

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391318** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.22

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/573* (2006.01)  
*A61K 38/20* (2006.01)  
*A61P 17/06* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)  
*C07K 14/55* (2006.01)

---

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

---

(31) 63/198,615; 63/123,991

(32) 2020.10.29; 2020.12.10

(33) US

(86) PCT/US2021/057352

(87) WO 2022/094275 2022.05.05

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Ванг Элис Л., Стратерс Мэри,  
Макгорман Кимберли, Рэй  
Ниланджана, Прайс Карэн Д., Шарда  
Нидхи, Хур Еун Ми, Мадия Прианка  
Апурва (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина  
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,  
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.  
(RU)**

---

(57) В изобретении раскрыты способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающие введение субъекту одной или нескольких доз слитого белка интерлейкина-2 (IL2), где доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг. В настоящем документе также раскрыты способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающие введение субъекту дозы слитого белка IL2, где доза составляет более приблизительно 9 мг. Слитые белки IL2, применяемые в способах, раскрытых в настоящем документе, содержат (а) первый полипептид, содержащий полипептид IL2, и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептид рецептора альфа IL2 (IL2R $\alpha$ ). Согласно некоторым аспектам заболевание или нарушение представляет собой иммуноопосредованное заболевание, такое как системная красная волчанка. Согласно некоторым аспектам способы дополнительно предусматривают введение кортикостероида субъекту.

---

**A1**

**202391318**

**202391318**

**A1**

# **СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылка на родственные заявки**

[0001] Согласно настоящей заявке РСТ испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/198615, поданной 29 октября 2020, и предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/123991, поданной 10 декабря 2020, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде**

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в форме текстового файла ASCII (название: 3338.234PC02\_SL\_ST25.txt, размер: 49540 байт и дата создания: 29 октября 2021), поданного вместе с настоящей заявкой, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Область техники настоящего изобретения**

[0003] Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения у субъекта посредством введения одной или нескольких доз слитого белка интерлейкина-2 (IL2)/рецептора  $\alpha$  IL2.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0004] Интерлейкин-2 (IL2 или IL-2) представляет собой биологический цитокин, который регулирует ключевые аспекты иммунной системы. IL-2 применяли при попытках повысить иммунные ответы у пациентов с воспалительным заболеванием или аутоиммунным заболеванием. IL-2 является эффективным фактором роста Т-клеток, который способствует иммунным ответам, включая клональную экспансию антиген-активированных Т-клеток, стимулирует развитие Т-хелперных клеток (Th)1 и Th2 CD4+, окончательно дифференцирует цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD8+ и противостоит развитию Th17 и Т-фолликулярных хелперных клеток (Tfh) CD4+. IL-2 также формирует ответы памяти Т-клеток.

**[0005]** Важность сигнального пути IL-2 для Treg была продемонстрирована появлением системного аутоиммунитета у мышей или людей, у которых отсутствуют компоненты сигнального пути IL-2. Нарушение регуляции количества и/или функции регуляторных T-клеток (Treg) связано с многочисленными иммуноопосредованными состояниями. См., например, Bluestone, J.A., *et al.*, *J Clin Invest.* 125:2250-60 (2015), и Dominguez-Villar, M and Hafler, D.A., *Nat Immunol.* 19:665-73 (2018). Варианты аутоиммунного риска в локусах IL-2, IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  были идентифицированы с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) и связаны с иммуноопосредованными заболеваниями, включая воспалительную болезнь кишечника (IBD), аутоиммунный диабет 1 типа (T1DM), рассеянный склероз (MS) и ревматоидный артрит (RA). См., например, Abbas, A.K., *et al.*, *Sci Immunol.* 3, eaat1482 (2018). Мутации, влияющие на ключевой транскрипционный фактор линии Treg FoxP3, вызывают аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, иммунную дисрегуляцию, полиэндокринопатию, энтеропатию, X-связанный (IPEX) синдром, возникающие в результате потери функциональных Treg. Кроме того, пациенты с дефицитом CD25, возникающим в результате мутаций в IL-2RA, страдают иммунной дисрегуляцией, подобной синдрому IPEX. См., например, Verbsky, J.W. and Chatila, T., *Curr Opin Pediatr.* 25(6):708-14 (2013). Генетические данные согласуются с центральной ролью IL-2 в функции Treg и подавлении аутоиммунитета как у мышей, так и у людей.

**[0006]** Из-за важности эффекта IL-2 на Treg рекомбинантный IL-2 в низких дозах использовали для стратегий иммуносупрессии на основе Treg при иммуноопосредованных заболеваниях. См., например, Saadoun, D., *et al.*, *N Engl J Med.* 365:2067-77 (2011), He, J., *et al.*, *Arthritis Rheumatol.* 67(suppl 10) (2015), Koreth, J., *et al.*, *N Engl J Med.* 365:2055-66 (2011) и Humrich, J.Y., *et al.* *Ann Rheum Dis.* 74:791-2 (2015). Например, системная красная волчанка (SLE) характеризуется состоянием дефицита IL-2, при этом Treg демонстрируют сниженную иммунорегуляторную способность. Низкая доза IL-2 продемонстрировала обнадеживающие клинические преимущества у пациентов с SLE, однако, клиническая польза ограничена из-за необходимости ежедневных инъекций и наблюдения за увеличением провоспалительных цитокинов и не-Treg-клеток. Напротив, высокие дозы IL-2 использовали для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа посредством эффекторных T-клеток. См., например, Rosenberg, S.A., *J Immunol.* 192:5451-8 (2014).

**[0007]** Несмотря на многообещающие результаты этих клинических исследований, терапия рекомбинантным IL-2 в низких дозах ограничена очень коротким периодом полужизни (минуты), что требует частого введения доз, и небольшим окном для активации не-Treg-эффектов, что потенциально ограничивает эффективность. Таким

образом, сохраняется потребность в новых биологических средствах IL2 с улучшенной фармакокинетикой и устойчивостью ответов для применения, например, при лечении инфекционного заболевания и иммуноопосредованного заболевания, как например, SLE.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

**[0008]** Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту одной или нескольких доз слитого белка интерлейкина-2 (IL2), где слитый белок содержит: (a) первый полипептид, содержащий полипептид IL2, и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ), где (i) внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1), и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2), где одна или несколько доз составляют от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг.

**[0009]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, местным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, подоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, интракапсулярным, внутриорбитальным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или внутригрудным путем.

**[0010]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту внутривенным путем. Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят внутривенным путем при дозе от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 9 мг.

**[0011]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту внутривенным путем при дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 7 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 8 мг до приблизительно 9 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 7 мг до приблизительно 8 мг, от



4 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 7 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 6 мг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг или от приблизительно 2 мг до приблизительно 3 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 6 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 6 мг.

**[0016]** Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет приблизительно 1 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 6 мг или приблизительно 8 мг.

**[0017]** Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет более приблизительно 8 мг.

**[0018]** Согласно некоторым аспектам способ предусматривает введение двух или более доз слитого белка с интервалом между введениями двух доз слитого белка. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка составляет по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно два дня, по меньшей мере приблизительно три дня, по меньшей мере приблизительно четыре дня, по меньшей мере приблизительно пять дней или по меньшей мере приблизительно шесть дней. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка составляет по меньшей мере приблизительно одну неделю, по меньшей мере приблизительно две недели, по меньшей мере приблизительно три недели, по меньшей мере приблизительно четыре

недели, по меньшей мере приблизительно месяц, по меньшей мере приблизительно пять недель, по меньшей мере приблизительно шесть недель, по меньшей мере приблизительно семь недель, по меньшей мере приблизительно восемь недель, по меньшей мере приблизительно два месяца, по меньшей мере приблизительно девять недель, по меньшей мере приблизительно десять недель, по меньшей мере приблизительно одиннадцать недель, по меньшей мере приблизительно двенадцать недель или по меньшей мере приблизительно три месяца. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями составляет по меньшей мере приблизительно три недели. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка составляет приблизительно один день, приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней или приблизительно шесть дней. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка составляет приблизительно неделю, приблизительно две недели, приблизительно три недели, приблизительно четыре недели, приблизительно месяц, приблизительно пять недель, приблизительно шесть недель, приблизительно семь недель, приблизительно восемь недель, приблизительно два месяца, приблизительно девять недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель или приблизительно три месяца. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка составляет приблизительно три недели. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка является одинаковым для доз. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями слитого белка является различным для доз. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере одну из двух или более доз слитого белка вводят внутривенно и по меньшей мере одну из двух или более доз слитого белка вводят подкожно. Согласно некоторым аспектам дозу, вводимую внутривенно, вводят до дозы, вводимой подкожно. Согласно некоторым аспектам первую дозу слитого белка вводят внутривенно, а вторую (любую последующую или последнюю) дозу слитого белка вводят подкожно.

**[0019]** Согласно некоторым аспектам заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание, иммуноопосредованное заболевание. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, аутоиммунной глютеновой болезни, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, кожной красной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, системного склероза, реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD), псориаза,

круговой алопеции, васкулита, вызванного вирусом гепатита С, синдрома Шегрена, вульгарной пузырчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаясу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена, воспалительной болезни кишечника, иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии, X-связанного (IPEX) синдрома и синдрома активации макрофагов. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка, волчаночный нефрит или кожная красная волчанка. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка.

**[0020]** Согласно некоторым аспектам способ дополнительно предусматривает введение субъекту кортикостероида. Согласно некоторым аспектам кортикостероид выбран из группы, состоящей из преднизолона, метилпреднизолона, преднизона, гидрокортизона, дексаметазона, бетаметазона, будесонида, триамцинолона, кортизона, дезоксикортикостерона, флудрокортизона и параметазона. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон, метилпреднизолон или преднизон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон.

**[0021]** Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят субъекту местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, местным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, подоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, интракапсулярным, внутриорбитальным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или внутригрудным путем. Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят субъекту местным, пероральным, внутривенным или внутримышечным путем.

**[0022]** Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят до, одновременно с или после каждой дозы слитого белка. Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят до каждой дозы слитого белка. Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят одновременно с каждой дозой слитого белка. Согласно некоторым аспектам две или более доз кортикостероида вводят субъекту с интервалом между введениями каждой дозы. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями кортикостероида составляет по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно два дня, по меньшей мере приблизительно три дня, по меньшей мере приблизительно четыре дня, по меньшей мере приблизительно пять дней, по меньшей мере приблизительно шесть дней, по меньшей мере приблизительно одну неделю, по меньшей мере приблизительно две недели,



по меньшей мере приблизительно три недели, по меньшей мере приблизительно четыре недели, по меньшей мере приблизительно месяц, по меньшей мере приблизительно пять недель, по меньшей мере приблизительно шесть недель, по меньшей мере приблизительно семь недель, по меньшей мере приблизительно восемь недель, по меньшей мере приблизительно два месяца, по меньшей мере приблизительно девять недель, по меньшей мере приблизительно десять недель, по меньшей мере приблизительно одиннадцать недель, по меньшей мере приблизительно двенадцать недель или по меньшей мере приблизительно три месяца. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон, где слитый белок вводят субъекту подкожно два раза в неделю, и где преднизолон вводят субъекту перорально три раза в неделю.

**[0023]** Согласно некоторым аспектам внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, по меньшей мере на два гликозилирования меньше, по меньшей мере на три гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять гликозилирований меньше, по меньшей мере на шесть гликозилирований меньше, по меньшей мере на семь гликозилирований меньше, по меньшей мере на восемь гликозилирований меньше или по меньшей мере на девять гликозилирований меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1).

**[0024]** Согласно некоторым аспектам полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2).

**[0025]** Согласно некоторым аспектам первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 2.

**[0026]** Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 3.

**[0027]** Согласно некоторым аспектам внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$ , имеющий по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, содержит мутацию, которая удаляет гликозилирование. Согласно некоторым аспектам мутация удаляет O-гликозилирование и/или N-гликозилирование. Согласно некоторым аспектам мутация удаляет O-гликозилирование. Согласно некоторым аспектам мутация удаляет N-гликозилирование. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 167 - 219, аминокислот 168 - 219, аминокислот 169 - 219, аминокислот 170 - 219, аминокислот 171 - 219, аминокислот 172 - 219, аминокислот 173 - 219, аминокислот 174 - 219, аминокислот 175 - 219, аминокислот 176 - 219, аминокислот 177 - 219, аминокислот 178 - 219, аминокислот 179 - 219, аминокислот 180 - 219, аминокислот 181 - 219, аминокислот 182 - 219, аминокислот 183 - 219, аминокислот 184 - 219, аминокислот 185 - 219, аминокислот 186 - 219, аминокислот 187 - 219, аминокислот 188 - 219, аминокислот 189 - 219, аминокислот 190 - 219, аминокислот 191 - 219 или аминокислот 192 - 219 в соответствии с SEQ ID NO: 1.

**[0028]** Согласно некоторым аспектам второй полипептид представляет собой SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым аспектам второй полипептид представляет собой SEQ ID NO: 3.

**[0029]** Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен присутствуют при аминокислоте N49, аминокислоте N68, аминокислоте T74, аминокислоте T85, аминокислоте T197, аминокислоте T203, аминокислоте T208 и аминокислоте T216 или любой их комбинации, где положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0030]** Согласно некоторым аспектам одной из замен является аминокислота T85. Согласно некоторым аспектам T85 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0031]** Согласно некоторым аспектам одной из замен является аминокислота T197. Согласно некоторым аспектам T197 заменена на аминокислоту, выбранную из

группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0032]** Согласно некоторым аспектам одной из замен является аминокислота T203. Согласно некоторым аспектам T203 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0033]** Согласно некоторым аспектам одной из замен является аминокислота T208. Согласно некоторым аспектам T208 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0034]** Согласно некоторым аспектам одной из замен является аминокислота T216. Согласно некоторым аспектам T216 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0035]** Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен присутствуют при аминокислоте S50, аминокислоте S51, аминокислоте T69, аминокислоте T70, аминокислоте C192 или любой их комбинации, где положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO: 1.

**[0036]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте S50. Согласно некоторым аспектам S50 заменена на пролин.

**[0037]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте S51. Согласно некоторым аспектам S51 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0038]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте T69. Согласно некоторым аспектам T69 заменена на пролин.

**[0039]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте T70. Согласно некоторым аспектам T70 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидин, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

**[0040]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте C192. Согласно некоторым аспектам C192 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

**[0041]** Согласно некоторым аспектам полипептид IL2, имеющий по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, содержит мутацию, которая удаляет гликозилирование. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену аланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на серин. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на аланин. Согласно некоторым аспектам одна или

несколько замен представляют собой замену цистеина на валин. Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте T3 по сравнению с соответствующей SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте C125, где замена при аминокислоте C125 выбрана из группы, состоящей из C125S, C125A и C125V. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию. Согласно некоторым аспектам делеция присутствует при аминокислоте A1.

**[0042]** Согласно некоторым аспектам слитый белок дополнительно содержит линкер, слитый в рамке считывания между первым полипептидом и вторым полипептидом. Согласно некоторым аспектам линкер представляет собой глицин/сериновый линкер. Согласно некоторым аспектам глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GGGS)_n$ ,  $(GGGGS)_n$  или  $(GGGGS)_n$ , где n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно некоторым аспектам глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность  $(GGGS)_3$ .

**[0043]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 5.

**[0044]** Согласно некоторым аспектам слитый белок дополнительно содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом и/или вторым полипептидом. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент содержит альбумин, константную область иммуноглобулина или ее часть, полипептид, связывающий иммуноглобулин, иммуноглобулин G (IgG), полипептид, связывающий альбумин (ABP), фрагмент PASилирования, фрагмент HESилирования, XTEN, фрагмент ПЭГиления, область Fc и любую их комбинацию.

**[0045]** Согласно некоторым аспектам слитый белок состоит из аминокислотной последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 5.

**[0046]** Согласно некоторым аспектам слитый белок дегликозилируется ферментативно или химически. Согласно некоторым аспектам слитый белок дегликозилируется щелочью, гидразинолизом, PNGазой F, эндо-Н, О-гликозидазой или любой их комбинацией.

**[0047]** Согласно некоторым аспектам слитый белок представляет собой мономер. Согласно некоторым аспектам слитый белок представляет собой димер.

**[0048]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту как часть фармацевтической композиции, содержащей слитый белок и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

### **Краткое описание чертежей**

**[0049]** На фиг. 1А и 1В представлена схематическая диаграмма плана рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования с однократной возрастающей дозой («SAD») фазы 1 (фиг. 1А) и режима однократной возрастающей дозы (фиг. 1В), описанного в Примере 1. Сигнальное дозирование (1:1 BMS-986326 или плацебо) использовали во всех группах. Уровни дозы могут меняться в зависимости от новых данных от предыдущей группы. Максимальный шаг увеличения дозы будет приблизительно в  $\leq 3$  раза выше предыдущего уровня дозы. «IV NOAEL<sup>a</sup>» обозначает максимальную внутривенную (IV) дозу, которая, как ожидается, обеспечит среднее воздействие (площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до бесконечности, «AUC[INF]») до NOAEL (AUC[0-336 часов]  $\leq 757$  мкг•ч/мл) для токсикологического исследования однократной дозы на обезьянах. Группа А6 является необязательной в зависимости от фармакодинамических (PD) результатов предыдущих групп. «SC<sup>b</sup>» обозначает максимальную подкожную (SC) дозу, которая, как ожидается, обеспечит среднее воздействие (AUC[INF]), которое не превысит NOAEL (AUC[0-504 часа]  $\leq 306$  мкг•ч/мл) для 12-недельного (один раз каждые 3 недели) токсикологического исследования SC на обезьянах.

**[0050]** На фиг. 2А-2В показана экспрессия Treg CD25 у мышей NZB  $\times$  NZQ по сравнению с мышами BALB/c. Спленциты мышей NZB  $\times$  NZW (n = 5, возраст 26 недель) или BALB/c (n = 6, возраст 9–10 недель) окрашивали антителами к CD4, Foxp3 и CD25. На фиг. 2А показан процент клеток Foxp3<sup>+</sup> в гейте CD4<sup>+</sup> и процент клеток CD25<sup>+</sup> в гейте CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> у репрезентативных мышей каждой группы. На фиг. 2В показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) Т-клеток CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (среднее  $\pm$  SEM). \*\*\*p<0,001 согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

**[0051]** На фиг. 3А-3Е показано влияние введения mIL-2/CD25 на клетки Treg и не-Treg у мышей BALB/c. Мышей BALB/c (n = 5, возраст 8-10 недель) подвергали лечению mIL-2/CD25 в дни 0, 3 и 6, лечению Fc-IL2 в дни 0, 2, 4 и 6 или лечению PBS в дни 0, 3 и 6. Мышей умерщвляли на 7 день и собирали селезенки для анализа с помощью проточной цитометрии. На фиг. 3А показано процентное содержание клеток Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> среди Т-клеток CD4<sup>+</sup>. На фиг. 3В показано общее количество Т-клеток CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. На фиг. 3С показано общее количество Т-клеток CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>. На фиг. 3D показано общее количество Т-клеток CD8<sup>+</sup>. На фиг. 3Е показано общее количество НК-клеток CD335<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 по сравнению с контрольной группой PBS согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

**[0052]** На фиг. 4A-4D показано ингибирование волчанки введением mIL-2/CD25 мышам NZB × NZW (ранняя стадия заболевания). Самок мышей NZB × NZW F1 (возраст 22–24 недели) с уровнем протеинурии 30 мг/дл подвергали лечению в течение 14 недель PBS или mIL-2/CD25 в дозах 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг (подкожно 2 раза в неделю) или преднизолоном (10 мг/кг, перорально 3 раза в неделю) с  $n = 10$  на группу. Введение mIL-2/CD25 показало зависимое от дозы снижение уровня протеинурии (фиг. 4A), процента мышей с высокой протеинурией (оценка 3 или выше) (фиг. 4B), титров анти-дцДНК IgG (фиг. 4C) и гистологических оценок почек (фиг. 4D).  $**p < 0,01$ ,  $****p < 0,0001$  по сравнению с группой PBS в конце исследования согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

**[0053]** На фиг. 5A-5D показано влияние введения mIL-2/CD25 на Treg у мышей NZB × NZW. Самок мышей NZB × NZW F1 (возраст 22–24 недели) с уровнем протеинурии 30 мг/дл подвергали лечению в течение 4 недель PBS или mIL-2/CD25 в дозах 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг (подкожно 2 раза в неделю) или преднизолоном (перорально 3 раза в неделю) с  $n = 4$  на группу. Введение mIL-2/CD25 (через 48 ч после 8-й дозы) показало зависимое от дозы увеличение процентного содержания Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) в крови (фиг. 5A) и селезенке (фиг. 5B). Процент клеток Ki67<sup>+</sup> (фиг. 5C) и CD25 MFI (фиг. 5D) в гейте Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) также увеличивался зависимым от дозы образом в селезенке.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$  по сравнению с группой PBS согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

**[0054]** На фиг. 6A-6E показано ингибирование волчанки введением mIL-2/CD25 мышам NZB × NZW (распространенное заболевание). Самок мышей NZB × NZW F1 (возраст ~27 недель) с уровнем протеинурии 100 мг/дл подвергали лечению в течение 10 недель PBS или mIL-2/CD25 в дозе 0,1 или 0,3 мг/кг (подкожно 2 раза в неделю),  $n = 12-14$  на группу. Лечение mIL-2/CD25 приводило к зависимому от дозы снижению уровней протеинурии (фиг. 6A), тенденции к снижению титров анти-дцДНК IgG (фиг. 6B), снижению уровней сывороточного IL-12 (фиг. 6C), снижению гистологических оценок почек (фиг. 6D) и увеличению процента клеток CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> в селезенке (фиг. 6E) по завершении исследования.  $*p < 0,05$  по сравнению с группой PBS согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.  $\#p < 0,05$  по сравнению с группой PBS согласно двустороннему Т-критерию.

**[0055]** На фиг. 7A-7E показан эффект комбинированного лечения mIL-2/CD25 и преднизолоном у мышей NZB × NZW. Самок мышей NZB × NZW F1 (возраст 21–23 недели) с уровнем протеинурии 30 мг/дл подвергали лечению в течение 14 недель либо PBS, либо mIL-2/CD25 (0,1 мг/кг подкожно 2 раза в неделю), либо преднизолоном (1 мг/кг перорально

3 раза в неделю), либо комбинацией mIL-2/CD25 (0,1 мг/кг подкожно 2 раза в неделю) и преднизолона (1 мг/кг перорально 3 раза в неделю). Группы высокой дозы преднизолона (10 мг/кг, перорально 3 раза в неделю) и mIL-2/CD25 (0,2 мкг/кг подкожно 2 раза в неделю) были включены в качестве контроля, n = 12 на группу. Показано влияние на уровни протеинурии (фиг. 7A), титры анти-дцДНК антител (фиг. 7B) и гистологические оценки (фиг. 7C). Лечение mIL-2/CD25 показало увеличение процента Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (фиг. 7D) и MFI CD25 в гейте Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (фиг. 7E) в селезенке, в присутствии преднизолона или без него. n = 5 на группу для фиг. 7D и фиг. 7E. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 по сравнению с группой PBS в конце исследования согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

**[0056]** На фиг. 8A-8F показан эффект комбинированного лечения mIL-2/CD25 и преднизолоном на мышах NZB × NZW. По завершении исследования комбинации mIL-2/CD25 и преднизолона, как описано на фиг. 7, собирали почки для анализа ОТ-ПЦР. Дальнейшее снижение экспрессии гена интерферона 1 типа (IFIT1 (фиг. 8A), IFIT3 (фиг. 8B), MX1 (фиг. 8C), IRF7 (фиг. 8D), GBP2 (фиг. 8E) и LIGP1 (фиг. 8F) наблюдали при комбинированном лечении по сравнению с любой монотерапией.

