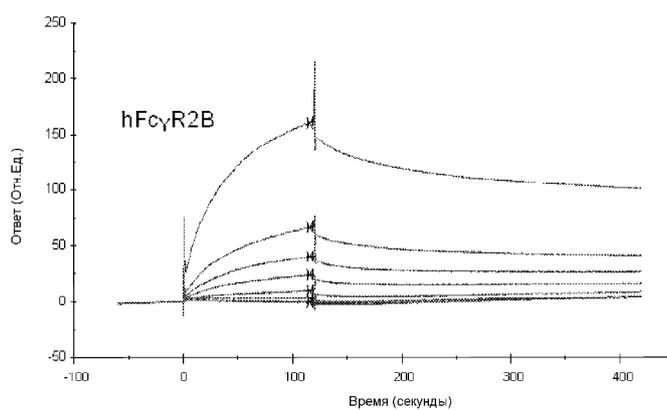
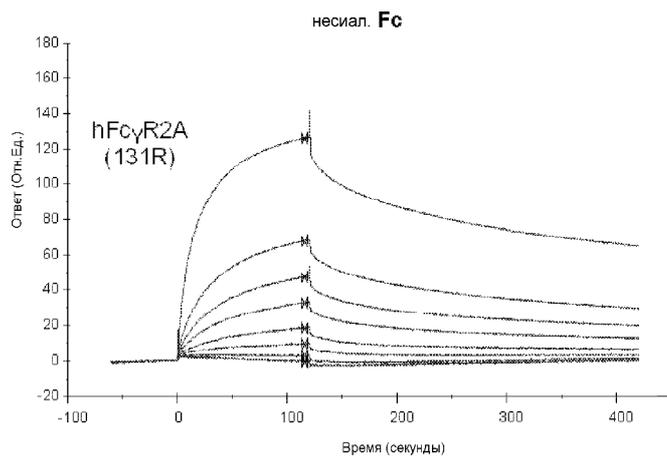
Фиг. 2В

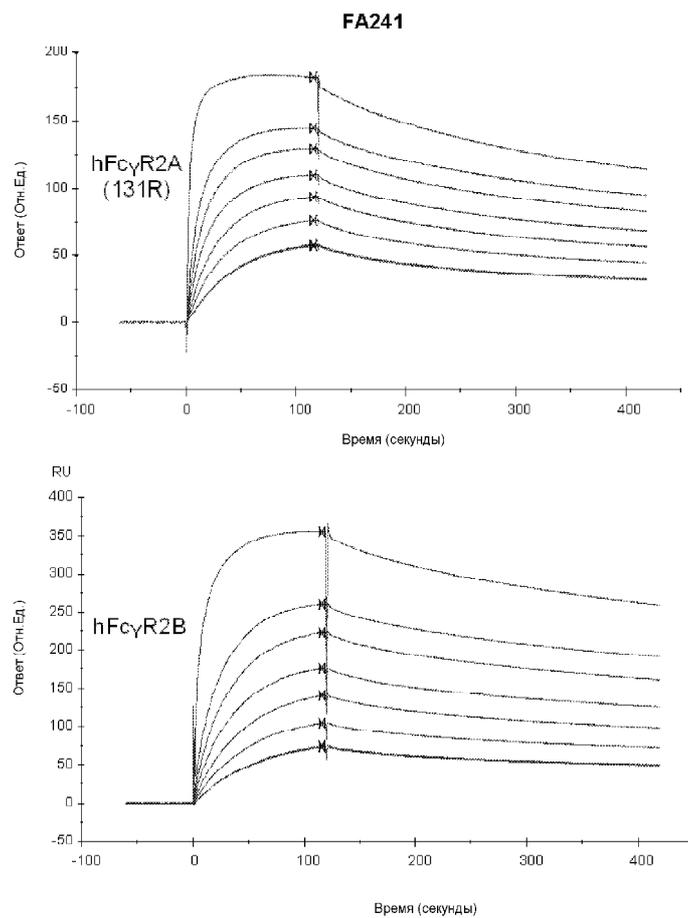


Фиг. 3

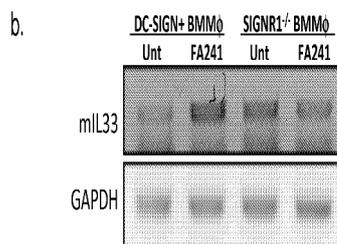
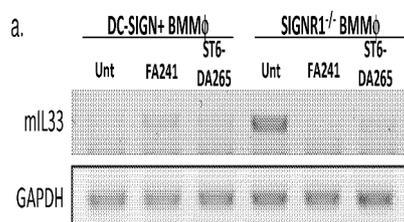


Фиг. 4





Фиг. 5



Фиг. 6