**[0057]** На фиг. 9A-9F показано ингибирование волчанки введением mIL-2/CD25 мышам MRL/lpr. Самцов мышей MRL/lpr (в возрасте 12–14 недель) с уровнем протеинурии 30 мг/дл подвергали лечению в течение 12 недель PBS или mIL-2/CD25 в дозах 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг (подкожно 2 раза в неделю) или преднизолоном (перорально 3 раза в неделю) с n = 10 на группу. Лечение mIL-2/CD25 приводило к зависимому от дозы снижению уровней протеинурии (фиг. 9A), титров анти-дцДНК IgG (фиг. 9B) и гистологических оценок почек (фиг. 9C), и зависимому от дозы увеличению процентного содержания Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) в крови (фиг. 9D) и селезенке (фиг. 9E), и увеличению MFI CD25 в гейте Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) в селезенке (фиг. 9F). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 по сравнению с группой PBS на неделе 12 согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

**[0058]** Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения заболевания или нарушения, аутоиммунного заболевания и/или воспалительного заболевания, например, системной красной волчанки (SLE), у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающим введение субъекту дозы слитого белка интерлейкина-2 (IL2), где слитый белок содержит: (а) первый полипептид, содержащий полипептид IL2, и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа



интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ), где (i) внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1), и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым аспектам доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг. Согласно некоторым аспектам доза составляет более приблизительно 9 мг. Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту внутривенным путем, и доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг. Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту внутривенным путем, и доза составляет более приблизительно 9 мг. Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту подкожным путем, и доза составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту подкожным путем, и доза составляет более приблизительно 8 мг.

**[0059]** Согласно некоторым аспектам способ дополнительно предусматривает введение кортикостероида, например, преднизолона, метилпреднизолона, преднизона, гидрокортизона, дексаметазона, бетаметазона, будесонида, триамцинолона, кортизона, дезоксикортикостерона, флудрокортизона или параметазона.

**[0060]** Для лучшего понимания настоящего изобретения сначала приведены определения некоторых терминов. В контексте настоящего изобретения, если иное прямо не предусмотрено в настоящем документе, каждый из следующих терминов должен иметь значение, указанное ниже. Дополнительные определения изложены по всему описанию.

## **I. Определения**

**[0061]** Для лучшего понимания настоящего изобретения сначала приведены определения некоторых терминов. В контексте настоящего изобретения, если иное прямо не предусмотрено в настоящем документе, каждый из следующих терминов должен иметь значение, указанное ниже. Дополнительные определения изложены по всему описанию.

**[0062]** Следует отметить, что форма единственного числа относится к одному или нескольким, например, «нуклеотидная последовательность» относится к одной или нескольким нуклеотидным последовательностям. Таким образом, форма единственного числа, «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо.

**[0063]** Кроме того, «и/или» при использовании в настоящем документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или одного без другого. Таким образом, термин «и/или» при

использовании в фразе, такой как «А и/или В» в настоящем документе, как подразумевается, охватывает «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Подобным образом, термин «и/или» при использовании в фразе, такой как «А, В и/или С», как подразумевается, охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С, А, В или С, А или С, А или В, В или С, А и С, А и В, В и С, А (отдельно), В (отдельно) и С (отдельно).

**[0064]** Подобным образом, слово «или», как подразумевается, охватывает «и», если из контекста явно не следует иное. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот и все значения молекулярного веса или молекулярной массы, указанные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены для описания.

**[0065]** Понятно, что каждый раз, когда аспекты описываются в настоящем документе с использованием формулировки «содержащий», также охватываются аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «по существу состоящий из».

**[0066]** Термин «приблизительно» применяют в настоящем документе для обозначения приблизительно, примерно, около или в диапазоне. Когда термин «приблизительно» применяют в сочетании с числовым диапазоном, он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. Таким образом, «приблизительно 10-20» означает «от приблизительно 10 до приблизительно 20.» В общем, термин «приблизительно» может модифицировать числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

**[0067]** В контексте настоящего изобретения термин «рекомбинантный» включает экспрессию из генов, полученных с помощью генной инженерии или иным образом путем лабораторных манипуляций.

**[0068]** В контексте настоящего изобретения «интерлейкин-2», «IL2» или «IL-2» относится к любому нативному или рекомбинантному IL2 из любого позвоночного источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термин охватывает непроцессированный IL2, а также любую форму IL2, полученную в результате процессинга в клетке (т.е. зрелую форму IL2). Этот термин также охватывает встречающиеся в природе варианты и фрагменты IL2, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты, и не встречающиеся в природе варианты, которые обладают активностью IL2 встречающегося в природе IL2.

**[0069]** Известны дополнительные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности для IL2. См., например, № доступа в GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (серобрюхая ночная обезьяна)), Q7JFM5 (*Aotus nancymae* (Ma's ночная обезьяна)), P05016 (*Bas taurus* (бык)), Q29416 (*Canis familiaris* (собака) (*Canis lupus familiaris*)), P36835 (*Capra hircus* (коза)) и P37997 (*Equus caballus* (лошадь)).

**[0070]** Биологически активные фрагменты и варианты IL2 сохраняют активность IL2. Фраза «биологическая активность IL2» или «активность IL2» относится к одной или нескольким биологическим активностям IL2, включая без ограничения способность стимулировать лимфоциты, несущие рецептор IL2. Такую активность можно измерить как *in vitro*, так и *in vivo*. IL2 является глобальным регулятором иммунной активности, и эффекты, раскрытые в настоящем документе, представляют собой обобщение таких активностей. Например, он регулирует активность выживания (Bcl-2), индуцирует Т-эффекторную активность (IFN-гамма, гранзим В и перфорин) и/или промотирует Т-регуляторную активность Т (FoxP3).

**[0071]** Биологически активные варианты IL2 известны. См., например, публикации заявок США № 20060269515 и 20060160187 и WO 99/60128.

**[0072]** Термин «секреторная сигнальная последовательность» обозначает полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид («секреторный пептид»), который как компонент более крупного полипептида направляет более крупный полипептид по секреторному пути клетки, в которой он синтезирован. Более крупный полипептид обычно расщепляется для удаления секреторного пептида в ходе прохождения по секреторному пути.

**[0073]** В контексте настоящего изобретения «зрелая» форма слитого белка или полипептида содержит процессированную форму полипептида, из которого был удален секреторный пептид.

**[0074]** В контексте настоящего изобретения «непроцессированная» форма слитого белка сохраняет последовательность секреторного пептида.

**[0075]** В контексте настоящего изобретения термины «CD25», «рецептор IL2  $\alpha$ », «IL2R $\alpha$ » или «IL2Ra» относятся к любому нативному или рекомбинантному IL2R $\alpha$  из любого позвоночного источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), и домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термины также охватывают встречающиеся в природе варианты IL2R $\alpha$ , например, варианты сплайсинга или аллельные варианты, или не встречающиеся в природе варианты, обладающие активностью IL2R $\alpha$ . Человеческий IL2 проявляет свои биологические эффекты посредством передачи сигналов через его

рецепторную систему IL2R. IL2 и его рецептор (IL2R) необходимы для пролиферации Т-клеток и других фундаментальных функций, которые имеют критическое значение для иммунного ответа. IL2R состоит из 3 нековалентно связанных трансмембранных белков типа I, которые представляют собой альфа (p55), бета (p75) и гамма (p65) цепи. Альфа-цепь человеческого IL2R содержит внеклеточный домен из 219 аминокислот, трансмембранный домен из 19 аминокислот и внутриклеточный домен из 13 аминокислот. Секретируемый внеклеточный домен IL2R альфа (IL2R- $\alpha$ ) может применяться в слитых белках, описанных в настоящем документе.

**[0076]** Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности для IL2R $\alpha$  известны. См., например, № доступа в GenBank: NP\_001030597.1 (*Pan troglodytes*), NP\_001028089.1 (*Macaca mulatta*), NM\_001003211.1 (*Canis lupus*), NP\_776783.1 (*Bos taurus*), NP\_032393.3 (*Mus musculus*) и NP\_037295.1 (*Rattus norvegicus*).

**[0077]** Биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL2R $\alpha$  также предусмотрены. Такие активные варианты или фрагменты внеклеточного домена IL2R $\alpha$  будут сохранять активность внеклеточного домена IL2R $\alpha$ . Фраза «биологическая активность внеклеточного домена IL2R $\alpha$ » относится к одной или нескольким биологическим активностям внеклеточного домена IL2R $\alpha$ , включая без ограничения способность связываться с IL2 и/или усиливать внутриклеточную передачу сигналов в клетках, чувствительных к рецептору IL2. Неограничивающие примеры биологически активных фрагментов и вариантов IL2R $\alpha$  раскрыты, например, в Robb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-8 (1988). Согласно некоторым аспектам биологически активные фрагменты и варианты IL2R $\alpha$ , раскрытые в настоящем документе, содержат по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$ .

**[0078]** Термин «встречающийся в природе» в контексте настоящего изобретения применительно к объекту относится к тому факту, что объект обнаруживается в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которую можно выделить из природного источника и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

**[0079]** «Полипептид» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, без ограничения, гликозилирование, фосфорилирование или образование

дисульфидной связи. «Белок» или «слитый белок» может содержать один или несколько полипептидов.

**[0080]** Настоящее изобретение также охватывает фрагменты или варианты полипептидов и любую их комбинацию. Термин «фрагмент» или «вариант», относящийся к связывающим доменам или связывающим молекулам полипептида согласно настоящему изобретению, включает любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из свойств (например, активность связывания IL2 для IL2R $\alpha$ ) эталонного полипептида. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также фрагменты делеции, но не включают встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты связывающих доменов или связывающих молекул полипептида согласно настоящему изобретению включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями вследствие аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с использованием известных в данной области способов мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления.

**[0081]** Как указано выше, варианты полипептида включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гем-фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозита, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилрование, гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилрование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010)), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

**[0082]** В контексте настоящего изобретения термины «аминокислота, соответствующая», «сайт, соответствующий» или «эквивалентная аминокислота» в белке или нуклеотидной последовательности идентифицируют путем выравнивания, чтобы максимизировать идентичность или подобие между первой белковой

последовательностью, например, последовательностью П2, и второй белковой последовательностью, например, второй последовательностью П2. Номер, используемый для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй белковой последовательности, основан на номере, используемом для идентификации соответствующей аминокислоты в первой белковой последовательности. Согласно некоторым аспектам термин «соответствующий» относится к связи мутации при одной или нескольких аминокислотах в полипептиде или при одном или нескольких нуклеотидах в полинуклеотиде. В качестве неограничивающего примера конкретная аминокислота (например, S50) полинуклеотида (например, SEQ ID NO: 1), как раскрыто в настоящем документе, относится к аминокислоте 50 серин в SEQ ID NO: 1.

**[0083]** В контексте настоящего изобретения термин «связанный с» относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. Согласно одному аспекту термин «связанный с» означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. Эта связь может быть обозначена двоеточием, т.е. (:). Согласно другому аспекту она означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиоловой группой на втором остатке цистеина. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают без ограничения пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, дипольную связь, обратную связь Pi, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, сопряжение, гиперсопряжение, ароматичность, гаптность или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (*например*, катион-пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (*например*, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь или симметричную водородную связь), силу Ван-дер-Ваальса, лондонскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

**[0084]** Термин «сопоставимый» в контексте настоящего изобретения означает, что сравниваемые показатель или уровень, полученные в результате использования, например, слитого белок, равны, по существу равны или подобны эталонному показателю

или уровню. Термин «подобный» в контексте настоящего изобретения означает, что сравниваемые показатель или уровень отличаются на не более 10% или не более 15% от эталонного показателя или уровня. Термин «по существу равный» означает, что сравниваемые показатель или уровень отличаются на не более 0,01%, 0,5% или 1% от эталонного показателя или уровня.

**[0085]** Термин «экспрессия» в контексте настоящего изобретения относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид.

**[0086]** «Слияние» или «слитый белок» содержит первую аминокислотную последовательность, связанную в рамке считывания со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана в природе. Аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в отдельных белках, могут быть объединены в слитом полипептиде, или аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в одном и том же белке, могут быть помещены в новое расположение в слитом полипептиде, например, слияние белка IL2 с белком IL2-R $\alpha$ . Слитый белок создается, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области закодированы в желаемом взаимоотношении. Слитый белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью ковалентной непептидной связью или нековалентной связью. При транскрипции/трансляции образуется единый белок. Таким образом, несколько белков или их фрагментов могут быть включены в один полипептид. «Функционально связанный» означает функциональную связь между двумя или более элементами. Например, функциональная связь между двумя полипептидами сливает оба полипептида вместе в рамке считывания с образованием слитого белка одного полипептида. Согласно одному аспекту, слитый белок дополнительно содержит третий полипептид, который, как более подробно обсуждается ниже, может содержать линкерную последовательность.

**[0087]** В контексте настоящего изобретения, термин «BMS-986326» или «BMS-986326-01» относится к рекомбинантному слитому белку человеческого интерлейкина-2 (IL2) и части внеклеточного домена субъединицы альфа рецептора человеческого IL2 (CD25), который образует нековалентную самоблокирующуюся гомодимерную структуру, имеющую массу приблизительно 83 килодальтон (кДа). Фрагменты IL2 и CD25 связаны друг с другом небольшой пептидной линкерной последовательностью (GGGS)<sub>3</sub>. BMS-986326 оптимизирован для пролонгированной фармакокинетики (ПК) и селективности регуляторных Т-клеток (Treg) и обеспечивает агонизм рецептора IL2 (IL2R) низкой дозы. В

качестве неактивного гомодимера BMS-986326 стерически ингибирует связывание IL2R до высвобождения мономера, обеспечивая механизм, позволяющий избежать мишень-опосредованного распределения лекарственного средства (TMDD) и почечного клиренса, а также усиливающий Treg-селективную активность *in vivo* посредством медленного высвобождения активного мономера. Высвобождение мономера позволяет молекуле взаимодействовать с IL2R для инициации передачи сигнала с большей эффективностью и селективностью в отношении клеток, экспрессирующих высокие уровни CD25, таких как Treg. Токсикологические исследования на крысах и обезьянах продемонстрировали приемлемый профиль переносимости BMS-986326. Согласно некоторым аспектам BMS-986326 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 5, которая соответствует SEQ ID NO: 16 в публикации США № 2009-0359672. Публикация США № 2009-0359672 включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0088]** «Fc-область» (область кристаллизующегося фрагмента), «Fc-домен» или «Fc» относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы, (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область включает константную область антитела, за исключением первого домена иммуноглобулина константной области (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD область Fc содержит два идентичных белковых фрагмента, происходящие из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела, Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены CH 2-4) в каждой полипептидной цепи. Изотип IgG делится на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у человека и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Для IgG Fc-область содержит домены иммуноглобулина CH2 и CH3 и шарнир между доменами CH1 и CH2. Хотя определение границ Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина может варьироваться, как определено в настоящем документе, Fc-область тяжелой цепи IgG человека определена как простирающаяся от аминокислотного остатка D221 для IgG1, V222 для IgG2, L221 для IgG3 и P224 для IgG4 до карбокси-конца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу ЕС, как в Kabat. Домен CH2 Fc-области IgG человека простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, а домен CH3 расположен на C-концевой стороне домена CH2 в Fc-области, т.е. он простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 или 446 (при отсутствии C-концевого остатка лизина) или 445 (при отсутствии C-концевых остатков глицина и лизина) IgG. В контексте



настоящего изобретения Fc-область может представлять собой нативную последовательность Fc, включая любой аллотипический вариант или вариант Fc (например, не встречающийся в природе Fc).

**[0089]** «Рецептор Fc» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей, FcγRIA, FcγRII и FcγRIIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецепторов. Различные свойства человеческих FcγR известны в данной области техники. Большинство типов врожденных эффекторных клеток совместно экспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующих FcγRIIB, тогда как естественные клетки-киллеры (NK) селективно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не экспрессируют ингибирующий FcγRIIB у мышей и люди. Человеческий IgG1 связывается с большинством рецепторов Fc человека и рассматривается эквивалентным мышинному IgG2a в отношении типов активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

**[0090]** Термины «вставленный», «вставляют», «вставлен в» или грамматически родственные термины в контексте настоящего изобретения относятся к положению гетерологичного фрагмента (например, фрагмента, продлевающего период полужизни) в слитом полипептиде относительно аналогичного положение в указанном белке. В контексте настоящего изобретения термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида, раскрытого в настоящем документе, и не указывают, не подразумевают и не предполагают каких-либо способов или процессов, с помощью которых был получен слитый полипептид.

**[0091]** «Гетерологичный» и «гетерологичный фрагмент» в отношении полипептида или полинуклеотида представляет собой полипептид или полинуклеотид, происходящий из другого белка или полинуклеотида. Дополнительные компоненты слитого белка могут происходить из того же организма, что и другие полипептидные компоненты слитого белка, или дополнительные компоненты могут быть из другого организма, чем другие полипептидные компоненты слитого белка. Например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или полученным из другого вида, другого типа клеток индивидуума или того же или другого типа клеток разных индивидуумов. Согласно одному аспекту гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом, с образованием слитого полипептида или белка. Согласно другому аспекту гетерологичный фрагмент не представляет собой

полипептид, как например ПЭГ, конъюгированный с полипептидом или белком. Неограничивающими примерами гетерологичных фрагментов, раскрытых в настоящем документе, являются глицин/сериновые линкеры (например, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6) (также упоминается как (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>)).

**[0092]** «Fc-область нативной последовательности» или «нативная последовательность Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Человеческие Fc-области нативной последовательности включают Fc-область IgG1 человека нативной последовательности, Fc-область IgG2 человека нативной последовательности, Fc-область IgG3 человека нативной последовательности и Fc-область IgG4 человека нативной последовательности, а также их встречающиеся в природе варианты. Fc нативной последовательности включают различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1: 1).

**[0093]** Термин «EC<sub>50</sub>» в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием слитого белка относится к концентрации слитого белка, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т.е. находящийся посередине между максимальным ответом и исходным уровнем.

**[0094]** «Консервативные аминокислотные замены» относятся к заменам аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих подобные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Согласно некоторым аспектам предсказанный остаток заменимой аминокислоты в слитом белке IL2 заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-7 (1993), Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-84 (1999), и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-17 (1997)).

**[0095]** Полинуклеотид, который кодирует генный продукт, например, полипептид, может включать промотор и/или другие элементы контроля транскрипции или

трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Другие элементы контроля транскрипции, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующей областью для управления экспрессией генного продукта.

**[0096]** Термины «процентная идентичность последовательности», «процентная идентичность», «идентичность последовательности» или «идентичность» используются взаимозаменяемо и относятся к числу идентичных совпадающих положений, общих для двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей в окне сравнения, с учетом дополнений или делеции (т.е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающее положение представляет собой любое положение, в котором идентичный нуклеотид или аминокислота представлены как в целевой, так и в эталонной последовательности. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, так как гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Подобным образом, гэпы, представленные в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

**[0097]** Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

**[0098]** Процент идентичности последовательности вычисляют путем определения числа положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100, с получением процента идентичности последовательности. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательностей между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием легкодоступного программного обеспечения как для онлайн-использования, так и для загрузки. Подходящие программы доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательности является `bl2seq`, часть набора программ BLAST, доступных на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)). `Bl2seq` выполняет сравнение двух

последовательностей с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN используют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP используют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, входящие в набор программ биоинформатики EMBOSS, которые также доступны в Европейском институте биоинформатики (EBI) на сайте [www.ebi.ac.uk/Tools/psa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa).

**[0099]** Каждая из различных областей в одной целевой последовательности полинуклеотида или полипептида, которая выравнивается с эталонной последовательностью полинуклеотида или полипептида, может иметь свою процентную идентичность последовательности. Следует отметить, что значение процентной идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют до 80,2. Также необходимо отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

**[0100]** Процентную идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью программы GAP в программном пакете GCG (доступно по ссылке [worldwideweb.gcg.com](http://worldwideweb.gcg.com)), используя матрицу NWSgardna.CMP, и штраф за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80, и штраф за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентная идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определена с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, можно определить процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по ссылке <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

**[0101]** Последовательности нуклеиновых кислот и белков, описанные в настоящем документе, можно дополнительно использовать в качестве «запрашиваемой последовательности» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) в Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиски нуклеотидов согласно BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, с получением нуклеотидных

последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиски белка согласно BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в настоящем документе. Для того, чтобы получить выравнивание с гэтпами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402 (1997). При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (*например*, XBLAST и NBLAST). См. [worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov](http://worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov).

**[0102]** В контексте настоящего изобретения «введение» относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Различные пути введения слитого белка IL2, описанного в настоящем документе, включают внутривенный, интраперитонеальный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в контексте настоящего изобретения означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутриартериальную, подбололочечную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно проводить, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более длительных периодов времени.

**[0103]** «Интервал между введениями» в контексте настоящего изобретения означает количество времени, которое проходит между несколькими дозами (двумя или более дозами), вводимыми субъекту. Сравнение интервалов между введениями можно проводить у одного субъекта или популяции субъектов, а затем можно вычислить среднее значение, полученное для популяции. Интервал между введениями может представлять собой период времени между дозой, вводимой одним путем (внутривенным), и дозой, вводимым другим путем (подкожным). Интервал между введениями в контексте

настоящего изобретения относится к двум дозам, которые являются смежными во времени друг с другом.

**[0104]** Термин «иммунный ответ» известен в данной области техники и в общем относится к биологическому ответу у позвоночного против чужеродных агентов или аномальных клеток, который защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредован действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печени (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или элиминации из организма позвоночного вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, или аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунный ответ включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4<sup>+</sup>-клетки, CD8<sup>+</sup>-Т-клетки или Treg-клетки или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, например, NK-клетки.

**[0105]** «Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к агенту, например, агенту, нацеленному на компонент сигнального пути, который может участвовать в модулировании, регулировании или модификации иммунного ответа. «Модулирование», «регулирование» или «модификация» иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки, такой как Th1-клетка). Более конкретно, в контексте настоящего изобретения, термин «модулирование» включает индукцию, ингибирование, потенцирование, усиление, повышение или снижение данной активности или ответа. Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, что может проявляться увеличением или уменьшением количества различных типов клеток, увеличением или уменьшением активности этих клеток или любыми другими изменениями, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы. Согласно некоторым аспектам иммуномодулятор нацелен на молекулу на поверхности Т-клетки. «Иммуномодуляторная мишень» или «иммунорегуляторная мишень» представляет собой молекулу, например, молекулу клеточной поверхности, которая является мишенью для связывания с веществом, агентом, фрагментом, соединением или молекулой и чья активность изменяется в результате связывания. Иммуномодулирующие мишени

включают, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодуляторные рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодуляторные лиганды»).

**[0106]** «Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску возникновения или рецидива заболевания, способом, предусматривающим индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунной системы или иммунного ответа.

**[0107]** «Иммуностимулирующая терапия» или «иммуностимуляторная терапия» относится к терапии, которая приводит к увеличению (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта.

**[0108]** «Усиление эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или мощности существующего иммунного ответа у субъекта. Это повышение эффективности и мощности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

**[0109]** «Т-эффекторные» («T<sub>eff</sub>») клетки относятся к Т-клеткам (например, Т-клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) с цитолитической активностью, а также к Т-хелперным (Th) клеткам, например, клеткам Th1, которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают регуляторные Т-клетки (Treg-клетки). Определенные слитые белки IL2, описанные в настоящем документе, активируют клетки T<sub>eff</sub>, например, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub> клетки и Th1 клетки.

**[0110]** Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может быть результатом повышенной агонистической активности костимулирующих рецепторов Т-клеток и/или повышенной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может отражаться кратным увеличением EC<sub>50</sub> или максимальным уровнем активности в анализе, который измеряет иммунный ответ, например, анализе, который измеряет изменения в высвобождении цитокинов или хемокинов, цитолитическую активность (определяемую непосредственно на клетках-мишенях или косвенно посредством обнаружения CD107a или гранзимов) и пролиферацию. Способность стимулировать иммунный ответ или активность иммунной системы может быть увеличена на по меньшей мере 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз или более.

**[0111]** Термины «связанный» и «слитый» в контексте настоящего изобретения относятся к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности,

соответственно. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно соединена или объединена со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью, или альтернативно промежуточная последовательность может ковалентно соединять первую последовательность со второй последовательностью. Термин «связанный» означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку всей первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) в любые две аминокислоты во второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности, соответственно). Согласно одному аспекту первая аминокислотная последовательность связана со второй аминокислотной последовательностью пептидной связью или линкером. Первая нуклеотидная последовательность может быть связана со второй нуклеотидной последовательностью фосфодиэфирной связью или линкером. Линкер может быть пептидом или полипептидом (для полипептидных цепей) или нуклеотидом или нуклеотидной цепью (для нуклеотидных цепей) или любым химическим фрагментом (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Термин «связанный» также обозначается знаком (-).

**[0112]** В контексте настоящего изобретения термин «ответ, опосредованный Т-клетками» относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки (например, CD8<sup>+</sup> клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> клетки). Ответы, опосредованные Т-клетками, включают, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

**[0113]** В контексте настоящего изобретения термин «ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)» относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы CTL опосредуются в первую очередь Т-клетками CD8<sup>+</sup>.

**[0114]** В контексте настоящего изобретения термины «ингибирует» или «блокирует» (например, относящиеся к ингибированию/блокированию связывания IL2 с IL2R $\alpha$  на клетках) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2 ингибирует связывание IL2 с IL2R $\alpha$  на по меньшей мере приблизительно 50%, например, приблизительно 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, как определено, например, как далее описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2 ингибирует связывание IL2 с IL2R $\alpha$  на не более 50%, например, на приблизительно 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%, как определено, например, как далее описано в настоящем документе.



**[0115]** Термины «лечить», «лечение» и «обработка» в контексте настоящего изобретения относятся к любому типу осуществляемого вмешательства или процесса или введению активного агента субъекту с целью обратить вспять, облегчить, улучшить, ингибировать или замедлить или предотвратить прогрессирующее, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием, или повышения общей выживаемости. Лечение можно проводить в отношении субъекта, страдающего заболеванием, или субъекта, у которого нет заболевания (например, для профилактики). При профилактическом применении слитый белок, описанный в настоящем документе, вводят до появления любого симптома. Профилактическое введение вещества служит для предотвращения или ослабления любого последующего симптома.

**[0116]** Под «повышением эффективности» или «усилением иммуногенности» в отношении слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины подразумевается улучшение результата, например, измеряемого изменением конкретного значения, такое как увеличение или уменьшение конкретного параметра активности слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины, связанного с защитным иммунитетом. Согласно одному аспекту улучшение относится к по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% увеличению конкретного параметра. Согласно другому аспекту улучшение относится к по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% уменьшению конкретного параметра. В одном примере повышение эффективности/иммуногенности вакцины относится к увеличению способности вакцины ингибировать или лечить прогрессирующее заболевание, например, по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% повышение эффективности вакцины для этой цели.

**[0117]** Подобным образом, под «преодолением подавленного иммунного ответа» в отношении слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины подразумевается улучшение результата, например, измеряемого изменением конкретного значения, как например, возвращение к ранее положительному значению конкретного параметра активности вакцины, связанного с защитным иммунитетом. Согласно одному аспекту преодоление относится к по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% повышению конкретного параметра. В одном примере преодоление подавленного иммунного ответа слитым белком, фармацевтической композицией или вакциной относится к возобновлению способности слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины ингибировать или лечить прогрессирующее заболевание, как например, по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% восстановление эффективности вакцины для этой цели.

**[0118]** Терапевтическая доза», «доза» или «дозированное количество», используемые (взаимозаменяемо) в настоящем документе, означают дозу, которая достигает терапевтической цели, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам «терапевтическая доза» означает дозу, которая индуцирует иммунную толерантность у субъекта. Согласно определенным аспектам «терапевтическая доза» означает дозу, которая индуцирует иммунную толерантность у субъекта в течение определенного времени до периода толерантности, например, в течение 12 недель после введения первой дозы, чтобы вызвать желаемый биологический ответ. Как понятно специалисту в данной области техники, абсолютное количество конкретного слитого белка П2, которое является эффективным, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, доставляемый слитый белок П2, клетка-мишень или ткань и тому подобное. Специалисту в данной области техники также понятно, что эффективное количество можно вводить в виде одной дозы или может быть достигнуто введением нескольких доз (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз). Способность терапевтического агента способствовать регрессу заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания можно оценить с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники, например, на людях в ходе клинических испытаний, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность у человека, или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

**[0119]** «Лечить», «лечение» или «обработка» в контексте настоящего изобретения относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или состояния, сокращению продолжительности течения состояния, уменьшению или устранению одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, оказанию благоприятных эффектов у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, без обязательного излечения заболевания или состояния.

**[0120]** «Фармацевтический состав» или «фармацевтическая композиция» в контексте настоящего изобретения относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому следует вводить фармацевтический состав или композицию. Фармацевтический состав или композиция могут быть стерильными. Согласно некоторым аспектам фармацевтический состав или композиция подходит для терапевтического применения у субъекта-человека.

**[0121]** Термин «пациент» включает субъектов-людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

**[0122]** В контексте настоящего изобретения термин «субъект» включает любого человека или животное, отличное от человека. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения субъекта, страдающего иммунным заболеванием. Термин «животное, отличное от человека» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д.

**[0123]** Термин «основанная на массе» доза или дозирование, как раскрыто в настоящем документе, означает, что дозу, вводимую пациенту, вычисляют на основе массы пациента. Например, когда пациенту с массой тела 60 кг требуется 3 мг/кг анти-IL2 антитела, можно рассчитать и использовать соответствующее количество слитого белка IL2 (например, 180 мг) для введения.

**[0124]** Использование термина «фиксированная доза» в отношении способов и доз, описанных в настоящем документе, означает дозу, которую вводят пациенту без учета массы или площади поверхности тела (BSA) пациента. Таким образом, фиксированная доза представлена не как доза в мг/кг, а скорее как абсолютное количество агента (например, слитого белка IL2). Например, человек с массой 60 кг и человек с массой 100 кг получат одинаковую дозу антитела (например, 480 мг слитого белка IL2).

**[0125]** В контексте настоящего изобретения термины «мкг» и «мкМ» используются взаимозаменяемо с «мкг» и «мкМ», соответственно.

**[0126]** В контексте настоящего изобретения термин «исследуемый продукт» или «IP» включает BMS-986326, а также плацебо (0,9% хлорида натрия). В некоторых случаях исследуемые продукты можно вводить субъекту любыми способами, известными в данной области техники, как например, внутривенно или подкожно.

**[0127]** Любые композиции или способы, представленные в настоящем документе, могут быть объединены с одной или несколькими из любых других композиций и способов, раскрытых в настоящем документе.

**[0128]** Ссылки на нумерацию аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов или областей иммуноглобулинов основаны на Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD. (Рецептор FcRn был выделен у нескольких видов млекопитающих, включая человека. Последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши известны (Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994).) Fc может содержать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Иллюстративные варианты Fc представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199.

**[0129]** Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой метрической системой единиц измерения (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записывают слева направо в ориентации от amino к карбокси. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут быть получены путем ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание в целом.

**[0130]** Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press, The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press, and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь многих терминов, используемых в настоящем раскрытии.

**[0131]** Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны более подробно в следующих подразделах.

## **II. Способы лечения заболевания или нарушения у субъекта**

**[0132]** Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающим введение субъекту одной или нескольких доз слитого белка интерлейкина-2 (IL2), где слитый белок содержит (a) первый полипептид, содержащий полипептид IL2, и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ), где (i) внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1), и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению дополнительно предусматривает введение субъекту кортикостероида. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон, будесонид, триамцинолон, кортизон, дезоксикортикостерон, флудрокортизон или параметазон.

**[0133]** Важность сигнального пути IL-2 для Treg была продемонстрирована появлением системного аутоиммунитета у мышей или людей, у которых отсутствуют

компоненты сигнального пути IL-2. Нарушение регуляции количества и/или функции клеток Treg связано с многочисленными иммуноопосредованными состояниями. См., например, Bluestone, J.A., *et al.*, *J Clin Invest.* 125:2250-60 (2015), и Dominguez-Villar, M and Hafler, D.A., *Nat Immunol.* 19:665-73 (2018). Варианты аутоиммунного риска в локусах IL-2, IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  были идентифицированы с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) и связаны с иммуноопосредованными заболеваниями, включая воспалительную болезнь кишечника (IBD), аутоиммунный диабет 1 типа (T1DM), рассеянный склероз (MS) и ревматоидный артрит (RA). См., например, Abbas, A.K., *et al.*, *Sci Immunol.* 3, eaat1482 (2018). Мутации, влияющие на ключевой транскрипционный фактор линии Treg FoxP3, вызывают аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, иммунную дисрегуляцию, полиэндокринопатию, энтеропатию, X-связанный (IPEX) синдром, возникающие в результате потери функциональных Treg. Кроме того, пациенты с дефицитом CD25, возникающим в результате мутаций в IL-2RA, страдают иммунной дисрегуляцией, подобной синдрому IPEX. См., например, Verbsky, J.W. and Chatila, T., *Curr Opin Pediatr.* 25(6):708-14 (2013). Генетические данные согласуются с центральной ролью IL-2 в функции Treg и подавлении аутоиммунитета как у мышей, так и у людей.

**[0134]** В общем полагают, что основным механизмом, посредством которого дефицит IL-2 способствует потере толерантности и иммунопатологии у пациентов с SLE, является нарушение гомеостаза Treg. См., например, Klatzmann, D., and Abbas, A.K., *Nat Rev Immunol.* 15:283-94 (2015), и Ballesteros-Tato, A. and Papillon, A., *Curr Opin Immunol.* 61:39-45 (2019). В то время как некоторые исследования предполагают относительное увеличение частоты Treg у пациентов с активным заболеванием SLE, было сообщено, что эти Treg имеют более низкую экспрессию CD25, что предполагает функциональное нарушение. См., например, Von Spee-Mayer, C., *et al.*, *Ann Rheum Dis.* 75:1407-15 (2016). Хотя функциональное нарушение Treg у пациентов с SLE полностью не изучено, три независимых клинических исследования SLE продемонстрировали увеличение количества Treg и снижение активности заболевания, а также увеличение количества Treg после лечения низкими дозами IL-2. См., например, He, J., *et al.*, *Arthritis Rheumatol.* 67(suppl 10) (2015), Humrich, J.Y., *et al.* *Ann Rheum Dis.* 74:791-92 (2015), и Von Spee-Mayer, C., *et al.*, *Ann Rheum Dis.* 75:1407-15 (2016). Связь между введением низких доз IL-2, экспансией Treg и снижением иммунопатологии была показана при других формах иммуноопосредованных нарушений, включая диабет первого типа (см., например, Dwyer, C.J., *et al.*, *Curr Diab Rep.* 16:46 (2016)), васкулит, вызванный вирусом гепатита C, (см., например, Dupont, G., *et al.*, *Cytokine.* 69:146-9 (2014)), круговую алопецию (см., например, Castela, E., *et al.*, *JAMA Dermatol.* 150:748-51 (2014)) и GvHD (см., например, Koreth, J., *et al.*, *N Engl J Med.*

365:2055-66 (2011)). Эти исследования указывают на причинно-следственную связь между IL-2-зависимой экспансией Treg и клиническими преимуществами, наблюдаемыми после лечения низкими дозами IL-2.

**[0135]** Системная красная волчанка (SLE) была описана как состояние дефицита IL2, и дефицит IL-2 связан с прогрессированием SLE. См., например, Mizui, M. and Tsokos, G.C., *Front Immunol.* 9: Article 786 (2018). Культивируемые мононуклеарные клетки периферической крови и Т-клетки CD4+ пациентов с SLE демонстрируют дефицит продукции IL-2 ex vivo. См., например, Comte, D., et al., *Arthritis & Rheumatology* 69:808-13 (2017).

**[0136]** Таким образом, настоящее изобретение относится к безопасным и эффективным дозам слитого белка IL2, раскрытого в настоящем документе, для лечения заболевания или состояния, например, аутоиммунного заболевания и/или воспалительного заболевания, например, SLE.

#### **П.А. Дозы и пути введения**

**[0137]** Согласно некоторым аспектам доза слитого белка IL2 составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг. Согласно другим аспектам доза слитого белка IL2 составляет более приблизительно 9 мг.

**[0138]** Дозу слитого белка IL2 можно вводить субъекту местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, местным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, подбололочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, интракапсулярным, внутриорбитальным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или внутригрудным путем.

**[0139]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту внутривенным путем. Согласно некоторым аспектам AUC[0-336 часов (ч)] дозы, вводимой внутривенно, контролируют таким образом, чтобы среднее воздействие (AUC[INF]) было ограничено. Согласно некоторым аспектам AUC[0-336 часов (ч)] дозы ниже приблизительно 757 мкг•ч/мл.

**[0140]** Согласно некоторым аспектам AUC[0-336 часов (ч)] дозы ниже приблизительно 750 мкг•ч/мл, приблизительно 740 мкг•ч/мл, приблизительно 730 мкг•ч/мл, приблизительно 720 мкг•ч/мл, приблизительно 710 мкг•ч/мл, приблизительно 700 мкг•ч/мл, приблизительно 690 мкг•ч/мл, приблизительно 680 мкг•ч/мл, приблизительно 670 мкг•ч/мл, приблизительно 660 мкг•ч/мл, приблизительно 650 мкг•ч/мл, приблизительно 640 мкг•ч/мл,



приблизительно 1 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая внутривенным путем, составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,3 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая внутривенным путем, составляет от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 6 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая внутривенным путем, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

**[0143]** Согласно некоторым аспектам доза, вводимая внутривенным путем, составляет приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,3 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг или приблизительно 9 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая внутривенным путем, составляет более приблизительно 9 мг.

**[0144]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту подкожным путем. Согласно некоторым аспектам AUC[0-336 часов (ч)] дозы, вводимой подкожно, контролируют таким образом, чтобы среднее воздействие (AUC[INF]) было ограничено. Согласно некоторым аспектам AUC(0-504 ч) дозы ниже приблизительно 306 мкг•ч/мл.

**[0145]** Согласно некоторым аспектам AUC(0-504 ч) дозы ниже приблизительно 300 мкг•ч/мл, приблизительно 290 мкг•ч/мл, приблизительно 280 мкг•ч/мл, приблизительно 270 мкг•ч/мл, приблизительно 260 мкг•ч/мл, приблизительно 250 мкг•ч/мл, приблизительно 240 мкг•ч/мл, приблизительно 230 мкг•ч/мл, приблизительно 220 мкг•ч/мл, приблизительно 210 мкг•ч/мл, приблизительно 200 мкг•ч/мл, приблизительно 190 мкг•ч/мл, приблизительно 180 мкг•ч/мл, приблизительно 170 мкг•ч/мл, приблизительно 160 мкг•ч/мл или приблизительно 150 мкг•ч/мл.

**[0146]** Согласно некоторым аспектам слитый белок вводят субъекту подкожным путем при дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 7 мг до приблизительно 8 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 6 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 6 мг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 3 мг до



приблизительно 5 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 3 мг до приблизительно 4 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг или от приблизительно 2 мг до приблизительно 3 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 6 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 6 мг.

**[0147]** Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет приблизительно 1 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 6 мг или приблизительно 8 мг. Согласно некоторым аспектам доза, вводимая подкожным путем, составляет более приблизительно 8 мг.

**[0148]** Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению предусматривает введение нескольких доз (т.е., двух или более доз) субъекту, нуждающемуся в этом, с интервалом между введениями двух доз. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями (например, подкожным или внутривенным) составляет по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно два дня, по меньшей мере приблизительно три дня, по меньшей мере приблизительно четыре дня, по меньшей мере приблизительно пять дней или по меньшей мере приблизительно шесть дней. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями (например, подкожным или внутривенным) составляет по меньшей мере приблизительно одну неделю, по меньшей мере приблизительно две недели, по меньшей мере приблизительно три недели, по меньшей мере приблизительно четыре недели, по меньшей мере приблизительно месяц, по меньшей мере приблизительно пять недель, по меньшей мере приблизительно шесть недель, по меньшей мере приблизительно семь недель, по меньшей мере приблизительно восемь недель, по меньшей мере приблизительно два месяца, по меньшей мере приблизительно девять недель, по меньшей мере приблизительно десять недель, по меньшей мере приблизительно одиннадцать недель, по меньшей мере приблизительно двенадцать недель или по меньшей мере приблизительно три месяца. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями составляет по меньшей мере приблизительно три недели. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями составляет по меньшей мере приблизительно две недели. Согласно некоторым аспектам



вводят подкожно и интервал между введениями составляет приблизительно четыре недели или приблизительно месяц.

**[0150]** Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению предусматривает введение нескольких доз слитого белка, описанного в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом, где несколько доз вводят двумя или более различными путями, например, одну дозу вводят внутривенно, а другую дозу вводят подкожно. Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению предусматривает (i) внутривенное введение первой дозы слитого белка субъекту, нуждающемуся в этом, и (ii) подкожное введение второй (или последней) дозы слитого белка субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению предусматривает (i) внутривенное введение одной или нескольких доз слитого белка субъекту, нуждающемуся в этом, и (ii) подкожное введение одной или нескольких доз слитого белка субъекту. Согласно некоторым аспектам интервал между введениями и/или дозы можно регулировать между внутривенным введением и подкожным введением.

**[0151]** Согласно некоторым аспектам способ согласно настоящему изобретению дополнительно предусматривает введение субъекту кортикостероида. Согласно некоторым аспектам кортикостероид выбран из группы, состоящей из преднизолона, метилпреднизолона, преднизона, гидрокортизона, дексаметазона, бетаметазона, будесонида, триамцинолона, кортизона, дезоксикортикостерона, флудрокортизона и параметазона. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон, метилпреднизолон или преднизон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон.

**[0152]** Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят субъекту местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, местным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, подоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, интракапсулярным, внутриорбитальным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным и внутригрудным путем. Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят субъекту местным, пероральным, внутривенным или внутримышечным путем.

**[0153]** Согласно некоторым аспектам кортикостероид вводят до, одновременно с или после каждой дозы слитого белка. Согласно некоторым аспектам две или более доз кортикостероида вводят субъекту с интервалом между введениями каждой дозы. Согласно

некоторым аспектам интервал между введениями кортикостероида составляет по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно два дня, по меньшей мере приблизительно три дня, по меньшей мере приблизительно четыре дня, по меньшей мере приблизительно пять дней, по меньшей мере приблизительно шесть дней, по меньшей мере приблизительно одну неделю, по меньшей мере приблизительно две недели, по меньшей мере приблизительно три недели, по меньшей мере приблизительно четыре недели, по меньшей мере приблизительно месяц, по меньшей мере приблизительно пять недель, по меньшей мере приблизительно шесть недель, по меньшей мере приблизительно семь недель, по меньшей мере приблизительно восемь недель, по меньшей мере приблизительно два месяца, по меньшей мере приблизительно девять недель, по меньшей мере приблизительно десять недель, по меньшей мере приблизительно одиннадцать недель, по меньшей мере приблизительно двенадцать недель или по меньшей мере приблизительно три месяца. Согласно некоторым аспектам кортикостероид представляет собой преднизолон, где слитый белок вводят субъекту подкожно два раза в неделю, и где преднизолон вводят субъекту перорально три раза в неделю.

## **II.B. Заболевания и нарушения**

**[0154]** Субъекты, подходящие для лечения способами согласно настоящему изобретению, включают пациентов-людей, для которых желательно усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, страдающих заболеванием или нарушением, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа, например, ответа антигенспецифических Т-клеток). Согласно некоторым аспектам введение субъекту количества слитого белка IL2 модифицирует иммунный ответ у субъекта. Согласно некоторым аспектам иммунный ответ усиливается, стимулируется или повышающе регулируется у субъекта.

**[0155]** С учетом способности слитых белков IL2, описанных в настоящем документе, стимулировать или костимулировать Т-клеточные ответы, например, ответы антигенспецифических Т-клеток, такие как ингибирование негативных эффектов IL2 или IL2R $\alpha$ , в настоящем документе предусмотрены способы *in vitro* и *in vivo* применения слитых белков IL2, описанных в настоящем документе, для стимуляции, усиления или повышающей регуляции ответов антигенспецифических Т-клеток. Согласно некоторым аспектам также предусмотрена стимуляция CD3 (например, путем совместной инкубации с клеткой, экспрессирующей мембранный CD3), причем стимуляция может быть

обеспечена одновременно, до или после стимуляции слитым белком IL2, описанным в настоящем документе.

**[0156]** Любой подходящий индикатор ответа антигенспецифических Т-клеток можно использовать для измерения ответа антигенспецифических Т-клеток. Неограничивающие примеры таких подходящих индикаторов включают повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или повышенную продукцию цитокинов в присутствии антитела. Согласно некоторым аспектам стимулируется продукция интерлейкина-2 и/или интерферона- $\gamma$  антигенспецифическими Т-клетками.

**[0157]** Т-клетки, которые могут быть усилены или костимулированы слитыми белками IL2, описанными в настоящем документе, включают Т-клетки CD4<sup>+</sup> и Т-клетки CD8<sup>+</sup>. Т-клетки могут быть клетками Teff, например, клетками Teff CD4<sup>+</sup>, клетками Teff CD8<sup>+</sup>, клетками Thelper (Th) (например, клетками Th1) или Т-цитотоксическими (Tc) клетками.

**[0158]** Согласно некоторым аспектам заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание или иммуноопосредованное заболевание. Лечение субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, слитым белком IL2, описанным в настоящем документе, может привести, например, к стабильному заболеванию, частичному ответу, увеличенной общей выживаемости, увеличенной выживаемости без заболевания или увеличенной выживаемости без прогрессирования.

**[0159]** Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание. Существует большой интерес к использованию подавляющей способности Treg для ингибирования нежелательных иммунных ответов. Данные на мышах и человеке показывают, что усиление передачи сигналов IL2R с помощью низкой дозы IL2 селективно повышает Treg и усиливает иммунные толерогенные механизмы. Слитые белки IL2, раскрытые в настоящем документе, представляют собой новую и улучшенную форму IL2, которая более эффективно повышает Treg. Таким образом, слитые белки IL2 можно вводить пациентам с аутоиммунными заболеваниями, хронической реакцией «трансплантат против хозяина», реакциями отторжения трансплантата и другими состояниями, где задача состоит в подавлении аутореактивности.

**[0160]** Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, аутоиммунной глютенной болезни, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, кожной красной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, системного склероза, реакции

«трансплантат против хозяина» (GvHD), псориаза, круговой алопеции, васкулита, вызванного вирусом гепатита С, синдрома Шегрена, вульгарной пузырчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаюсу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена, воспалительной болезни кишечника, иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии, X-связанного (PPEX) синдрома и синдрома активации макрофагов. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка, волчаночный нефрит или кожная красная волчанка. Согласно некоторым аспектам иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка.

**[0161]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим воспалительным заболеванием или аутоиммунным заболеванием, которые показали неадекватный ответ или прогрессирование при предшествующем лечении. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, которые ранее не получали (т.е., не подлежали лечению) лечение воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

**[0162]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, вводят вместе со стандартным лечением воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, вводят в качестве поддерживающей терапии для воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, например, терапии, которая предназначена для профилактики возникновения или рецидива воспаления.

**[0163]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, вводят в качестве монотерапии для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, или в качестве только иммуностимулирующей терапии для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с протоколом вакцинации для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с антителом, используемым для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

**[0164]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с кортикостероидом, применяемым для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

**[0165]** Согласно некоторым аспектам слитый белок II<sub>2</sub>, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с кортикостероидом, применяемым для лечения системной красной волчанки. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения системной красной волчанки, представляет собой преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон, будесонид, триамцинолон, кортизон, дезоксикортикостерон, флудрокортизон или параметазон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения системной красной волчанки, представляет собой преднизолон, метилпреднизолон или преднизон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения системной красной волчанки, представляет собой преднизолон.

**[0166]** Согласно некоторым аспектам слитый белок II<sub>2</sub>, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с кортикостероидом, применяемым для лечения волчаночного нефрита. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения системного волчаночного нефрита, представляет собой преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон, будесонид, триамцинолон, кортизон, дезоксикортикостерон, флудрокортизон или параметазон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения волчаночного нефрита, представляет собой преднизолон, метилпреднизолон или преднизон. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения волчаночного нефрита, представляет собой преднизолон.

**[0167]** Согласно некоторым аспектам слитый белок II<sub>2</sub>, раскрытый в настоящем документе, комбинируют с кортикостероидом, применяемым для лечения кожной красной волчанки. Согласно некоторым аспектам кортикостероид, применяемый для лечения кожной красной волчанки, представляет собой преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон, будесонид, триамцинолон, кортизон, дезоксикортикостерон, флудрокортизон или параметазон.

**[0168]** Согласно некоторым аспектам слитый белок II<sub>2</sub>, описанный в настоящем документе, не является существенно токсичным. Например, слитый белок II<sub>2</sub>, описанный в настоящем документе, не является существенно токсичным для органа человека, например, одного или нескольких из печени, почек, головного мозга, легких и сердца, как определено, например, в клинических испытаниях. Согласно некоторым аспектам слитый белок II<sub>2</sub>, описанный в настоящем документе, не вызывает в значительной степени нежелательный иммунный ответ, например, аутоиммунитет или воспаление.

**[0169]** Согласно некоторым аспектам лечение субъекта слитым белком II<sub>2</sub>, описанным в настоящем документе, не приводит к чрезмерной стимуляции иммунной

системы до такой степени, что иммунная система субъекта затем атакует самого субъекта (например, аутоиммунный ответ) или приводит, например, к анафилаксии. Таким образом, согласно некоторым аспектам слитые белки IL2, описанные в настоящем документе, не вызывают анафилаксию.

**[0170]** Согласно некоторым аспектам лечение субъекта слитым белком IL2, описанным в настоящем документе, не вызывает значительные воспалительные реакции, например, иммуноопосредованный пневмонит, иммуноопосредованный колит, иммуноопосредованный гепатит, иммуноопосредованный нефрит или почечную дисфункцию, иммуноопосредованный гипофизит, иммуноопосредованный гипотиреоз и гипертиреоз или другие иммуноопосредованные побочные реакции. Согласно некоторым аспектам лечение субъекта слитым белком IL2, описанным в настоящем документе, не вызывает значительные сердечные нарушения, например, желудочковую аритмию, нарушения глаз, например, иридоциклит, инфузионные реакции, повышенную амилазу, повышенную липазу, нарушения нервной системы, например, головокружение, периферическую и сенсорную невропатию, нарушения кожи и подкожной ткани, например, сыпь, зуд, эксфолиативный дерматит, многоформную эритему, витилиго или псориаз, респираторные, торакальные и медиастинальные нарушения, например, кашель, усталость, тошноту, снижение аппетита, запор, артралгию или диарею.

**[0171]** Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям для применения в соответствии с любым способом, раскрытым в настоящем документе.

### **П.С. Слитые белки IL2**

**[0172]** Слитые белки IL2, вводимые в способах согласно настоящему изобретению, содержат по меньшей мере два компонента: (a) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкин-2 (IL2), и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ), где внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1), и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым аспектам слитый белок имеет активность IL2.

**[0173]** Слитые белки, описанные в настоящем документе, специфически связывают человеческий IL2R и, более конкретно, конкретный домен (например, функциональный домен) внутри внеклеточного домена человеческого IL2R $\alpha$ . Согласно некоторым аспектам слитый белок, содержащий IL2, представляет собой антагонист.



Согласно некоторым аспектам слитый белок, содержащий IL2, связывается с человеческим IL2R $\alpha$  с высокой аффинностью.

**[0174]** Множество субъединиц рецептора способствуют эффективной передаче сигналов рецептора IL-2. IL-2R $\beta$  и рецепторы общей гамма-цепи (IL-2R $\gamma$ ) составляют сигнальные компоненты рецептора и одновременно необходимы и достаточны для передачи сигнала IL-2. Активация гетеродимерного рецептора IL-2R $\beta\gamma$  приводит к рекрутированию JAK1 и JAK3, активации PI3K и, в конечном счете, к фосфорилированию STAT5. См., например, Malek, T.R., *Annu Rev Immunol.* 26:453-79 (2008). IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$  экспрессируются на всех чувствительных к IL-2 иммунных клетках: Treg, Tconv, Т-клетках CD8, NK-клетках и врожденных лимфоидных клетках типа 2 (ILC2), тогда как альфа-субъединица, IL-2R $\alpha$  или CD25, имеет более ограниченную экспрессию. CD25 конститутивно экспрессируется на Treg, как было сообщено для ILC2 и только временно экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и NK-клетках. См., например, Simoni, Y., *et al.*, *Immunity* 46(1):148-61 (2017). CD25 имеет умеренную (~25 нМ) аффинность в отношении IL-2 и непосредственно не участвует в передаче сигналов. См., например, Rickert, M., *et al.*, *Science* 308:1477-80 (2005).

**[0175]** На основании кристаллической структуры четвертичного комплекса IL-2 и внеклеточных доменов всех трех компонентов рецептора, CD25, по-видимому, не вступает в прямой контакт с IL-2R $\beta$  или IL-2R $\gamma$ . См., например, Nelson, B.H., *et al.*, *Nature* 369:333-6 (1994), and Stauber, D.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:2788-93 (2006). Напротив, CD25, по-видимому, служит стоком клеточной поверхности для IL-2, что увеличивает кажущуюся эффективность IL-2 для клеток, на которых CD25 экспрессируется на высоких уровнях в той же клетке, что и субъединицы IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ . См., например, Pillet, A.H., *et al.*, *J Mol Biol.* 403:671-92 (2010). Конститутивно высокая экспрессия CD25 на Treg придает очень высокую чувствительность к IL-2 со значительно большей эффективностью IL-2 на Treg по сравнению с другими нерегуляторными Т-клетками. См., например, Dupont, G., *et al.*, *Cytokine* 69:146-9 (2014). Обработка Treg IL-2 приводит к сильной пролиферации и активации, включая повышающую регуляцию CD25 и FoxP3, а также других генов, связанных с супрессивной активностью Treg. См., например, Sakaguchi, S., *et al.*, *J Immunol.* 155(3):1151-64 (1995). В отличие от Treg, эффекторным Т-клеткам и большинству NK-клеток для активации требуются более высокие уровни IL-2, поскольку у них отсутствует высокая конститутивная экспрессия CD25, и они лишь временно повышающе регулируют CD25 при активации. См., например, Letourneau, S., *et al.*, *J Allergy Clin Immunol.* 123(4):758-62 (2009).

### **II.C.1 Полипептиды IL2 слитых белков IL2**

**[0176]** Слитый белок IL2 содержит первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкин-2 (IL2).

**[0177]** Согласно некоторым аспектам полипептид IL2 слитого белка IL2 представляет собой нативный или рекомбинантный IL2 из любого позвоночного источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное.

**[0178]** Термин IL2 охватывает непроцессированный IL2, а также любую форму IL2, полученную в результате процессинга в клетке (т.е. зрелую форму IL2). Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты и фрагменты IL2, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты, а также не встречающиеся в природе варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы человеческого IL2 (имеющей сигнальную последовательность из 20 аминокислот) показана в SEQ ID NO: 2. Непроцессированный человеческий IL2 дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 7), который отсутствует в зрелой молекуле IL2. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы мышинового IL2 (имеющей сигнальную последовательность из 20 аминокислот) показана в SEQ ID NO: 8. Непроцессированный мышинный IL2 дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 9), который отсутствует в зрелой молекуле IL2. Под «нативным IL2», также называемым «IL2 дикого типа», понимают встречающийся в природе или рекомбинантный IL2.

**[0179]** Известны дополнительные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности для IL2. См., например, № доступа в GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (серобрюхая ночная обезьяна)), Q7JFM5 (*Aotus nancymae* (Ma's ночная обезьяна)), P05016 (*Bos taurus* (бык)), Q29416 (*Canis familiaris* (собака) (*Canis lupus familiaris*)), P36835 (*Capra hircus* (коза)) и P37997 (*Equus caballus* (лошадь)).

**[0180]** Согласно некоторым аспектам первый полипептид слитого белка содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 2.

**[0181]** Биологически активные фрагменты и варианты IL2 также предусмотрены. Такие активные варианты или фрагменты IL2 будут сохранять активность IL2. Биологическая активность IL2 может относиться к способности стимулировать лимфоциты, несущие рецептор IL2. Такую активность можно измерить как *in vitro*, так и *in vivo*. IL2 является глобальным регулятором иммунной активности, и эффекты, раскрытые в настоящем документе, представляют собой обобщение таких активностей. Например, он регулирует активность выживания (Bcl-2), индуцирует Т-эффекторную активность (IFN-гамма, гранзим В и перфорин) и/или промотирует Т-регуляторную активность Т (FoxP3). См., например, Malek *et al.*, *Immunity* 33(2):153-65 (2010).

**[0182]** Биологически активные варианты IL2 известны. См., например, публикации заявок США № 20060269515 и 20060160187 и WO 99/60128.

**[0183]** Биологически активные фрагменты и варианты IL2 можно применять в слитых белках, раскрытых в настоящем документе. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150 или более последовательных аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Альтернативно, функциональный вариант может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 2.

**[0184]** Кроме того, предусмотрены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих белки IL2. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 последовательных нуклеотидов полипептида, кодирующего SEQ ID NO: 2, и продолжает кодировать белок, обладающий активностью IL2. Альтернативно, функциональный полинуклеотид может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с полипептидом, кодирующим аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 2, и продолжает кодировать функциональный полипептид IL2.

**[0185]** Иллюстративные полипептидные последовательности IL2 приведены в Таблице 1 ниже.

**Таблица 1**

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
7	IL2 (человеческий,	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN

	непроцессированный)	LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	IL2 (человеческий, зрелая форма)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
9	IL2 (мышинный, непроцессированный)	MYSMQLASCVTTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
8	IL2 (мышинный, зрелая форма)	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ

**[0186]** Согласно некоторым аспектам полипептид IL2 имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым аспектам по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше связано с одной или несколькими мутациями, которые удаляют гликозилирование.

**[0187]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит мутацию, которая представляет собой замену аминокислоты, имеющей сайт гликозилирования, на аминокислоту, не имеющую сайт гликозилирования. Согласно некоторым аспектам мутация удаляет O-гликозилирование и/или N-гликозилирование. Согласно одному аспекту мутация удаляет O-гликозилирование, например, треонин при аминокислоте 3 последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно другому аспекту мутация удаляет N-гликозилирование.

**[0188]** Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты IL2, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты IL2, которая позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не позволяет гликозилирования при соседней аминокислоте.

**[0189]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен аминокислоты IL2 представляют собой замену аланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

**[0190]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен аминокислоты IL2 представляют собой замену треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

**[0191]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен аминокислоты IL2 представляют собой замену реакционноспособной аминокислоты, например, цистеина, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на серин. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на аланин. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену цистеина на валин.

**[0192]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен присутствуют при аминокислоте T3 в IL2 по сравнению с соответствующей SEQ ID NO: 2.

**[0193]** Согласно некоторым аспектам одна из замен присутствует при аминокислоте C125 последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно одному аспекту замена при аминокислоте C125 выбрана из группы, состоящей из C125S, C125A и C125V.

**[0194]** Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию. Согласно некоторым аспектам делеция присутствует при аминокислоте A1 последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

**[0195]** Настоящее изобретение также охватывает любые другие мутации в полипептиде IL2. Согласно другим аспектам мутации также включают одну или несколько замен, которые улучшают свойства IL2, *например*, улучшают активность IL2, улучшают период полужизни IL2, улучшают стабильность и т.д.

**[0196]** Как описано ниже в данном разделе, мутации, раскрытые в настоящем документе, представляют собой мутации относительно аминокислотных положений последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно настоящему изобретению любая из мутаций ниже отдельно или в комбинации с другими раскрытыми мутациями или любыми известными в данной области техники мутациями может применяться в одном или нескольких из слитых белков IL2, как раскрыто в настоящем документе.

**[0197]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Carmenate *et al.*, *J Immunol*, 200(10):3475-84 (2018) и/или в US 8759486, *например*, при аминокислотном остатке Q22, Q126, I129, S130 или любой их комбинации,

например, Q22V, Q126A, I129D, S130G или любая их комбинация. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций L18N, Q126Y и S130R, как раскрыто в патенте США № 8759486 B2. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций Q13Y, Q126Y, I129D и S130R, как раскрыто в патенте США № 8759486 B2. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций K35E, K35D и K35Q, как раскрыто в WO 2018/091003 A1.

**[0198]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Epstein et al. *Blood*, 101(12):4853-61 (2003) и/или в US 7371371, например, при аминокислотном остатке R38, например, R38W. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию R38W и одну или несколько мутаций за пределами аминокислотных положений 22 - 58 в IL2, как раскрыто в патенте США № 7371371 B2.

**[0199]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в US 8906356, например, при аминокислотном остатке 91, 126 или обоих, например, V91R, Q126T или обе. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), а также в US 8906356. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или обе мутации из N88R и V91R, как раскрыто в Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), а также в US 8906356. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию Q126T или Q126I, как раскрыто в Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в патенте США № 8906356.

**[0200]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в патенте США № 8906356 B2, например, при аминокислоте 69, 74, 91, 126 или любой их комбинации. Согласно некоторым аспектам мутацией является V91R, Q126T, Q126L, Q127T или любая их комбинация, как раскрыто в патенте США № 8906356 B2.

**[0201]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup et al., *J Immunother* 32(9):887-94 (2009) и/или в US 7569215 B2, например, при аминокислотном остатке E15, N30, E68, V69, N71, S75, N90 или любой их комбинации, например, N30S, E68D, V69A, N71A, S75P, N90H или любая их комбинация. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в Wittrup et al., *Biochemistry* 44(31) (2005). Согласно некоторым аспектам мутацией является V69A, как раскрыто в патенте США № 7,569,215 B2.

**[0202]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup et al., *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в патенте США № 7,951,360 B2, например, при аминокислотном остатке N29, Y31, K35, T37, K48, V69, N71, N88 или любой их комбинации, например, N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R,

N88D или любая их комбинация. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в Wittrup *et al.*, *Biochemistry* 44(31) (2005).

**[0203]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup *et al.*, *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в патенте США № 8,349,311 B2, например, при аминокислоте 69, 74, 128 или любой их комбинации, например, V69A, I128P или любая их комбинация.

**[0204]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup *et al.*, *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), например, при аминокислотном остатке S4, T10, Q11, V69, N88, T133 или любой их комбинации, например, S4P, T10A, Q11R, V69A, N88D, T133A или любая их комбинация.

**[0205]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup *et al.*, *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), например, при аминокислотном остатке N30, V69, I128 или любой их комбинации, например, N30S, V69A, I128T или любая их комбинация.

**[0206]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Wittrup *et al.*, *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), например, при аминокислотном остатке K8, Q13, N26, N30, K35, T37, V69 или любой их комбинации, например, K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A или любая их комбинация.

**[0207]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в Shanafelt *et al.*, *Nat Biotechnol.* 18(11):1197-202 (2000), например, при аминокислотном остатке N88, например, N88R.

**[0208]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в патенте США № 9616105 B2, например, при аминокислоте 20, 88, 126 или любой их комбинации, например, N88R, N88G или N88I. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию N88R, N88G или N88I, как раскрыто в патенте США № 9616105 B2. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию D20H, D20I или D20Y, как раскрыто в патенте США № 9616105 B2. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию Q126L, как раскрыто в патенте США № 9616105 B2.

**[0209]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации США № 2018/0125941 A1, например, D20H, N88I, N88G, N88R, Q126L, Q126F или любая их комбинация. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций T3A, N88G, N88R, D20H, C125S, Q126L и Q126F, как раскрыто в публикации США № 2018/0037624 A1.

**[0210]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации США № 2017/0327555 A1, например, при аминокислотном

остатке N88, D20, C125, Q126 или любой их комбинации, например, N88G, N88R, D20H, C125S, Q126L, Q126F или любая их комбинация.

**[0211]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в WO 2016/025385 A1, например, при аминокислотном остатке D109, C125 или обоих, например, D109C, C125S или обе. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в WO 2016/025385 A1, например, при аминокислотном остатке D20, N88, Q126, C125, Q126 или любой их комбинации, например, D20H, N88I, N88G, N88R, Q126L, C125S, Q126F или любая их комбинация.

**[0212]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в WO 2016/164937 A1, например, при аминокислотном остатке L12, Q13, E15, H16, L19, D20, M23, D84, S87, N88, V91, E95 или любой их комбинации, например, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87E, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, E95G или любая их комбинация.

**[0213]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в патентах США № 9932380 B2 или 9580486, например, при аминокислотном остатке V91, например, V91K. Согласно некоторым аспектам IL2 дополнительно содержит мутацию C125A или C125S. Согласно некоторым аспектам IL2 дополнительно содержит мутацию при T3. Согласно некоторым аспектам мутацией при T3 является одна из T3A или T3N. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию при S5. Согласно некоторым аспектам мутацией является S5T.

**[0214]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в патенте США № 9732134 B2, например, E15, H16, Q22, D84, N88, E95 или любая их комбинация.

**[0215]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации США № 2015/0218260 A1, например, N88D. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию, раскрытую в патенте США № 9266938 B2, например, при аминокислоте 42, 45, 72 или любой их комбинации, например, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R или L72K. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R и F42K. Согласно некоторым аспектам IL2 содержит мутацию Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K.



**[0216]** Согласно некоторым аспектам IL2 содержит от одной до четырех мутацией: первую мутацию из L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R или L72K, вторую мутацию из F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R или F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R или Y45K, третью мутацию из T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K или T3P и/или четвертую мутацию из C125A, C125S, C125T или C125V. Мутации, перечисленные в настоящем документе или раскрытые в патентах, патентных публикациях или любых других ссылочных источниках, процитированных в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### **II.C.2. Полипептиды ILR2 $\alpha$ слитых белков IL2**

**[0217]** Слитый белок содержит второй полипептид, содержащий внеклеточный домен рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ).

**[0218]** Согласно некоторым аспектам внеклеточный домен IL2R $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 1.

**[0219]** Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 3.

**[0220]** Термины «CD25», или «рецептор  $\alpha$  IL2», «IL2R $\alpha$ », «IL2Ra», «IL2-R $\alpha$ » и «IL2-R $\alpha$ » в контексте настоящего изобретения относятся к любому нативному или рекомбинантному IL2R $\alpha$  из любого позвоночного источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термины также охватывают встречающиеся в природе варианты IL2R $\alpha$ , например, варианты

сплайсинга или аллельные варианты, или не встречающиеся в природе варианты, обладающие активностью IL2R $\alpha$ . Человеческий IL2 проявляет свои биологические эффекты посредством передачи сигналов через его рецепторную систему IL2R. IL2 и его рецептор (IL2R) необходимы для пролиферации Т-клеток и других фундаментальных функций, которые имеют критическое значение для иммунного ответа. IL2R состоит из 3 нековалентно связанных трансмембранных белков типа I, которые представляют собой альфа (p55), бета (p75) и гамма (p65) цепи. Альфа-цепь человеческого IL2R содержит внеклеточный домен из 219 аминокислот, трансмембранный домен из 19 аминокислот и внутриклеточный домен из 13 аминокислот. Секретируемый внеклеточный домен IL2R альфа (IL2R- $\alpha$ ) может применяться в слитых белках, описанных в настоящем документе.

**[0221]** Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы человеческого IL2R $\alpha$  показана в SEQ ID NO: 10. Непроцессированный человеческий IL2R $\alpha$  показан в SEQ ID NO: 11. Внеклеточный домен последовательности согласно SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 10 представлен в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы мышинового IL2R $\alpha$  показана в SEQ ID NO: 12. Непроцессированный мышинный IL2R $\alpha$  показан в SEQ ID NO: 13. Внеклеточный домен последовательности согласно SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 12 представлен в SEQ ID NO: 14. Под «нативным IL2R $\alpha$ », также называемым «IL2R $\alpha$  дикого типа», подразумевается встречающийся в природе или рекомбинантный IL2R $\alpha$ .

**[0222]** Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности для IL2R $\alpha$  известны. См., например, № доступа в GenBank: NP\_001030597.1 (*P. troglodytes*), NP\_001028089.1 (*M. mulatta*), NM\_001003211.1 (*C. lupus*), NP\_776783.1 (*B. taurus*), NP\_032393.3 (*M. musculus*) и NP\_037295.1 (*R. norvegicus*).

**[0223]** Внеклеточный домен IL2R $\alpha$  в контексте настоящего изобретения означает функциональный внеклеточный (ЕС) домен IL2R $\alpha$  в его обычной роли в связывании с IL2, если не указано иное. Термин «домен ЕС IL2R $\alpha$ » включает его функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, которые сохраняют функцию полноразмерного ЕС IL2R $\alpha$  дикого типа при связывании с IL2. Домен ЕС IL2R $\alpha$  может представлять собой домен ЕС IL2R $\alpha$  человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Фраза «биологическая активность домена ЕС IL2R $\alpha$ » относится к одной или нескольким биологическим активностям домена ЕС IL2R $\alpha$ , включая без ограничения способность усиливать внутриклеточную передачу сигнала в клетках, чувствительных к рецептору IL2. Неограничивающие примеры биологически активных фрагментов и вариантов домена ЕС IL2R $\alpha$  раскрыты, например, в Robb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-8 (1988). Согласно некоторым аспектам биологически активные фрагменты и варианты домена ЕС IL2R $\alpha$ , раскрытые в настоящем

документе, содержат по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$ .

**[0224]** Биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL2R $\alpha$  могут применяться в слитых белках, раскрытых в настоящем документе. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 215 или более непрерывных аминокислот внеклеточного домена любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 1. Альтернативно, функциональный вариант может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1.

**[0225]** Активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих внеклеточный домен IL2R $\alpha$ , дополнительно предусмотрены. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600 или более непрерывных нуклеотидов полипептида, кодирующего SEQ ID NO: 1, и продолжает кодировать белок, имеющий активность внеклеточного домена IL2R $\alpha$ . Альтернативно, функциональный полинуклеотид может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с полипептидом, кодирующим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и продолжает кодировать белок, имеющий активность внеклеточного домена IL2R $\alpha$ .

**[0226]** Иллюстративные полипептидные последовательности IL2R $\alpha$  представлены в Таблице 2.

**Таблица 2.**

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
11	IL2R $\alpha$ (человеческий, непротессированная форма)	MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAELCDDDPPEIPHATFKAMAYK EGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSS ATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREP PPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCK MTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTFDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLS GLTWQRRQRKSRRTI
10	IL2R $\alpha$ (человеческий, зрелая форма)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLY MLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKT EMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETS

		QFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFT TEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI
1	IL2R $\alpha$ (человеческий, зрелая форма внеклеточного домена IL2R $\alpha$ )	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLY MLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTT EMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETS QFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFT TEYQ
13	IL2R $\alpha$ (мышинный, непроцессиро- ванная форма)	MEPRLLMLGFLSLTIVPSCRAELCLYDPPEVPNATFKALSUKNG TILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRK QVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKH EDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFP QPTETTAMTETFVLTMEYKVAVASCLFLLISILLLSGLTWQHR WRKSRRTI
12	IL2R $\alpha$ (мышинный, зрелая форма)	ELCLYDPPEVPNATFKALSUKNGTILNCECKRGFRRLKELVYM RCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQ KPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECI PGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLAS EESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYKV AVASCLFLLISILLLSGLTWQHRWRKSRRTI
14	IL2R $\alpha$ (мышинный, зрелая форма внеклеточного домена IL2R $\alpha$ )	ELCLYDPPEVPNATFKALSUKNGTILNCECKRGFRRLKELVYM RCLGNSWSSNCQCTSNILRASHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTIT DMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVH YECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHR FLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTME YK
4	IL2R $\alpha$ (человеческий, зрелая форма внеклеточного домена IL2R $\alpha$ ) – полностью укороченный	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLY MLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTT EMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
3	IL2R $\alpha$ (человеческий, зрелая форма внеклеточного	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLY MLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTT EMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETS

	домена IL2R $\alpha$ ) – наполовину укороченный	QFPGEEKPQASPEGRPESETS
--	---	-----------------------

**[0227]** Согласно некоторым аспектам слитые белки, раскрытые в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну мутацию в домене EC IL2R $\alpha$ .

**[0228]** Согласно некоторым аспектам домен EC полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, по меньшей мере на два гликозилирования меньше, по меньшей мере на три гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять гликозилирований меньше, по меньшей мере на шесть гликозилирований меньше, по меньшей мере на семь гликозилирований меньше, по меньшей мере на восемь гликозилирований меньше или по меньшей мере на девять гликозилирований меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1).

**[0229]** Согласно некоторым аспектам домен EC полипептида IL2R $\alpha$ , имеющий по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, содержит мутацию, которая удаляет гликозилирование. Согласно другим аспектам слитый белок содержит мутацию, которая представляет собой замену аминокислоты, имеющей сайт гликозилирования, на аминокислоту, не имеющую сайта гликозилирования. Согласно некоторым аспектам мутация удаляет O-гликозилирование и/или N-гликозилирование. Согласно одному аспекту мутация удаляет O-гликозилирование. Согласно другому аспекту мутация удаляет N-гликозилирование.

**[0230]** Согласно некоторым аспектам мутация в слитом белке содержит делецию С-конца IL2R $\alpha$ . Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 167 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 168 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 169 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 170 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 171 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 172 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию аминокислот 173 - 219 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам мутация представляет собой делецию



**[0232]** Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 4. Согласно другим аспектам второй полипептид содержит, по существу состоит из или состоит из SEQ ID NO: 4 и +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19, +20, +21, +22, +23, +24 или +25 аминокислот. Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит, по существу состоит из или состоит из SEQ ID NO: 4 с не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотой. Согласно некоторым аспектам второй полипептид содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 3.

**[0233]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит одну или несколько мутаций. Согласно некоторым аспектам одна или несколько мутаций представляют собой одну или несколько замен аминокислоты IL2R $\alpha$ , которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована.

**[0234]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен аминокислот IL2R $\alpha$  присутствуют при аминокислоте N49, аминокислоте N68, аминокислоте T74, аминокислоте T85, аминокислоте T197, аминокислоте T203, аминокислоте T208 и аминокислоте T216 или любой их комбинации, где положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO: 1.

**[0235]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену аспарагина на другую аминокислоту. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену аспарагина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

**[0236]** Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену треонина на другую аминокислоту. Согласно некоторым аспектам одна или несколько замен представляют собой замену треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0237]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте N49 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота N49 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицин, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

**[0238]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте N68 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота N68 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицин, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

**[0239]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T74 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T74 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0240]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T85 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T85 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0241]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T197 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T197 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой



кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0242]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T203 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T203 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0243]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T208 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T208 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0244]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T216 последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T216 последовательности согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0245]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит одну или несколько мутаций. Согласно некоторым аспектам одна или несколько мутаций представляют собой одну или несколько замен аминокислоты  $\Pi 2R\alpha$ , которая позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте, аминокислотой, которая не позволяет гликозилирование при соседней аминокислоте.

**[0246]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте S50, аминокислоте S51, аминокислоте T69, аминокислоте T70, аминокислоте C192 или любой их комбинации, где положения аминокислот соответствуют SEQ ID NO: 1.

**[0247]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте S50, соответствующей SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота S50 согласно SEQ ID NO: 1 заменена на пролин.

**[0248]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте S51, соответствующей SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота S51 согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

**[0249]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T69, соответствующей SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T69 согласно SEQ ID NO: 1 заменена на пролин.

**[0250]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте T70 согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота T70 согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

**[0251]** Согласно некоторым аспектам замена присутствует при аминокислоте C192 согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам аминокислота C192 согласно SEQ ID NO: 1 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

### **II.C.3. Линкеры слитых белков II2**

**[0252]** Слитый белок согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать линкер. Согласно некоторым аспектам линкер может связывать первый полипептид со вторым полипептидом от N-конца к C-концу, например, N-II2-линкер-II2R $\alpha$  EC-C. Согласно другим аспектам линкер может связывать второй полипептид с первым полипептидом от N-конца к C-концу, например, N-II2R $\alpha$  EC-линкер-II2-C.

**[0253]** Согласно одному аспекту слитый белок II2 содержит линкерную последовательность, локализованную между полипептидом II2 и полипептидом II2R $\alpha$ . Линкер может быть любой длины и может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50 или 60 или более аминокислот. Согласно другим аспектам линкер, полезный согласно настоящему изобретению, имеет по меньшей мере одну аминокислоту и менее 100 аминокислот, менее 90 аминокислот, менее 80 аминокислот, менее 70 аминокислот, менее

60 аминокислот, менее 50 аминокислот, менее 40 аминокислот, менее 30 аминокислот, менее 20 аминокислот, менее 19 аминокислот, менее 18 аминокислот, менее 17 аминокислот, менее 16 аминокислот, менее 15 аминокислот, менее 14 аминокислот, менее 13 аминокислот или менее 12 аминокислот. Согласно одному аспекту линкерная последовательность содержит глициновые аминокислотные остатки. В других случаях линкерная последовательность содержит комбинацию глициновых и сериновых аминокислотных остатков.

**[0254]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит линкер, слитый в рамке считывания между первым полипептидом и вторым полипептид. Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит линкер, представляющий собой глицин/сериновый линкер. Такие глицин/сериновые линкеры могут содержать любую комбинацию аминокислотных остатков, включая без ограничения пептид GGGG (SEQ ID NO: 15) или GGGG SEQ ID NO: 16) или их повторы, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более повторов этих данных пептидов. Глицин/сериновые линкеры, раскрытые в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность  $(GS)_n$ ,  $(GG)_n$ ,  $(GGG)_n$ ,  $(GGGG)_n$  или  $(GGGGG)_n$ , где  $n$  представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно одному аспекту линкерная последовательность содержит GGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 6) (также обозначенную как  $(Gly_3Ser)_3$ ). Согласно другому аспекту, линкерная последовательность содержит GGGSGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 17) (также обозначенную как  $(Gly_3Ser)_4$ ). Согласно другим аспектам линкерная последовательность содержит одну из  $(Gly_3Ser)_5$  (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 18),  $(Gly_3Ser)_6$  (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 19) или  $(Gly_3Ser)_7$  (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 20). Согласно другим аспектам линкерная последовательность содержит  $(Gly_4Ser)_3$  (GGGGSGGGGSGGGG), как представлено в SEQ ID NO: 21. Согласно дополнительным аспектам линкерная последовательность содержит GGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 22) (также обозначенную как  $(Gly_4Ser)_4$ ), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEQ ID NO: 23) (также обозначенную как  $(Gly_4Ser)_5$ ),  $(Gly_4Ser)_2$  (GGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 24),  $(Gly_4Ser)_1$  (GGGG) (SEQ ID NO: 25),  $(Gly_4Ser)_6$  (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 26),  $(Gly_4Ser)_7$  (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 27) или  $(Gly_4Ser)_5$  (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 28).

#### **II.C.4. Гетерологичные фрагменты слитых белков II.2**

**[0255]** Слитый белок согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать дополнительный элемент, например, гетерологичный фрагмент. Такие элементы могут помогать в экспрессии слитого белка, помогать в секреции слитого белка, улучшать стабильность слитого белка, позволять более эффективно очищать белок и/или модулировать активность слитого белка. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент представляет собой полипептидный фрагмент. Согласно другим аспектам гетерологичный фрагмент представляет собой неполипептидный фрагмент.

**[0256]** Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом. Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит гетерологичный фрагмент, слитый со вторым полипептидом. Согласно некоторым аспектам слитый белок содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом и вторым полипептидом.

**[0257]** Согласно некоторым аспектам слитые белки, раскрытые в настоящем документе, содержат один или несколько дополнительных гетерологичных фрагментов. Согласно некоторым аспектам гетерологичные фрагменты представляют собой фрагменты, продлевающие период полужизни. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент содержит альбумин, константную область иммуноглобулина или ее часть, полипептид, связывающий иммуноглобулин, иммуноглобулин G (IgG), полипептид, связывающий альбумин (ABP), фрагмент PASилирования, фрагмент HESилирования, XTEN, фрагмент ПЭГилирования, область Fc и любую их комбинацию.

**[0258]** Иллюстративные гетерологичные фрагменты, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, раскрыты в публикациях США № 2019/0359672 A1 и 2019/0300592 A1, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

#### **II.C.5. Иллюстративные слитые белки II.2**

**[0259]** Согласно некоторым аспектам слитые белки содержат любую из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 или любую из последовательностей, как приведено в Таблице 3 в публикациях патентов США № 2019/0359672 A1 и 2019/0300592 A1.

**[0260]** Согласно некоторым аспектам слитые белки содержат любую из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, как приведено в Таблице 3 ниже, и/или слитые белки содержат любую из

последовательностей, как приведено в Таблице 3 в публикациях патентов США № 2019/0359672 A1 и 2019/0300592 A1.

Таблица 3

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
29	IL2(21-153)- (G3S)3- CD25(22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATM ETSIFTTEYQ
5	IL2-CD25(22- 212)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
30	IL2-CD25(22- 187)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GE
31	NativeSigPep- IL2-CD25(22- 187)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFK AMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQC QCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH

		CREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESV CKMTHGKTRWTQPQLICTGE
32	NativeSigPep- HuIL2- CD25(22- 212)-PP	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFK AMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQC QCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH CREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESV CKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESET SPP
33	IL2-CD25(22- 187)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GE
34	IL2-T23A- C145S- CD25(22-187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG GSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHF VVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE

**[0261]** Настоящее изобретение также относится к биологически активным фрагментам и вариантам зрелой и непротессированной формы слитых белков IL2/домена EC IL-Ra и полинуклеотиду, кодирующему их. Такой функциональный полипептидный фрагмент может содержать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более последовательных аминокислот согласно любой из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34. Альтернативно, функциональный вариант полипептида может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с

последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

**[0262]** Кроме того, настоящее изобретение относится к активным вариантам и фрагментам полинуклеотидов, кодирующих слитый белок IL2/внеклеточного домена IL-Ra. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1100, 1200, 1300, 1500, 1800, 2000 непрерывных нуклеотидов, кодирующих полипептиды, как представлено в SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и продолжает кодировать функциональный слитый белок IL2/внеклеточного домена IL-Ra.

**[0263]** Согласно некоторым аспектам слитый белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

**[0264]** Слитые белки IL2 согласно настоящему изобретению обладать одним или несколькими из следующих свойств/активностей: (1) повышение активности регуляторных Т-клеток (Treg) и/или повышение иммунной толерантности при терапиях на основе IL2 с низкими дозами, (2) повышение иммунного ответа и памяти при терапиях с более высокими дозами, (3) повышение доступности IL2 по сравнению с рекомбинантным IL2 и/или (4) повышение постоянной стимуляции IL2 лимфоцитов, несущих IL2R, *in vivo*.

**[0265]** Согласно одному аспекту слитые белки, раскрытые в настоящем документе, обладают одним или несколькими фармакокинетическими свойствами, выбранными из группы, состоящей из повышенного периода полужизни, повышенной  $C_{max}$ , повышенной площади под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), повышенной  $C_{min}$ , сниженного клиренса, улучшенной биодоступности и любой их комбинации, по сравнению с фармакокинетическим свойством полипептида, состоящего из IL2 (SEQ ID NO: 2) или SEQ ID NO: 29 (последовательность IL2-CD25 дикого типа с 12-мерным линкером без усечения).

**[0266]** Согласно одному аспекту слитые белки, раскрытые в настоящем документе, имеют увеличенный период полужизни по сравнению с IL2 (SEQ ID NO: 2) или SEQ ID NO: 29 (последовательность IL2-CD25 дикого типа с 12-мерным линкером без усечения). Согласно некоторым аспектам увеличенный период полужизни в по меньшей

мере приблизительно 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно 2 раза, по меньшей мере приблизительно 3 раза, по меньшей мере приблизительно 4 раза, по меньшей мере приблизительно 5 раз, по меньшей мере приблизительно 6 раз, по меньшей мере приблизительно 7 раз, по меньшей мере приблизительно 8 раз, по меньшей мере приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно 10 раз, по меньшей мере приблизительно 11 раз, по меньшей мере приблизительно 12 раз, по меньшей мере приблизительно 13 раз, по меньшей мере приблизительно 14 раз, по меньшей мере приблизительно 15 раз, по меньшей мере приблизительно 16 раз, по меньшей мере приблизительно 17 раз, по меньшей мере приблизительно 18 раз, по меньшей мере приблизительно 19 раз, по меньшей мере приблизительно 20 раз, по меньшей мере приблизительно 21 раз или по меньшей мере приблизительно 22 раз по сравнению с периодом полужизни полипептида, состоящего из IL2 (SEQ ID NO: 2) или SEQ ID NO: 29 (последовательность IL2-CD25 дикого типа с 12-мерным линкером без усечения).

**[0267]** Согласно некоторым аспектам повышенную активность Treg, которая является результатом слитого белка IL2, можно анализировать различными способами, включая, например, (1) повышенное представление и количество Treg в компартменте T-клеток CD4+, (2) повышающую регуляцию IL2-зависимого CD25, (3) повышенную пролиферацию, как оценено экспрессией пролиферативного маркера Ki67, и (4) повышенную фракцию субпопуляции IL2-зависимых терминально дифференцированных Klrp1 + Treg. Такие эффекты на Treg можно увидеть, например, в селезенке и/или воспаленной поджелудочной железе.

**[0268]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2 согласно настоящему изобретению увеличивает толерогенные и иммуносупрессивные Treg и иммунитет посредством усиления T-эффекторных ответов/ответов памяти, согласно другим аспектам, проявляет улучшенную фармакокинетику путем доставки таких ответов при (1) более низких эффективных уровнях активности IL2 по сравнению с нативным или рекомбинантным IL2, и/или (2) проявляет более стойкие биологические ответы, чем нативный или рекомбинантный IL2.

**[0269]** Согласно некоторым аспектам слитый белок имеет улучшенную активность по сравнению с нативным или рекомбинантным IL2. Например, эффект слитого белка IL2 может повышать толерогенные Treg в приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или активность IL2 более низкого уровня по сравнению с нативным или рекомбинантным IL2. Согласно другим аспектам слитый белок IL2 более эффективен, чем нативный или рекомбинантный IL2 при индукции стойкого увеличения Treg и родственных свойств.



**[0270]** Кроме того, обнаружено, что компоненты раскрытых в настоящем документе слитых белков IL2 могут обнаруживаться в любом порядке. Согласно одному аспекту полипептид IL2 расположен при N-конце и внеклеточный домен IL2R $\alpha$  расположен при C-конце слитого белка.

**[0271]** Согласно некоторым аспектам слитый белок образует димер. Согласно другим аспектам слитый белок представляет собой мономер. Тем не менее, согласно некоторым аспектам димер содержит два мономера, и мономеры связаны друг с другом ковалентными связями. Согласно некоторым аспектам димер содержит два мономера, и мономеры связаны друг с другом нековалентными связями.

**[0272]** Согласно некоторому аспекту настоящего раскрытия слитый белок слитый белок является более стабильным, чем полипептид, состоящий из (SEQ ID NO: 2) или SEQ ID NO: 29 (последовательность IL2-CD25 дикого типа с 12-мерным линкером без усечения). Согласно некоторым аспектам слитый белок имеет одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из (i) повышенной термодинамической стабильности по сравнению с эталонным белком, (ii) повышенной ТМ по сравнению с эталонным белком, (iii) повышенной устойчивости к разрушению по сравнению с эталонным белком, (iv) повышенной устойчивости к модификациям по сравнению с эталонным белком, (v) повышенной стабильности *in vivo* по сравнению с эталонным белком и (vi) любой их комбинации, где эталонный белок содержит (i) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2), и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ), и имеет по меньшей мере на одно гликозилирование больше по сравнению со слитым белком.

**[0273]** Любой из сайтов гликозилирования слитых белков, раскрытых в настоящем документе, может быть удален другими механизмами. Согласно некоторым аспектам слитый белок дегликозилируется ферментативно или химически. Согласно некоторым аспектам слитый белок дегликозилируется щелочью, гидразинолизом, пептид-N-гликозидазой F (PNGаза F), эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазой H (эндо H), O-гликозидазой или любой их комбинацией.

**[0274]** Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем обработки слитого белка щелочью. Согласно некоторым аспектам гликаны удаляются из гликозилированных полипептидов обработкой боргидридом щелочного металла. Согласно другим аспектам гликозилирование сайты гликозилирования слитых белков, раскрытых в настоящем документе, могут быть удалены с использованием карбонатов щелочных металлов, таких как карбонат натрия и

карбонат калия. Согласно некоторым аспектам щелочь применяют для  $\beta$ -элиминационной обработки.

**[0275]** Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем химической обработки слитого белка путем гидразиолиза. Согласно одному аспекту гликозилирования высвобождаются из слитого белка, раскрытого в настоящем документе, путем воздействия на слитый белок гидразиолизом, а высвобожденная сахарная цепь подвергается флуоресцентному мечению 2-аминопиридином. См. Hase *et al. J. Biochem.* 95:197 (1984). Согласно некоторым аспектам гидразиолиз проводят с использованием устройства, поставляемого Oxford GlycoSystems (the GlycoPrep 1000).

**[0276]** Согласно другому аспекту удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем воздействия на слитый белок трифторметансульфоновой кислотой (TFMS).

**[0277]** Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем обработки слитого белка ферментом. Согласно некоторым аспектам ферментом является гликозидаза. Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается использованием пептид-N-гликозидазы F (PNGазы F). Концентрация PNGазы F может варьироваться и должна быть определена эмпирически. Согласно некоторым аспектам гликозидазой является PNGаза F. PNGаза F представляет собой коммерчески доступный фермент (*например*, New England Biolabs, Ipswich MA, номер по каталогу P0704 или P0710). Согласно некоторым аспектам PNGаза F представляет собой слитый белок. Например, PNGаза F может представлять собой PNGазу F, помеченную хитинсвязывающим доменом (CBD), или слитый белок PNGазы F-SNAP. Согласно некоторым аспектам гликозидаза лиофилизована. Согласно некоторым аспектам гликозидаза представляет собой лиофилизированную PNGазу F. Согласно некоторым аспектам гликозидаза практически не содержит агенты животного происхождения.

**[0278]** Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем обработки слитого белка эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазой H (эндо-H). Эндо-H представляет собой гликогидролазу, секретируемую *Streptomyces plicatus* и некоторыми другими видами *Streptomyces species* (Tarentino *et al.*, 1976). Она расщепляет  $\beta$ -1,4-гликозидную связь N-ацетилглюкозаминового ядра олигосахаридов и оставляет одну N-ацетилхитобиозу, присоединенную к аспарагиновому остатку гликопротеина n (Trimble *et al.*, 1978, Muramatsu 1971). Ген эндо-H в *S. plicatus* составляет 939 пар оснований (номер доступа в GenBank AAA26738.1) и

кодирует блок 28,9 кДа. Эндо-Н из *S. plicatus* недавно был экспрессирован в *Pichiapastoris* и дегликозилирующая активность эндо-Н, продуцированного *P. Pastoris*, была продемонстрирована *in vitro*, посредством как совместной ферментации, так и постферментационных обработок (Wang *et al.*, 2015).

**[0279]** Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка достигается путем обработки слитого белка О-гликозидазой (New England Biolabs, Ipswich MA). О-гликозиды, также называемые эндо-альфа-N-ацетилгалактозаминидазой, катализируют удаление О-связанных дисахаридов ядра 1 и ядра 3 из гликопротеинов. Согласно некоторым аспектам они высвобождают незамещенные Ser- и Thr-связанные из гликопротеинов.

**[0280]** Удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белок может быть достигнуто после того, как белок IL2 продуцирован в клеточной культуре (*например*, биореакторе), при продукции слитого белка IL2 в клеточной культуре, после сбора слитого белка и/или при очистке слитого белка. Согласно некоторым аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования может быть достигнуто добавлением одного или нескольких агентов для удаления в ходе культивирования клеток при экспрессии слитого белка. Согласно другим аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования может быть достигнуто путем выбора определенного типа клеток в качестве клетки-хозяина, которая устраняет гликозилирование или имеет сниженное гликозилирование (*например*, *E. coli* или виды *Streptomyces*). Согласно определенным аспектам удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования достигается путем совместной экспрессии гена, кодирующего слитый белок, с геном, кодирующим фермент, удаляющий одно или несколько гликозилирований.

#### **II.D. Фармацевтические композиции, содержащие слитый белок IL2**

**[0281]** Согласно некоторым аспектам слитый белок IL2 вводят субъекту как часть фармацевтической композиции, содержащей слитый белок IL2 и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ и/или стабилизаторов.

**[0282]** В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в

композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

**[0283]** Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению составлена таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, *например*, внутривенный, интрадермальный, подкожный, пероральный (*например*, ингаляционный), трансдермальный (местный) и трансмукозальный. Кроме того, может быть желательным локальное введение терапевтической дозы фармацевтической композиции в область, нуждающуюся в лечении. Это может быть достигнуто, например, путем местной или регионарной инфузии или перфузии в ходе применения хирургического вмешательства, местного применения, инъекции, катетера, суппозитория или имплантата (*например*, имплантатов, образованных из пористых, непористых или желатиновых материалов, включая мембраны, такие как сипластические мембраны или волокна) и т.п. Согласно другому аспекту терапевтическую дозу фармацевтической композиции доставляют в везикуле, такой как липосомы (см., *например*, Langer, *Science* 249:1527-33 (1990) и Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., pp. 353-65, 1989).

**[0284]** Согласно другому аспекту терапевтическая доза фармацевтической композиции может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном примере можно использовать насос (см., *например*, Langer, *Science* 249:1527-33 (1990), Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-40 (1987), Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507-16 (1980), Saudek *et al.*, *N Engl. J Med.* 321:574-79 (1989)). В другом примере можно использовать полимерные материалы (см., *например*, Levy *et al.*, *Science* 228:190-92 (1985), During *et al.*, *Ann. Neural.* 25:351-56 (1989), Howard *et al.*, *J Neurosurg.* 71:105-12 (1989)). Также можно использовать другие системы с контролируемым высвобождением, такие как рассмотренные Langer (*Science* 249:1527-33 (1990)).

**[0285]** Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие

как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как EDTA, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, комплексы металлов (*например*, Zn- белковые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

**[0286]** Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный изотонический раствор декстрозы, инъекционную стерильную воду, инъекционные растворы декстрозы и лактата Рингера. Неводные парентеральные носители включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены к парентеральным препаратам, упакованным в многодозовые контейнеры, которые включают фенолы или крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. К местным анестетикам относится прокаина гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвеструющий или хелатирующий агент ионов металлов включает EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешиваемых с водой носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования значения pH.

**[0287]** Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители, антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия,

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота, буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение рН можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть включен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

**[0288]** Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (растворимые в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELS (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать шприцем. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

**[0289]** Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций

предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, в результате которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

**[0290]** Для введения путем ингаляции соединения доставляются в виде аэрозольного спрея из контейнера под давлением или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера. Системное введение также может осуществляться трансмукозальным или чрескожным путем.

**[0291]** Для трансмукозального или чрескожного введения в составе используют пенетранты, подходящие для проникновения через барьер. Такие пенетранты широко известны в данной области техники и включают, например для трансмукозального введения детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмуккозальное введение можно проводить с помощью назальных спреев или суппозиторияев. Для чрескожного введения активные соединения готовят в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как это в общем известно в данной области техники. Соединения также могут быть получены в форме суппозиторияев (например, с обычными основами для суппозиторияев, такими как масло какао и другие глицериды) или ретенционных клизм для ректального введения.

**[0292]** Согласно одному аспекту активные соединения получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, как например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны специалистам в данной области техники. Материалы также можно получить коммерческим путем у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

**[0293]** Особенно выгодно составлять пероральные или парентеральные композиции в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и однородности дозы. В контексте настоящего изобретения стандартная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению, при этом каждая единица содержит предварительно

определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных дозированных форм согласно настоящему изобретению определяется и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического эффекта, а также от ограничений, присущих области составления таких функциональных соединений для лечения индивидуумов. Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

**[0294]** При практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, клеточной культуры, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методы полностью описаны в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press), Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY), D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II, Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*, Mullis *et al.* U.S. Pat. No. 4,683,195, Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*, Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*, Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.), *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986), Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*, the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.), Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory), Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155, Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London), Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, *Manipulating the Мышиный Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986), ), Crooks, *Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications*, 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press (2007) и Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

**[0295]** Все ссылочные источники, процитированные выше, а также все ссылочные источники, процитированные в настоящем документе, и аминокислотные или нуклеотидные последовательности (*например*, номера GenBank и/или номера Uniprot) включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0296]** Следующие примеры представлены с целью иллюстрации, но не с целью ограничения.



### III. Примеры

#### III.A. Доклинические исследования BMS-986326

##### Доклиническая фармакология

[0297] Определение биохимических и биофизических характеристик BMS-986326 показало, что он существует в основном в виде самоблокирующегося гомодимера с диссоциационным периодом полужизни приблизительно 3 дня *in vitro* при 37°C и расчетной константой диссоциации ( $K_d$ ) 1 пМ. Аффинность связывания BMS-986326 с CD25 человека, яванского макака, мыши и крысы ( $IL-2R\alpha$ ) составляла: 2410 нМ, 2000 нМ, 4200 нМ и 7500 нМ, соответственно, и с  $IL-2R\beta\gamma$  (в виде предварительно собранного гетеродимер) составляла: 111 нМ, 105 нМ, >4000 нМ и >4000 нМ, соответственно. На основе этих значений аффинности обезьяны являются подходящим видом для оценки фармакологии BMS-986326, в то время как грызуны могут проявлять измененную фармакологию по сравнению с людьми. Из-за низких уровней активного мономера активность BMS-986326 *in vitro* была снижена в >100 раз по сравнению с рекомбинантным  $IL-2$ . BMS-986326 показал среднюю полумаксимальную эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ )  $3,4 \text{ нМ} \pm 1,8$  в репортерной клеточной линии, управляемой регуляторным фактором интерферонов 1 (IRF1) Kit225, по сравнению с  $0,027 \text{ нМ} \pm 0,014$  для рекомбинантного  $IL-2$ . В анализе цельной крови для измерения фосфорилирования STAT5 (pSTAT5) в Treg, проксимального маркера передачи сигналов  $IL-2$ , BMS-986326 показал  $EC_{50}$   $0,23 \text{ нМ} \pm 0,14$  в крови человека и  $0,078 \text{ нМ} \pm 0,040$  в крови обезьяны. BMS-986326 продемонстрировал селективность в отношении Treg в анализе цельной крови с приблизительно максимальным сигналом, обнаруженным в Treg (>90% Treg pSTAT5<sup>+</sup> при самой высокой концентрации лекарственного средства), и только частичным сигналом (<50% клеток pSTAT5<sup>+</sup> при самой высокой концентрации лекарственного средства при 71 нМ), обнаруженным в обычных T-клетках CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> (TconV), клетках CD8 и NK-клетки.

[0298] Из-за значительных различий в аффинности человеческого  $IL-2$  в отношении связывания с димером мышинового  $IL-2R\beta\gamma$ , а также для того, чтобы избежать потенциальных анти-лекарственное средство антител (ADA) в исследованиях хронической эффективности, мышинный суррогат (mIL2-CD25) использовали, чтобы исследовать активность гомологичного димерного слитого белка на мышинных моделях заболеваний. У мышей BALB/c дикого типа mIL2-CD25 показал пролонгированную фармакокинетику (PK) по сравнению с кристаллизуемым фрагментом (Fc) и слитым белком mIL-2 (Fc-mIL2) или суточными дозами мышинового  $IL2$  (mIL2), а также надежную экспансию Treg и повышенную селективность в отношении Treg по сравнению с клетками CD8 и NK-клетками. Молекулу mIL2-CD25 тестировали на двух мышинных моделях волчанки: NZB/W

и MRL/lpr, которые демонстрируют классические проявления подобных волчанке симптомов, наблюдаемых у людей. на обеих мышинных моделях лечение mIL2-CD25 на ранних стадиях заболевания продемонстрировало устойчивую и зависимую от дозы фармакодинамику («PD»), пролиферация и экспансия Treg, а также биомаркеры для передачи сигналов IL-2 на Treg), а также значительное улучшение конечных точек заболевания, аналогичных лечению высокими дозами стероидов: снижение уровня аутоантител и повреждения почек, а также улучшение функции почек. Доза 0,2 мг/кг была минимальной дозой, обеспечивающей максимальную эффективность в этих исследованиях. Кроме того, субоптимальная доза mIL2-CD25 (0,1 мг/кг) показала аддитивную эффективность в сочетании с лечением низкими дозами стероидов (0,1 мг/кг преднизолона). Процентное содержание Treg (в пределах гейта Т-клеток CD4<sup>+</sup>) измеряли как первичный показатель PD в исследованиях на мышах. Изменение % Treg в гейте Т-клеток CD4<sup>+</sup> рассчитывали путем вычитания % Treg в гейте Т-клеток CD4<sup>+</sup> группы, получавшей носитель, из % Treg в гейте Т-клеток CD4<sup>+</sup> группы лечения, представляли как Δ Treg %. В нескольких исследованиях с введением дозы два раза в неделю (BIW) процентное содержание Treg увеличивалось по сравнению с контрольными уровнями носителя на Δ12% до Δ18% в популяции CD4<sup>+</sup>, в зависимости от исследования и определения гейтирования для Treg, в дозах, которые приводили к максимальной эффективности (0,2 мг/кг). На модели NZB/W подобная эффективность была достигнута при BIW и частоте введения дозы один раз каждые 5 дней (Q5D), несмотря на то, что уровни Treg незначительно снижались при PK в исследованиях Q5D. Данные для модели заболевания NZB/W использовали для определения целевых ответов PD для оценки эффективности, чтобы помочь в предсказании дозы человека.

**[0299]** PK, PD и переносимость BMS-986326 в широком диапазоне доз (0,075 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,75 мг/кг и 2,5 мг/кг, что соответствует AUC приблизительно 48, 157, 407 и 1046 мкг•ч/мл, соответственно) оценивали после однократной подкожной (SC) инъекции у обезьян. В этом исследовании наблюдали четкое зависимое от дозы увеличение частоты, абсолютного числа и процента пролиферирующих Treg при всех дозах. Также наблюдали увеличение маркеров, указывающих на передачу сигналов IL-2R, включая фосфорилирование STAT5, а также экспрессию CD25, измеренную с помощью анализа проточной цитометрии, на Treg при всех дозах. Несмотря на минимальные доказательства изменений уровней pSTAT5 или экспрессии CD25 на клеточной поверхности в Tconv или Т-клетках CD8<sup>+</sup> при любой дозе, были доказательства зависимой от дозы экспансии и пролиферации Tconv и Т-клеток CD8<sup>+</sup> при 2 самых высоких протестированных дозах. Кроме того, у обезьян наблюдали плохую переносимость при самой высокой дозе 2,5 мг/кг.

При хорошо переносимой, селективной к Treg дозе 0,25 мг/кг изменение пикового процентного содержания Treg в Т-клетках CD4 по сравнению с исходным уровнем достигло уровня ( $\Delta 23\%$  выше предозы при пике, 4,8-кратное увеличение выше предозы при пике) намного выше уровней %Treg, необходимых для максимальной эффективности на мышинных моделях ( $\Delta 12\%$ - $18\%$  выше контролей-носителей). Кроме того, увеличение на  $\Delta 10\%$  по сравнению с исходным уровнем % Treg в гейте Т-клеток CD4<sup>+</sup> сохранялось при этой дозе до 21-го дня введения. В совокупности эти данные демонстрируют, что BMS-986326 вызывает надежные и длительные PD-ответы, селективные в отношении Treg при ожидаемых эффективных дозах.

#### Доклиническая фармакокинетика

**[0300]** Различные исследования *in vitro* и *in vivo* проводили для определения характеристик фармакокинетики BMS-986326 в доклинических условиях. Анализы связывания лиганда для определения экспозиции BMS-986326 или mIL-2-CD25 в сыворотке измеряют общую концентрацию, которая включает формы активного мономера и неактивного димера. После внутривенного (IV) введения стационарный объем распределения (V<sub>ss</sub>) BMS-986326 составлял 0,0954 и 0,0734 л/кг у мышей и обезьян, соответственно. Общий сывороточный клиренс (CLT) BMS-986326 составлял 3,25 и 0,769 мл/ч/кг, а кажущийся период полужизни (T-HALF) после подкожного (SC) введения дозы составлял 1,18 и 3,30 дня у мышей и обезьян, соответственно. Время достижения максимальной концентрации (T<sub>max</sub>) после подкожного введения составляло 7 и 24 часа у мышей и обезьян, соответственно. Абсолютная биодоступность после подкожного введения составила 58% у мышей и 46% у обезьян. Исследования *in vitro* на сыворотке человека (до 72 часов) и исследования *ex-vivo* на образцах сыворотки обезьян после подкожного введения BMS-986326 (до 168 часов) не выявили признаков расщепления линкера при оценке путем измерения соотношения площадей на основе жидкостной хроматографией-тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) IL-2 и CD25 после иммунного захвата посредством IL-2.

**[0301]** PK человека прогнозировали с использованием аллометрического масштабирования параметров PK обезьян, и предполагали, что биодоступность SC аналогична биодоступности у обезьян. Период полужизни 6 дней прогнозировали для людей. Ответы PD человека (включая изменения количества клеток Treg CD4<sup>+</sup>, Т-клеток CD8<sup>+</sup> и %pSTAT5<sup>+</sup> Treg) прогнозировали с использованием параметров модели PK/PD обезьяны, поскольку было показано, что BMS-986326 имеет сопоставимую аффинность

связывания с IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  у обезьяны и человека, а также сопоставимую эффективность *in vitro* в анализе цельной крови обезьяны и человека.

**[0302]** Эффективная доза BMS-986326 для человека вычисляли с использованием 2 подходов. Первый подход был основан на максимальной доклинической эффективности на мышинных моделях, получавших mIL2-CD25. Поскольку максимальная эффективность на мышинной модели NZB/W с mIL2-CD25 (0,2 мг/кг BW) была связана с  $\Delta 14\%$  Treg в Т-клетках CD4<sup>+</sup> по сравнению с исходным уровнем в нижней точке, целью подобного ответа PD в нижней точке было прогнозирование человеческой эффективной дозы BMS-986326. Эффективная доза BMS-986326 у людей для целевых  $\Delta 14\%$  Treg Т-клетках в CD4<sup>+</sup> составляет 6 мг подкожно, вводимых один раз каждые 2 недели (Q2W). При этой дозе прогнозируемая стационарная максимальная концентрация в сыворотке (C<sub>max,ss</sub>) BMS-986326 составляет 1,5 мкг/мл, прогнозируемая AUC(TAU) составляет 217 мкг•ч/мл, прогнозируемая стационарная минимальная концентрация (C<sub>trough,ss</sub>) составляет 0,3 мкг/мл.

**[0303]** В последующих исследованиях уменьшенная частота введения доз mIL2-CD25 (0,2 мг/кг каждые 5 дней) на мышинной модели NZB/W также продемонстрировала максимальную эффективность при 10-кратном снижении минимального воздействия. Таким образом, прогнозируемая доза для человека 6 мг подкожно, вводимая один раз в месяц (Q1M), которая будет достигать 10-кратного снижения C<sub>trough,ss</sub> (0,03 мкг/мл) по сравнению с дозой 6 мг подкожно Q2W, будет иметь подобную эффективность. Предполагается, что режим введения доз 6 мг Q1M позволит достичь  $\Delta 12\%$  Treg в Т-клетках CD4<sup>+</sup> на пике и  $\Delta 4\%$  Treg в Т-клетках CD4<sup>+</sup> на минимуме.

**[0304]** Второй подход к прогнозированию эффективной дозы BMS-986326 для человека был основан на клинической демонстрации эффективности рекомбинантного человеческого IL-2 (rhIL-2) у пациентов с SLE. В клиническом исследовании у пациентов с SLE введение rhIL-2 в дозе 1 млн МЕ (миллион международных единиц) подкожно через день в течение 2 недель с последующим 2-недельным перерывом в лечении привело к получению профиля Treg с пиком  $\Delta 5\%$  Treg в Т-клетках CD4<sup>+</sup> и нижней точкой  $\Delta 1\%$  Treg в Т-клетках CD4<sup>+</sup>. Поскольку было показано, что это лечение улучшает индекс ответа на SLE-4 (SRI-4) по сравнению с плацебо, подобный профиль Treg служил для оценки эффективной дозы BMS-986326. На основании клинических данных прогнозируемая эффективная доза BMS-986326 для людей для достижения подобного профиля Treg составляет 2 мг подкожно Q1M. При этой дозе прогнозируемая C<sub>max,ss</sub> BMS-986326 составляет 0,4 мкг/мл, прогнозируемая AUC(TAU) составляет 71 мкг•ч/мл, а прогнозируемая C<sub>trough,ss</sub>

составляет 0,01 мкг/ мл. В совокупности эффективный диапазон доз для BMS-986326 у людей, как прогнозируется, составляет от 2 до 6 мг SC Q1M.

#### Доклиническая токсикология

**[0305]** Было продемонстрировано, что крысы и обезьяны являются релевантными токсикологическими видами на основании данных о связывании субъединиц рецептора *in vitro* и продемонстрированной фармакологии (селективная экспансия Treg) *in vivo*, а также того, что их традиционно использовали для молекул агонистов IL-2R. Токсичность однократной и повторной дозы BMS-986326 была охарактеризована в серии исследований на крысах в течение до 2 недель и на обезьянах в течение до 12 недель с использованием выбранной частоты введения доз. Основные исследования надлежащей лабораторной практики (GLP) с повторными дозами у обоих видов включали подкожное введение BMS-986326 и состояли из двух 2-недельных исследований на крысах с различной частотой введения доз (один раз в неделю [QW] по сравнению с двумя разами в неделю [2QW]), 2-недельное исследование введения дозы один раз в неделю на обезьянах и 12-недельное (1 раз в 3 недели, Q3W) исследование введения дозы на обезьянах. Кроме того, первоначально были проведены предварительные исследования однократной дозы как на крысах, так и на обезьянах для изучения переносимости BMS-986326, а также было завершено исследование токсичности и безопасности для сердечно-сосудистой системы однократной дозы GLP для внутривенного введения на телеметрированных обезьянах с использованием внутривенного дозирования для поддержки внутривенного введения в исследовании однократной возрастающей дозы (SAD) с применением первой у человека (FII) (IM034001).

**[0306]** Было отмечено, что у крыс BMS-986326 обладает высокой иммуногенностью, при этом образование ADA происходит у 84% крыс, получавших BMS-986326. В общем присутствие ADA ассоциировалось со снижением воздействия и потерей активности PD, но не было связано с токсичностью. У обезьян обычно не наблюдали развитие ADA после воздействия BMS-986326 в опорных исследованиях токсичности, и заболеваемость была низкой в предварительном исследовании.

**[0307]** Предполагаемые и непредполагаемые эффекты PD проявлялись зависимым от дозы образом при всех дозах в каждом исследовании токсичности и, как правило, были более выражены у обезьян, чем у крыс. Как агонист IL-2R, BMS-986326 индуцировал максимальное фосфорилирование STAT5 в Treg-клетках (от 72% до 95%) при всех дозах у крыс и обезьян, увеличивал Treg-клетки (до 63× у обезьян) и/или экспрессию CD25 на CD4. Treg (до 4,5× у крыс) и повышение уровня IL-10 в сыворотке (до 2× у крыс и

87×у обезьян). Помимо желаемого фармакологического воздействия на Treg, BMS-986326 также приводил к непреднамеренным эффектам, включая зависимую от дозы активацию обычных популяций CD4 и CD8 Т-клеток и NK-клеток с сопутствующим повышением сывороточных IL-5, MCP-1 и перфорина. При более высоких дозах BMS-986326 при еженедельном введении у обезьян также было отмечено увеличение количества В-клеток (в 1,6 раза) и других воспалительных цитокинов, таких как IFN-γ (в 7,9 раза), IL-1Ra (в 49 раз) и IL-6 (в 5,1 раза). Эти воспалительные цитокины не повышались при приеме более низких доз BMS-986326 реже (Q3W) в 12-недельном исследовании токсичности на обезьянах.

**[0308]** Все эффекты PD (предполагаемые и непредполагаемые) были, как правило, обратимыми после периодов восстановления после введения дозы. Пик фармакологических ответов обычно наблюдали через 4–12 дней после введения дозы, а в случае более частых режимов введения доз (например, два раза в неделю у крыс или еженедельно у обезьян, когда последовательные дозы вводили на пике ответа PD), это коррелировало с большей частотой и тяжестью токсичности (см. ниже). В 12-недельном исследовании на обезьянах, где дозы вводили реже (каждые 3 недели), ответ PD как у Treg, так и у не-Treg непосредственно перед каждой последующей дозой (через 3 недели после введения дозы) снижался по сравнению с пиковым ответом на 4-12 дни после введения дозы, и, как таковые, были обнаружены признаки воздействия на мишень и склонность к благоприятной иммуномодуляции при всех дозах с минимальной стимуляцией нежелательного иммунного ответа у большинства животных. В совокупности, несмотря на то, что в 12-недельном исследовании на обезьянах при дозировании Q3W наблюдали как предполагаемые, так и некоторые непредполагаемые зависимые от дозы фармакологические эффекты, величина увеличения Treg была приблизительно в 2 раза выше, чем увеличение обычных Т-клеток во всем диапазоне доз.

**[0309]** В предварительном исследовании однократной дозы на крысах при подкожных дозах 5, 25, 75 или 200 мг/кг BMS-986326 показал непереносимость у самцов крыс в дозе  $\geq 25$  мг/кг/день (средняя AUC [0-96 ч]  $\geq 2080$  мкг•ч/мл), которая приводила к заболеваемости или смерти на 5-й день с клиническими патологическими изменениями, указывающими на кровотечение, повреждение гепатобилиарной системы и функциональный холестаза, что соответствует эффектам высоких доз IL-2. Никаких побочных эффектов не наблюдали при дозе 5 мг/кг (средняя AUC [0-96 ч] = 501 мкг•ч/мл).

**[0310]** В исследовании переносимости однократной дозы PK/PD на обезьянах при подкожных дозах 0,075, 0,25, 0,75 или 2,5 мг/кг, дозы до 0,75 мг/кг (AUC[INF] 407 мкг•ч/мл) хорошо переносились с желаемыми (фосфорилирование STAT5 в T-reg с экспансией Treg

и повышенной экспрессией CD25 на Treg и IL-10) и непредполагаемыми (умеренная экспансия Tconv и T-клеток CD8<sup>+</sup>, повышение провоспалительных цитокинов, включая IL-5, MCP-1, перфорин и GM-CSF) изменениями в конечных точках PD, а также эозинофилией и снижением массы эритроцитов. BMS-986326 не переносился в дозе 2,5 мг/кг (AUC[INF] 1040 мкг•ч/мл), у нескольких обезьян наблюдали жидкие фекалии, снижение активности, аномальную/шелушащуюся/красную кожу, тяжелое обезвоживание и профиль клинической патологии, указывающий на высвобождение цитокинов, гепатотоксичность и поражение почек, вероятно, связанные с диареей и обезвоживанием.

**[0311]** В опорном исследовании токсичности и сердечно-сосудистой безопасности однократного внутривенного введения на обезьянах BMS-986326 клинически хорошо переносился во всех дозах (0,05, 0,15 или 0,5 мг/кг, среднее значение AUC [0–336 ч] ≤ 757 мкг•ч/мл). В отличие от рекомбинантного hIL-2, вызывающего гипотензивные эффекты и синдром капиллярной утечки (CLS) в высоких дозах, при введении доз BMS-986326 не наблюдали снижения артериального давления, CLS-подобных эффектов или других эффектов на гемодинамические или электрокардиографические параметры. Заслуживающие внимания токсикологические данные при всех дозах включали минимальное или заметное увеличение (до 91,6×) эозинофилов, связанное с минимальной или умеренной миелоидной гиперплазией эозинофилов в костном мозге, и минимальное или легкое увеличение эозинофильной клеточности в селезенке (соответствующее увеличению селезенки и увеличению веса). При высокой дозе 0,5 мг/кг дополнительные заслуживающие внимания результаты включали временное повышение средней температуры тела (до 1,1 °C), возможно связанное с повышением уровня провоспалительных цитокинов, временное уменьшение скорректированного интервала QT и минимальное увеличение частоты сердечных сокращений (4% относительно исходного уровня), и клинический профиль патологии, широко отражающий временную слабовыраженную воспалительную реакцию. Микроскопически в некоторых тканях определяли зависимые от дозы мультисистемные инфильтраты эозинофилов и мононуклеарных клеток. Все результаты не рассматривали как нежелательные на основании низкой величины и характера изменений, отсутствия повреждения тканей и воспалительных изменений во всех исследованных тканях/органах, а также отсутствия связанных функциональных последствий, в качестве дозы, не вызывающей обнаруживаемых нежелательных эффектов (NOAEL) после однократного внутривенного введения обезьянам, рассматривали высокую дозу 0,5 мг/кг внутривенно (средняя AUC [0–336ч] = 757 мкг•ч/мл).

**[0312]** В двух отдельных 2-недельных исследованиях токсичности на крысах с разной частотой дозирования BMS-986326 вводили дважды в неделю в дозах 0,5, 1 или 2,5 мг/кг подкожно или один раз в неделю в дозах 0,25, 0,5 или 1 мг/кг подкожно и наблюдали клиническую переносимость при всех дозах ( $\leq 2,5$  мг/кг, средняя AUC [0-336 ч]  $\leq 600$  мкг•ч/мл). Самые высокие воздействия были отмечены в течение первой недели каждого исследования и значительно уменьшились в течение второй недели из-за влияния ADA. Неблагоприятные результаты наблюдали только в ходе исследования дважды в неделю и включали капсулярную фиброплазию и воспаление селезенки при всех дозах ( $\geq 0,5$  мг/кг 2 раза в неделю, средняя AUC  $\geq 189$  мкг•ч/мл в 1-й день) и снижение числа тромбоцитов при 2,5 мг/кг (от  $0,8\times$  до  $0,4\times$ ). Капсулярную фиброплазию селезенки с воспалением рассматривали как неблагоприятную при всех дозах два раза в неделю из-за умеренной или выраженной тяжести, а также связывали с минимальным или легким воспалением в брыжейке (рядом с желудком и поджелудочной железой), что еще больше способствовало неблагоприятному результату. В результате NOAEL не была определена в исследовании дозирования два раза в неделю. Другие заметные неблагоприятные результаты при всех дозах ( $\geq 0,5$  мг/кг два раза в неделю) включали увеличение эозинофилов (от  $3\times$  до  $22\times$  в контрольной группе), отражение фармакологической активности агонистов IL-2 и связанное с повышением IL-2, и повышенную частоту и/или тяжесть инфильтрации эозинофилов в несколько органов. В целом, уменьшенные уровни доз и частота (один раз в неделю), выбранные для второго 2-недельного исследования на крысах, оказались успешными в поддержании целевого воздействия и снижении нежелательной фармакологии по сравнению с тем, что было продемонстрировано при дозировании 2 раза в неделю. Первичные эффекты, связанные с BMS-986326, были в основном минимальными по степени тяжести при всех дозах один раз в неделю (0,25, 0,5 или 1 мг/кг) и включали увеличение количества эозинофилов (от  $1,9\times$  до  $6,7\times$ ), минимальную капсулярную фиброплазию/фиброз селезенки без воспаления или вовлечения прилежащей брыжейки и фармакологически опосредованную инфильтрацию эозинофилов в несколько тканей, ни одно из которых не рассматривали как неблагоприятное из-за низкой степени изменений и отсутствия доказательств какого-либо нарушения функциональной целостности вовлеченных органов. NOAEL у крыс после еженедельного приема в течение 2 недель составляла 1 мг/кг (средняя AUC 162 мкг•ч/мл).

**[0313]** В 2-недельном исследовании токсичности на обезьянах при еженедельных дозах 0,125, 0,25 или 0,75 мг/кг подкожно BMS-986326 клинически переносился при дозе  $\leq 0,25$  мг/кг, но приводил к неблагоприятным клиническим признакам токсичности, согласующимся с агонизмом IL-2R и иммуностимуляцией при дозе 0,75 мг/кг, включая



снижение активности, обезвоживание, эритему, петехию и повышение температуры тела. При всех дозах заслуживающие внимания токсикологические данные, связанные с BMS-986326, как правило, были зависимыми от дозы и в первую очередь включали воздействие на лейкоциты (а именно эозинофилию [от  $4\times$  до  $40\times$ ] с сопутствующим воспалением/инфильтрацией тканей), снижение массы эритроцитов (от  $0,9\times$  до  $0,6\times$  перед тестом) и тромбоцитов (от  $0,9\times$  до  $0,6\times$ ), скопление красной пульпы селезенки, увеличение массы печени (от 16% до 75%), коррелирующее с повышенной клеточностью, синусоидным лейкоцитозом и гипертрофией клеток Купфера и минимальную или умеренную миелоидную гиперплазию костного мозга, вероятно, регенеративную реакцию на эозинофилию. От минимального до легкого, как правило, многоочаговое смешанное клеточное воспаление возникало во многих тканях и органах (связанное с дозой число от  $\sim 16$  до 28 пораженных тканей), включая сосудистое сплетение в головном мозге и сосудистую оболочку глаза. Смешанное клеточное воспаление сосудистой оболочки глаза и сосудистого сплетения головного мозга при дозе  $\geq 0,25$  мг/кг/неделя и снижение массы эритроцитов при дозе 0,75 мг/кг/неделю рассматривали неблагоприятным из-за тяжести и характера результатов, но не рассматривали неблагоприятным при дозе 0,125 мг/кг/неделю из-за минимальной тяжести и низкой заболеваемости. При высокой дозе 0,75 мг/кг/неделя дополнительные заметные результаты включали увеличение частоты сердечных сокращений (от 25% до 28%) с ассоциированным уменьшением интервала R-R, которое, как полагают, было вторичным по отношению к высвобождению цитокинов и рассматривалось неблагоприятным, вакуолизацию гепатоцитов печени от минимальной до умеренной, регенерацию кортикальных канальцев в почках от минимальной до легкой и только при умерщвлении дегенерацию аксонов седалищного нерва от минимальной до легкой у 2 самцов. На основе неблагоприятного воспаления сосудистой оболочки глаза и сосудистого сплетения головного мозга при дозе  $\geq 0,25$  мг/кг/неделя (среднее значение  $AUC[0-168ч] \geq 234$  мкг•ч/мл) и сопутствующих клинических признаках и неблагоприятного снижения массы эритроцитов при дозе 0,75 мг/кг/неделя (среднее значение  $AUC[0-168ч] \geq 601$  мкг•ч/мл), полагают, что NOAEL составляет 0,125 мг/кг/неделя (среднее значение  $AUC[0-168ч]$ ) 132 мкг•ч).

**[0314]** В 12-недельном исследовании на обезьянах диапазон доз и частота были снижены по сравнению с 2-недельным исследованием с BMS-986326, вводимым в дозах 0,0625, 0,125 или 0,25 мг/кг подкожно каждые 3 недели (дни 1, 22, 43 и 64). При всех дозах результаты, связанные с BMS-986326, не были неблагоприятными и включали минимальное или легкое неблагоприятное увеличение количества эозинофилов (от  $3\times$  до  $8\times$  от контроля), увеличение размера и массы селезенки (от 26 до 65%) и минимальную

эозинофильную миелоидную гиперплазию костного мозга. Важно отметить, что не было отмечено инфильтрации эозинофилов или мононуклеаров в другие ткани. Основываясь на отсутствии клинических эффектов и неблагоприятном характере клинической патологии и патологических данных в качестве NOAEL рассматривали самую высокую протестированную дозу 0,25 мг/кг/доза (среднее значение AUC 306 мкг•ч /мл).

**[0315]** Сравнение доз между BMS-986326 и rhIL-2 в неклинических исследованиях является сложной задачей, учитывая разную структуру BMS-986326, склонность большинства BMS-986326 циркулировать в виде неактивного димера, сильно отличающуюся фармакокинетику BMS-986326 по сравнению с rhIL-2 и широко различающиеся режимы дозирования для разных видов и исследований. Качественно профиль токсичности BMS-986326 предполагает некоторое сходство с rhIL-2, но также имеет значительные отличия. Сходства включают эозинофилию и инфильтрацию тканей лейкоцитами, преимущественно эозинофильными, а иногда и мононуклеарными клетками. Эти результаты наблюдаются во всех токсикологических исследованиях BMS-986326 и сообщаются для rhIL-2 у различных видов, при различных парадигмах дозирования и с различной степенью тяжести. Эозинофилия, которая также наблюдается клинически как при низких, так и при высоких дозах rhIL-2 (Proleukin® (aldesleukin), Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.), вероятно, является вторичной по отношению к продукции IL-5 клетками ILC2, стимулируемыми IL (Van Gool *et al.*, *Blood* 124:3572-6 (2014), Anderson *et al.*, *Int Rev Exp Pathol.* 34 Pt A:57-77 (1993)), и не была указана как нежелательное явление в исследованиях BMS-986326. Что касается лейкоцитарной инфильтрации в тканях, то печень была основным органом-мишенью для rhIL-2, но не была значимой мишенью для BMS-986326 в дозах, изученных в опорных исследованиях токсичности (Anderson *et al.*, *Int Rev Exp Pathol.* 34 Pt A:57-77 (1993), Harada *et al.*, *Int Rev Exp Pathol.* 34 Pt A:37-55 (1993)). Дисфункция печени является частым побочным эффектом высоких доз rhIL-2 при онкологических заболеваниях, в то время как дисфункция печени не наблюдалась в клинических испытаниях низких доз rhIL-2 при различных показаниях, включая GvHD, сахарный диабет 1 типа, круговую алопецию и SLE (Castela *et al.*, *JAMA Dermatol.* 150:748-51 (2014), He *et al.*, *Nat Med.* 22:991-93 (2016), Klatmann *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 15:283-94 (2015), Koreth *et al.*, *Blood* 128:130-37 (2016)). В дополнение к дисфункции печени CLS ограничивает терапию у людей при онкологических заболеваниях с высокими дозами IL-2. CLS не наблюдали для BMS-986326 в опорных доклинических исследованиях GLP.

**[0316]** В целом дозы NOAEL в опорных исследованиях BMS-986326 обеспечивают подходящий предел воздействия для начальной дозы и повышения дозы,

предложенных для исследования однократной дозы первого введения человеку (FII) у нормальных здоровых участников.

### **III.B. Клиническая оценка фазы 1 BMS-986326**

#### Общий обзор

**[0317]** BMS-986326 оценивали в фазе 1 рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования однократных возрастающих доз (SAD) для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) однократных доз BMS- 986326 у здоровых взрослых участников.

**[0318]** Основной целью исследования является оценка безопасности и переносимости однократных возрастающих внутривенных (IV) и подкожных (SC) доз BMS-986326 у здоровых участников.

**[0319]** Второстепенные цели исследования включают:

- определение фармакокинетики разовой дозы IV и SC BMS-986326 у здоровых участников,
- определение абсолютной биодоступности BMS-986326 после подкожного введения по сравнению с внутривенным введением,
- оценку PD после SC и IV введения BMS-986326 и
- оценку потенциала иммуногенности после SC и IV введения BMS-986326.

#### Целевая популяция субъектов

**[0320]** Здоровые взрослые участники имеют право на участие в исследовании. Критерии включения в исследование тщательно рассматривают для обеспечения безопасности участников исследования и возможности использования результатов исследования. Включение здоровых участников вместо пациентов позволяет четко интерпретировать результаты по безопасности, поскольку отсутствуют смешанные факторы, возникающие в результате изменений в состоянии болезни, сопутствующей органной дисфункции и/или сопутствующих препаратов. Кроме того, оценка нового молекулярного объекта у здоровых участников позволяет избежать риска потенциального обострения заболевания, если она проводится у пациентов.

**[0321]** Включение участников, получавших плацебо, в каждую группу исследования облегчает оценку любых изменений по сравнению с исходными параметрами, оцененными в исследовании для всех процедур исследования, и помогает определить, связаны ли эти изменения с введением BMS-986326 или с процедурами исследования.

Общий план исследования

**[0322]** Участников исследования рандомизируют приблизительно в 9 групп по уровню дозы, из которых 8 групп (IV группы A1-A5, SC группы B1-B3) и 1 необязательная IV (A6) группа.

**[0323]** Общая продолжительность исследования для каждого участника составляет до 12 недель, включая до 28-дневный скрининговый период, 21-дневный период стационарного наблюдения в клиническом центре и приблизительно 34-дневный амбулаторный/наблюдательный период.

**[0324]** Приблизительно до 6 групп (группы A1-A6) получают одну внутривенную инфузию BMS-986326 в соответствии с процедурой введения исследуемого продукта, представленной ниже. Приблизительно 3 группы (группы B1-B3) получают однократную дозу, вводимую посредством подкожной инъекции (инъекций) BMS-986326 в соответствии с процедурой введения исследуемого продукта, представленной ниже. Поскольку это первое исследование на людях (FII), его план позволяет поэтапно собирать данные о безопасности, переносимости, PK и PD. Подкожное введение BMS-986326 происходит после того, как продемонстрирована приемлемая безопасность и переносимость в группе участников, которые получили подобную дозу внутривенно.

**[0325]** Дозорная группа из 2 здоровых участников оценивается во всех группах. Эта дозорная группа рандомизирована 1:1 для плацебо или BMS-986326. Остальные 6 участников в пределах каждого уровня дозы рандомизированы 1:5 для плацебо или BMS-986326, соответственно. По меньшей мере через 120 часов после введения дозы в дозорной группе, если профиль безопасности является приемлемым профилем безопасности (на основании, как минимум, нежелательных явлений (НЯ), сопутствующих препаратов и процедур, а также любых других важных клинических наблюдений, связанных с безопасностью), остальные группы получают дозу в соответствии с рандомизированным графиком. Для групп IV оставшиеся 6 участников получают дозу последовательно, максимум 2 участника в день. Согласно некоторым аспектам участникам вводят дозу с интервалом по меньшей мере 2 часа между участниками.

**[0326]** SC группы уровня дозы не подвергали оценке прежде, чем была продемонстрирована приемлемая безопасность и переносимость в группе участников, которые получали подобную дозу IV, и были оценены данные PD (количество Treg и отношение Treg к обычным клеткам CD4 [Tconv]).

**[0327]** В ходе исследования каждый участник проходит период скрининга и период лечения (включая базовые и амбулаторные визиты), как показано на фиг. 1A. Участники проверяются на пригодность. Приемлемые участники проживают в

клиническом центре со дня -2 или дня -1 до дня 21. Исследуемый продукт (либо плацебо, либо BMS-986326) вводят в день 1 в соответствии с графиком рандомизации. Участников выписывают из клинического центра на 21-й день после удовлетворительной оценки безопасности и выполнения необходимых процедур исследования. Участники возвращаются для амбулаторных визитов на 28, 36, 45 и 55 дни, чтобы оценить устойчивость экспансии Treg после ожидаемого пикового ответа PD между 10-м и 18-м днями и развития потенциальных ADA. Если участник досрочно прекращает участие в исследовании, проводится досрочное завершение визитов.

**[0328]** После того, как в каждой группе завершают введение дозы, данные о безопасности, включая без ограничения нежелательные явления, данные физического осмотра (PE), показатели жизненно важных функций, ЭКГ безопасности в 12 отведениях, оценку места инъекции, результаты клинических лабораторных тестов безопасности (включая количество эозинофилов), сопутствующие лекарственные средства/процедуры и данные PD (включая количество Treg и отношение Treg к Tconv) анализируют до повышения дозы. Данные фармакокинетики для завершенных групп используют для прогнозирования воздействия на постоянной основе.

**[0329]** Запланированные уровни доз показаны на фиг. 1B. Запланированные уровни доз, включая максимальную дозу, могут быть скорректированы в зависимости от новых данных PD и PK из предыдущих групп (включая данные о биодоступности из групп SC), как описано в процедурах повышения дозы, представленных ниже. Когда требуется изменение запланированного шага повышения дозы, максимальный шаг повышения дозы приблизительно в  $\leq 3$  раза превышает предыдущий уровень дозы. Вводят только внутривенные дозы, которые, как прогнозировано, имеют среднюю площадь экспозиции под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени, экстраполированную на бесконечное время ( $AUC[INF]$ ), которая не превышает  $AUC[0-336 \text{ часов (ч)}]$  приблизительно 757 мкг•ч/мл. Вводят только SC дозы, для которых прогнозируется среднюю экспозицию ( $AUC[INF]$ ), не превышающую  $AUC(0-504\text{ч}) \leq 306 \text{ мкг}\cdot\text{ч}/\text{мл}$ .

**[0330]** Повышение до следующего уровня дозы может быть прекращено, если у субъекта возникнет серьезное нежелательное явление, как описано в Критериях изменения дозы/прекращения лечения, представленных ниже. Серьезные нежелательные явления включают любое новое неблагоприятное медицинское явление или ухудшение ранее существовавшего заболевания у участника клинического исследования, получавшего исследуемое лечение, и которые не обязательно имеют причинно-следственную связь с этим лечением.

Первичные и вторичные конечные точки

**[0331]** Первичные конечные точки настоящего исследования, которые используются для оценки основной цели оценки безопасности и переносимости однократных восходящих внутривенных и подкожных доз BMS-986326 у здоровых участников, включают оценку нежелательных явлений, клинико-лабораторных показателей, показателей жизнедеятельности, электрокардиограммы и физическое обследование. Эти оценки обсуждаются ниже.

**[0332]** Конечные точки исследования, связанные со вторичной целью определения фармакокинетики однократной дозы («ПК») внутривенного и подкожного введения BMS-986326 у здоровых участников, включают параметры фармакокинетики сыворотки, такие как:

- $C_{max}$ : максимальная наблюдаемая концентрация в сыворотке,
- $T_{max}$  : время максимальной наблюдаемой концентрации в сыворотке;
- $AUC(0-T)$ : площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нулевого времени до времени последней определяемой количественно концентрации,
- $AUC(INF)$ : площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нулевого времени, экстраполированного на бесконечное время,
- $CLT/F$  или  $CLT$ : кажущийся общий клиренс тела или общий клиренс тела для внутривенного введения,
- $V_z/F$  или  $V_z$ : кажущийся объем распределения в терминальной фазе или объем распределения в терминальной фазе для IV,
- $T_{-HALF}$ : период полужизни терминальной фазы и
- $F$ : абсолютная биодоступность.

**[0333]** Конечные точки исследования, относящиеся к вторичной цели определения абсолютной биодоступности BMS-986326 после подкожного введения по сравнению с внутривенным введением, включают следующие средние геометрические отношения SC (тест) к IV (эталон):  $C_{max}$ ,  $AUC(0-T)$  и  $AUC(INF)$ , скорректированные на дозу.

**[0334]** Конечные точки исследования, связанные со вторичной целью оценки фармакодинамики после подкожного и внутривенного введения BMS-986326, включают измерение изменения по сравнению с исходным уровнем количества  $T_{reg}$  и отношения  $T_{reg}$  к  $T_{conv}$ .

**[0335]** Конечные точки исследования, связанные со вторичной целью оценки потенциала иммуногенности после подкожного и внутривенного введения BMS-986326,

включают измерение частоты появления анти-лекарственное средство антител, которые могут быть или не быть нейтрализующими.

#### Обоснование сигнального дозирования

**[0336]** В исследовании использовали сигнальную стратегию дозирования, чтобы свести к минимуму риск в случае непредвиденных острых событий, связанных с безопасностью. Два здоровых участника (1 активный и 1 плацебо) оценивали во всех группах доз исследования. За каждой дозорной группой наблюдали минимум 120 часов, прежде чем остальным участникам той же группы вводили дозу. Основываясь на исследованиях токсичности на обезьянах, которые показали, что пиковые фармакологические ответы обычно наблюдались, начиная с 4-го дня после введения дозы, мониторинг клинической безопасности в течение по меньшей мере 5 дней охватывает потенциальные проблемы безопасности острого начала, такие как синдром капиллярной утечки (CLS) или иммунная активация (например, синдром высвобождения цитокинов). Решение продолжить введение доз оставшимся участникам в той же группе, что и дозорные участники, принимается на основе доступных данных о безопасности (например, нежелательных явлений (НЯ), основные показатели жизнедеятельности, физические осмотры (PE), электрокардиограмма (ЭКГ) и клинические лабораторные исследования).

#### Обоснование диапазона доз

**[0337]** Ожидается, что диапазон доз, выбранный для исследования, обеспечит диапазон экспозиции и фармакологической активности, который обеспечит адекватные, соответствующие стадии данные о безопасности и позволит охарактеризовать взаимоотношение.

**[0338]** Выбор начальной дозы 0,1 мг IV основан на имеющихся доклинических фармакокинетических, токсикологических и фармакологических данных. PK/PD моделирование и симуляции были выполнены для получения профилей прогнозирования PK и PD человека на основе доклинических данных. Фактическое повышение дозы (не более чем приблизительно 3-кратное увеличение дозы) и фактические тестируемые дозы определяются на основании полученных в исследовании данных о PK, PD и безопасности. Исследование представляет собой исследование FII, предназначенное для учета данных о безопасности, переносимости, PK и PD.

**[0339]** В таблице 4 перечислены прогнозируемые изменения PD и воздействия в результате предложенных доз:

**Таблица 4. Прогнозируемые воздействия и пиковые фармакодинамические ответы при предполагаемых дозах для человека**

Доза, мг	C <sub>max</sub> , мкг/ Мл	AUC (INF), мкг·ч/ Мл	IV дозирование		SC дозирование		Δ% Treg в CD4+	Крат- ность изме- нения Tregs	Крат- ность изме- нения CD8+
			Предел NOAEL	Предел NOAEL	Предел NOAEL	Предел NOAEL			
			C <sub>max</sub> SDIV обезья- яны) <sup>a,c</sup>	AUC (SD IV обезья- яны) <sup>a,c</sup>	C <sub>max</sub> (MD SC обезья- яны) <sup>b,c</sup>	AU (MD SC обезья- яны) <sup>b,c</sup>			
IV дозирование									
0,1	0,087	7,81	140,2	96,9	28	39	<1	<2	<2
0,3	0,258	23,2	47,3	32,6	9,0	12,6	2	<2	<2
1	0,864	7,77	14,1	9,7	3,0	4,2	5	2-4	<2
3	2,59	232,8	4,7	3,3	1,0	1,4	12	4-8	<2
6	5,18	465,9	2,4	1,6	0,5	0,7	20	7-15	~2
9 <sup>d</sup>	7,77	698,9	1,6	1,1	0,3	0,43	25	10-20	~2
SC дозирование									
1	0,21	35,7	60,0	21,0	12,0	8,4	2	2-3	<2
3	0,61	106,6	20,0	7,0	4,0	2,8	7	3-5	<2
6	1,2	217	10,0	3,5	2,0	1,4	12	4-8	<2
8 <sup>e</sup>	1,6	286,4	4,2	2,64	1,4	1,06	16	5-10	~2

Аббревиатуры: AUC = площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени, AUC(INF) = площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нулевого времени, экстраполированного на бесконечное время, C<sub>max</sub> = максимальная наблюдаемая концентрация в сыворотке, IV = внутривенно, MD = многократная доза, NOAEL = доза, не вызывающая обнаруживаемых нежелательных эффектов, Q3W = один раз каждые 3 недели, SC = подкожно, SD = подкожно, SD = однократная доза, Treg = регуляторная Т-клетка.

<sup>a</sup> Воздействия однократного внутривенного введения обезьянам используются для определения диапазона внутривенных доз у людей.

<sup>b</sup> Воздействия 3-месячного (Q3W) подкожного введения обезьянам используются для определения диапазона подкожных доз у человека.



---

<sup>c</sup> Пределы безопасности, рассчитанные для внутривенной дозы для человека из доклинической SC NOAEL дозы NOAEL, и наоборот, скорректированные на 46% SC прогнозируемой биодоступности BMS-986326 у людей.

<sup>d</sup> Необязательную группу А6 включали, если наблюдаются менее ожидаемые PD эффекты.

<sup>e</sup> Эта доза представляет собой прогнозируемую дозу, основанную на текущих прогнозах доклинических доз, которая, как ожидается, обеспечит среднюю AUC(INF), аналогичную NOAEL (AUC [0–504h]) для 12-недельного исследования Q3W SC на обезьянах.

---

Фармацевтические свойства и состав исследуемого продукта (BMS-986326-01 для инъекции, 30 мг/флакон (25 мг/мл))

**[0340]** BMS-986326-01 для инъекций (30 мг/флакон; 25 мг/мл) разрабатывали для использования в виде внутривенной инфузии или подкожной инъекции (инъекций) в ходе клинического исследования фазы 1. Лекарственное средство представляет собой апирогенный лиофил, представляющий собой лепешку от белого до почти белого цвета, цельную или фрагментированную, содержащуюся в стеклянном флаконе Типа I 3 кубических сантиметра, закрытом 13-мм пробкой и запаянном 13-мм алюминиевой пробкой. Каждый флакон лекарственного средства содержит указанное количество лекарственного вещества BMS-986326, одноосновного фосфата натрия, двухосновного фосфата натрия, сахарозы, пентетиновой кислоты и полисорбата 80, а также соляной кислоты и гидроксида натрия (для корректировки значения pH) при pH 7,0. В каждый флакон включен избыток 0,31 мл для учета задержки VNS (флакон, игла, шприц). Препарат восстанавливают перед введением.

**[0341]** Перед введением каждый флакон BMS-986326-01 для инъекций (30 мг/флакон, 25 мг/мл) восстанавливают 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций (физиологический раствор) до концентрации белка 25 мг/мл. Для подкожного применения лекарственное средство можно вводить через встроенный фильтр в виде болюсной подкожной инъекции либо в неразбавленном виде при концентрации белка 25 мг/мл, либо разбавленным 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций до концентрации белка 0,2 мг/мл. Для внутривенного введения лекарственное средство вводят через встроенный фильтр, лекарственное средство разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций до концентрации белка в диапазоне 0,2 мг/мл до 5 мг/мл перед инфузией.

**[0342]** Не было обнаружено несовместимости между инъекцией BMS-986326 и мешками из полиолефина без ди(2-этилгексил)фталата (DEHP) или PVC (DEHP-пластифицированного), DEHP-свободными или PVC (DEHP-пластифицированными) IV наборами и полиэфирсульфоновыми или нейлоновыми фильтрами 0,2 мкм.

**[0343]** Плацебо для BMS-986326-01 для инъекций представляет собой коммерчески доступный 0,9% хлорид натрия для инъекций.

**[0344]** Флаконы BMS-986326-01 для инъекций (30 мг/флакон, 25 мг/мл) хранили в холодильнике при температуре 2°-8°C (36°-46°F) и защите от света и замерзания.

**[0345]** Восстановленные и разведенные растворы BMS-986326-01 для инъекций можно хранить в холодильнике при температуре 2°-8°C (36°-46°F) в течение до 24 часов и максимум 4 часа из в общем 24 часов при комнатной температуре 15°-25°C (59°-77°F) с воздействием комнатного освещения. Максимальный 4-часовой период при комнатной температуре и комнатном освещении включает период введения продукта.

#### Процедура введения исследуемого продукта

**[0346]** Участники групп IV (A1-A6) получают однократную дозу, вводимую путем внутривенной инфузии в День 1. Участники групп подкожного введения (B1-B3) получают одну дозу, вводимую путем инъекции (инъекций) SC в День 1. Запланированные уровни доз для каждой группы включены в Таблицу 5 ниже. Как описано в приведенных ниже процедурах повышения дозы, запланированные уровни доз, включая максимальную дозу, могут изменяться в зависимости от новых данных о фармакокинетике и фармакокинетике из предыдущих групп, включая данные о биодоступности из групп подкожного введения. Если потребуется изменение запланированного (запланированных) шага (шагов) повышения дозы, максимальный шаг увеличения дозы будет приблизительно в  $\leq 3$  раза выше предыдущего уровня дозы.

**[0347]** Каждый участник получал дозу подкожно или внутривенно в зависимости от группы дозы BMS-986326. SC инъекция (инъекции) медленно и постепенно вводили в кожную складку живота (за исключением 5 см вокруг пупка). Максимальный объем каждой инъекции составлял 2 мл. Реакции в месте инъекции контролировали на наличие реакций, как описано ниже. BMS-986326 вводили в течение приблизительно 30–60 минут. Более короткое время инфузии может быть использовано для групп с начальной дозой, а более длительное время инфузии может быть использовано для групп с более высокой дозой. Реакции, связанные с инфузией (IRR), контролировали.

Таблица 5

Исследование Лечение	Величина (величины) единичной дозы/уровень (уровни) дозы <sup>a</sup>	Частота введения лекарственной формы	Путь введения
Группа A1			
BMS-986326	0,1 мг	Инфузия один раз	IV
Группа A2			
BMS-986326	0,3 мг	Инфузия один раз	IV
Группа A3			
BMS-986326	1 мг	Инфузия один раз	IV
Группа A4			
BMS-986326	3 мг	Инфузия один раз	IV
Группа A5			
BMS-986326	Приблизительно 6 мг	Инфузия один раз	IV
Группа A6 (необязательная)			
BMS-986326	Максимальная IV доза <sup>b</sup>	Инфузия один раз	IV
Группа B1			
BMS-986326	1 мг	Инъекция (инъекции) Один раз	SC
Группа B2			
BMS-986326	3 мг	Инъекция (инъекции) Один раз	SC
Группа B3			
BMS-986326	Приблизительно 6 мг <sup>c</sup>	Инъекция (инъекции) Один раз	SC

Аббревиатуры: AUC(0-T) = площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нулевого времени до времени последней определяемой концентрации, AUC(INF) = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нулевого времени, экстраполированного на бесконечное время, IV = внутривенно, NOAEL = доза, не вызывающая обнаруживаемых нежелательных эффектов, PD = фармакодинамика, PK = фармакокинетика, Q3W = один раз каждые 3 недели, SC = подкожно.

<sup>a</sup> Это предлагаемые дозы, однако, фактическая доза может меняться в зависимости от данных по безопасности, PK и PD.

<sup>b</sup> Максимальная внутривенная доза будет представлять собой дозу, которая, как ожидается, обеспечит среднее воздействие ( $AUC[INF]$ ), не превышающее NOAEL ( $AUC[0-336h] \leq 757$  мкг·ч/мл) для токсикологического исследования однократной внутривенной дозы на обезьянах.

<sup>c</sup> Доза, превышающая 6 мг подкожно, может быть испытана вплоть до дозы, которая, как ожидается, обеспечит среднее воздействие ( $AUC[INF]$ ), которое не превысит NOAEL ( $AUC[0-504 ч] \leq 306$  мкг·ч/мл) для 12-недельного токсикологического исследования у обезьян Q3W SC.

#### Процедура повышения дозы: IV группы A1-A6

**[0348]** Решения о повышении дозы принимали с учетом безопасности, переносимости и PD (количество Treg и отношение Treg к Tconv). Оценка данных по безопасности, изучаемая перед каждым повышением дозы, включает НЯ, РЕ, показатели жизнедеятельности, ЭКГ безопасности в 12 отведениях, клинические лабораторные тесты и сопутствующие лекарственные средства/процедуры. Перед передачей в следующую группу уровня дозы анализировали данные о безопасности минимум за 21 день из предыдущей групп уровня дозы. Введение следующего уровня дозы не начинали до тех пор, пока безопасность и переносимость предыдущей (IV или SC) группы уровня дозы не будут оценены и признаны приемлемыми.

**[0349]** В дополнение к безопасности и переносимости, данные PD (количество Treg и отношение Treg к Tconv) анализировали после того, как в каждой группе уровня дозы IV завершали введение дозы, и использовали для обоснования решений о повышении дозы. Более высокие уровни IV доз не исследовали, если новые данные PD указывают на то, что существует не только плато ответа PD (т.е. кратное увеличение пика Treg) в пределах 3 последовательных групп уровней доз IV, но также и приблизительно равное кратное увеличение пиков (по меньшей мере в 2 раза) в клетках Treg и Tconv, что свидетельствует о потере селективности. Данные по безопасности и PD от по меньшей мере 6 из 8 подлежащих оценке участников в группе должны пройти проверку безопасности перед повышением дозы при условии, что любое прекращение приема не связано с BMS-986326. В целях повышения дозы оцениваемый участник определяется как участник, который получает одну дозу исследуемого продукта (BMS-986326 или плацебо).

**[0350]** Данные фармакокинетики из более ранних групп использовали для прогнозирования средней экспозиции на постоянной основе по мере доступности. Данные фармакокинетики из предыдущих групп, включая группу A5, использовали для принятия

решения о повышении дозы для перехода от группы А5 к необязательной группе А6 в дополнение к данным о безопасности и PD.

**[0351]** Запланированные уровни доз могут быть модифицированы или исключены на основе данных, полученных от предыдущих групп. Исследуемая максимальная внутривенная доза представляет собой дозу, которая, как ожидается, обеспечит среднюю экспозицию AUC(INF), которая не превышает экспозицию NOAEL ( $AUC[0-336 \text{ ч}] \leq 757 \text{ мкг} \cdot \text{ч} / \text{мл}$ ) у любого отдельного участника. Если требуется изменение запланированного (запланированных) шага (шагов) повышения дозы, максимальный шаг увеличения дозы приблизительно  $\leq 3$  раза превышает предыдущий уровень дозы.

#### Процедура повышения дозы для групп SC B1-B3

**[0352]** Подкожное введение BMS-986326 участникам первой группы SC уровня дозы (1 мг) начинали через 21 день после рассмотрения данных о безопасности для группы с уровнем дозы 1 мг внутривенно. Повышение дозы для следующей группы уровня дозы SC проводили после анализа данных по безопасности, переносимости и PD (количество Treg и отношение Treg к Tconv) как для предыдущей группы уровня дозы подкожного введения (более низкая доза), так и для предыдущей группы уровня дозы внутривенного введения (подобная доза). Оценка данных по безопасности, просматриваемых перед каждым повышением дозы, включает НЯ, РЕ, показатели жизненно важных функций, ЭКГ безопасности в 12 отведениях, клинические лабораторные тесты и сопутствующие лекарственные средства/процедуры. Перед повышением дозы анализировали как минимум 21-дневные данные по безопасности для обеих предшествующих групп уровня дозы.

**[0353]** Данные по безопасности от по меньше мере 6 из 8 подлежащих оценке участников в каждой группе подкожных инъекций анализировали перед повышением дозы, при условии, что прекращение лечения не связано с BMS-986326. В целях повышения дозы подлежащий оценке участник определяется как участник, получивший одну дозу исследуемого продукта (BMS-986326 или плацебо).

**[0354]** Данные фармакокинетики для более ранних групп использовали для прогнозирования средней экспозиции на постоянной основе по мере доступности. Вводили только SC дозы, которые, по прогнозам, не превышают стационарную экспозицию ( $AUC[0-12 \text{ ч}]$ ) приблизительно  $306 \text{ мкг} \cdot \text{ч} / \text{мл}$  у любого отдельного участника.

**[0355]** Запланированные уровни доз могут быть модифицированы или исключены на основе данных, полученных от предыдущих групп. Если требуется изменение запланированного (запланированных) шага (шагов) повышения дозы,

максимальный шаг увеличения дозы приблизительно  $\leq 3$  раза превышает предыдущий уровень дозы.

#### Критерии модификации/прекращения дозы

**[0356]** Увеличение до следующего уровня дозы может не продолжаться, как планировалось, если выполняется какое-либо из следующих условий для предыдущей группы:

a. Серьезное НЯ (SAE) возникает у одного или нескольких участников, получавших лечение BMS-986326, и считается связанным с BMS-986326,

b. У двух или более участников, получавших лечение BMS-986326, наблюдается тяжелое НЯ, которое считается связанным с BMS-986326,

c. Возникновение тяжелой эозинофилии, которая считается связанной с приемом исследуемого препарата, у двух участников из одной группы. Тяжелая эозинофилия определяется как:

i. Эозинофилия:  $> 5000$  клеток/мкл, сохраняющаяся более 5 дней,

ii. Симптоматическая эозинофилия (эозинофилия  $\geq 1500$  клеток/ мкл): эозинофилия, связанная с дерматитом, мукозитом или  $> 2$ -кратным повышением аланинаминотрансферазы (ALT)/аспартатаминотрансферазы (AST),

d. Новые данные PD указывают на плато ответа PD (т.е. кратное увеличение пика Treg) в пределах 3 последовательных групп внутривенного введения дозы, а новые данные PD указывают на приблизительно одинаковое кратное увеличение пика (по меньшей мере в 2 раза) в клетках Treg и Tconv,

e. Любое другое событие, которое, по мнению исследователя или медицинского наблюдателя, представляет неприемлемый риск для участников в результате увеличения дозы.

**[0357]** Если удовлетворено любое из вышеперечисленных требований, выполняли обзор доступных данных о безопасности, PD (количество Treg и отношение Treg к Tconv) экспозиции. После оценки данных может произойти следующее:

a. Повышение дозы может продолжаться как изначально запланировано. Это допустимо только в том случае, если НЯ, отвечающие критериям прекращения, после обзора оцениваются как не связанные с BMS-986326,

b. Запланированное повышение дозы может быть изменено, чтобы включить повторение уровня дозы, при котором возникло НЯ, отвечающее критериям прекращения, на основании результатов обзора данных по безопасности и переносимости, или если дальнейшее определение характеристик сигнала безопасности является подходящим. Это

допустимо только в том случае, если НЯ, отвечающие критериям прекращения, после обзора оцениваются как не связанные с BMS-986326,

i. Может быть добавлена группа промежуточной дозы (ниже, чем доза, отвечающая критериям прекращения,

c. Повышение дозы может быть прекращено.

#### Протоколы оценки безопасности и переносимости

**[0358]** При скрининге оценки безопасности включают полное физическое обследование, которое включает оценку общего вида и показателей жизнедеятельности, а также обследования глаз, ушей, носа, рта, горла, шеи, органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта/брюшной полости, лимфатических сосудов, опорно-двигательного аппарата, кожи и неврологические обследования. Скрининговые оценки также включают непрерывный холтеровский мониторинг, ЭКГ в 12 отведениях и обзор предшествующего и сопутствующего приема лекарственных средств. Мониторинг основных показателей жизнедеятельности включает температуру тела, частоту дыхания, артериальное давление и частоту сердечных сокращений.

**[0359]** В ходе исследования проводят дополнительные физические осмотры в различные моменты времени в рамках оценки безопасности. Эти последующие медицинские осмотры являются целенаправленными и включают осмотр головы, ушей, глаз, шеи и горла, сердечно-сосудистой, неврологической и дыхательной системы, брюшной полости, кожи (включая оценку места инъекции) и конечностей.

**[0360]** В ходе исследования дальнейшие оценки безопасности и переносимости, которые проводятся в различные моменты времени, также включают мониторинг основных показателей жизнедеятельности, электрокардиограммы, непрерывное холтеровское мониторирование, анализы на туберкулез, мониторинг места инъекции, скрининг COVID-19 и лабораторные оценки клинической безопасности, которые включают клиническую химию, коагуляцию и анализ мочи.

**[0361]** Кроме того, в ходе исследования нежелательные явления и оценки серьезных нежелательных явлений использовали для оценки безопасности. Нежелательные явления, как правило, включают любое новое неблагоприятное медицинское явление или ухудшение ранее существовавшего заболевания у участника клинического исследования, получавшего исследуемое лечение, и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с этим лечением. Эта оценка частично основана на лабораторных результатах, полученных в ходе исследования, а также на результатах других

вышеупомянутых оценок безопасности, которые проводятся в ходе исследования. Серьезные нежелательные явления обычно определяются как любое неблагоприятное медицинское явление, которое при любой дозе либо приводит к смерти, либо представляет угрозу для жизни. Интенсивность и причинно-следственная связь всех нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений оценивают в случае их возникновения.

#### Протоколы оценки фармакокинетики (PK) и иммуногенности BMS-986326

**[0362]** Отдельные образцы сыворотки собирали для оценки фармакокинетики и анти-лекарственное средство антител (ADA) и включали образец сыворотки перед введением дозы, взятый за час до введения BMS-986326 в день 1, образец сыворотки в конце инфузии (EOI), взятый в день 1, и дополнительные образцы сыворотки, взятые на протяжении всего исследования (например, по месту жительства в дни 2-21 и во время амбулаторных посещений в дни 28, 36, 45 и 55).

**[0363]** Приемлемые участники находились в клиническом центре со дня -2 или дня -1 до дня 21. Исследуемый продукт (либо плацебо, либо BMS-986326) вводили в день 1 в соответствии с графиком рандомизации. Участников выписывали из клинического центра на 21-й день после удовлетворительной оценки безопасности и выполнения необходимых процедур исследования. Участники возвращались с целью амбулаторных визитов в дни 28, 36, 45 и 55.

**[0364]** Фармакокинетику BMS-986326 определяли по зависимости концентрации в сыворотке от времени. Оцениваемые фармакокинетические параметры включают  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC(0-T)$ ,  $AUC(INF)$ ,  $CLT/F$  или  $CLT$ ,  $V_z/F$  или  $V_z$ ,  $T-HALF$  и  $F$ .

**[0365]** Значения параметров PK отдельных участников получали некомпартаментными способами с помощью утвержденной программы анализа PK. Для анализа использовали фактические моменты времени.

**[0366]** Образцы сыворотки анализировали на присутствие BMS-986326 с помощью валидированного анализа связывания лиганда, который измеряет общее количество лекарственного средства, включая уровни как димера, так и мономера. Образцы фармакокинетики, взятые у участника, получившего плацебо, не анализировали. Кроме того, образцы сыворотки архивировали для потенциального анализа мономеров. Уровни мономера могут быть измерены с помощью невалидированного исследовательского анализа связывания лиганда.

**[0367]** Образцы иммуногенности анализировали на антитела против BMS-986326 с помощью подтвержденного анализа иммуногенности. Образец перед введением дозы собирали в День 1; последующие образцы могут быть взяты на 15, 28 и 55 дни. Образцы,



для которых подтвержден положительный результат, титровали и сохраняли для возможного последующего анализа нейтрализующих антител к эндогенному IL-2 с использованием валидированного анализа.

#### Протоколы оценки фармакодинамики (PD) BMS-986326

**[0368]** Образцы крови собирали и измеряли с помощью проточной цитометрии для количественного определения иммунных клеток, таких как Treg, Tconv, фолликулярные хелперные Т-клетки (Tfh), В-клетки и NK-клетки, по поверхностным маркерам, которые могут включать без ограничения клеточную линию и маркеры активации CD3, CD4, CD8, CD14, CD25, CD39, CD45, CD45RA, CD56, CD127, Foxp3, Helios, CXCR5, CCR7 и Ki67. Образцы крови также собирали и измеряли с помощью проточной цитометрии для определения взаимодействия BMS-986326 с Treg, Tconv, Т-клетками CD8 и NK-клетками, идентифицированными по pSTAT5.

**[0369]** Анализ супрессии Treg ex vivo проводили в выбранных группах, получающих подкожное введение. Образцы крови собирали и Treg-клетки тестировали ex vivo на супрессивную активность в отношении активированных Tconv-клеток в анализах, которые могут включать без ограничения измерение пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов.

#### Предварительные результаты для группы BMS-986326 A4 (3 мг однократной внутривенной инфузии)

**[0370]** Уровень Treg был повышен по сравнению с исходными уровнями у субъектов, получавших BMS-986326, по сравнению с субъектами, получавшими плацебо.

### **III.C. Слитый белок mIL-2/CD25 индуцирует экспансию Treg и иммунное подавление на доклинических моделях системной красной волчанки**

#### Общий обзор

**[0371]** Treg играют хорошо установленную роль в подавлении иммунного ответа и контроле аутоиммунитета (Bluestone *et al.*, *J Clin Invest.* 125: 2250-60 (2015), Dominguez-Villar *et al.*, *Nat Immunol.* 19: 665-73 (2018)). Таким образом, Treg имеют критическое значение для индукции и поддержания самотолерантности. Нарушение регуляции функции Treg связано с многочисленными аутоиммунными состояниями (Castela *et al.*, *JAMA Dermatol.* 150: 748-51 (2014), Koreth *et al.*, *N Engl J Med.* 365: 2055-66 (2011), Saadoun *et al.*, *N Engl J Med.* 365: 2067-77 (2011)). Промотирование состояния, вызывающего толерантность, является ключевой целью иммунологической терапии следующего

поколения, направленной на безмедикаментозную ремиссию, а индукция и активация Treg представляют собой привлекательную цель для решения этой задачи.

**[0372]** IL-2 был первоначально открыт как мощный фактор роста T-клеток (*Gillis et al., J Exp Med.* 146: 468-82 (1977)), и многие исследования были сосредоточены на его роли в стимулировании провоспалительных иммунных ответов. Например, высокие дозы IL-2 (обычно 500000 ЕД/кг, многократно) являются одобренной терапией для лечения больных раком, чтобы повысить функцию T-клеток и NK-клеток, однако, частота ответов обычно является низкой, и терапия также сопровождается тяжелой токсичностью (*Fraenkel et al., J Immunother.* 25: 373-8 (2002)). Дополнительные роли IL-2 были обнаружены благодаря наблюдению быстрого аутоиммунитета, а не нарушения иммунных ответов у мышей с дефицитом IL-2 или IL-2R (*Sadlack et al., Cell* 75: 253-61 (1993), *Suzuki et al., Science* 268: 1472-76 (1995), *Willerford et al., Immunity* 3: 521-30 (1995)). Этот фенотип является результатом утраты важной роли, которую IL-2 играет в развитии и гомеостазе Treg (*Cheng et al., J Immunol.* 109: 1567-75 (2013), *Fontenot et al., Nat Immunol.* 6: 1142-51 (2005), *Yao et al., Blood* 109: 4368-75 (2007)). В соответствии с данными, полученными на мышах, было обнаружено, что мутации в сигнальном пути человеческого IL-2 связаны с аутоиммунными заболеваниями, варианты аутоиммунного риска в локусах IL-2, IL-2RA и IL-2RB были идентифицированы в рамках полногеномного исследования ассоциации (*Abbas et al., Sci Immunol.* 3 (2018)). Системная красная волчанка (SLE), в частности, была идентифицирована как аутоиммунное заболевание, связанное с дисфункцией Treg, которое связывают с дефицитом IL-2 (*von Spee-Mayer et al., Ann Rheum Dis.* 75: 1407-15 (2016)).

**[0373]** Доклинически было показано, что низкая передача сигналов IL-2R селективно способствует ключевой активности Treg, но не T-эффекторных (Teff) клеток. Лечение мышей низкими уровнями IL-2 предотвращало развитие диабета у мышей с диабетом без ожирения (NOD) (*Grinberg-Bleyer et al., J Exp Med.* 207: 1871-8 (2010), *Tang et al., Immunity* 28: 687-97 (2008), *Yu et al., Immunity* 30: 204-17 (2009)). Сообщалось о нескольких небольших клинических испытаниях низких доз IL-2 с обнадеживающими результатами при SLE (*He et al., Nat Med.* 22: 991-3 (2016), *Klatzmann et al., Nat Rev Immunol* 15: 283-94 (2015)). Однако лечение рекомбинантным IL-2 требует ежедневных инъекций. Кроме того, также наблюдали нежелательное увеличение провоспалительных цитокинов и не-Treg-клеток.

**[0374]** Слитый белок (FP) мышинового IL-2 (mIL-2) и мышинового IL-2R $\alpha$  (CD25), соединенных нерасщепляемым линкером, продемонстрировал большую эффективность *in vivo*, чем рекомбинантный IL-2, в отношении экспансии Treg и контроля диабета у мышей NOD (*Ward et al., J Immunol.* 201: 2579-92 (2018)). *In vivo* mIL-2/CD25 является

долгоживущим, постоянно и селективно стимулирующим Treg (Ward *et al.*). Слитый белок mIL-2/CD25, как продемонстрировано в настоящем документе, эффективен в индукции экспансии Treg и ингибировании волчаночного нефрита у мышей NZB x NZW F1 и MRL/lpr на основе уровней протеинурии, титров аутоантител в сыворотке и гистологических показателей воспаления и повреждения почек. В эффективной дозе mIL-2/CD25 не приводит к увеличению провоспалительных цитокинов или не-Treg-клеток у мышей BALB/c. В совокупности эти данные поддерживают использование слитых белков IL-2/CD25 при лечении пациентов, страдающих SLE.

#### Экспансия Treg CD25 у мышей NZB x NZW

**[0375]** Регуляция Treg нарушена у пациентов, страдающих SLE. Сообщалось, что высокий процент Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) показал более низкий уровень экспрессии CD25, что отражает состояние дефицита IL-2 (Humrich *et al.*, *Expert Rev Clin Immunol.* 12: 1153-60 (2016)). NZB x NZW F1 представляет собой классическую модель спонтанной волчанки, при которой развиваются тяжелые волчаночноподобные фенотипы, сравнимые с таковыми у пациентов, страдающих волчанкой (Xie *et al.*, *J Immunol.* 192: 4083-92 (2014)). Для того, чтобы оценить, отражает ли модель волчанки NZB x NZW также аномалию Treg в отношении более низкой экспрессии CD25, наблюдаемую у пациентов с SLE, спленциты мышей NZB x NZW (n = 5, возраст 26 недель) и контрольных мышей BALB/c (n = 6, возраст 9-10 недель) окрашивали на CD4, FoxP3 и CD25. Репрезентативные точечные графики показаны на фиг. 2А. Клетки CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> представляют собой Treg. У репрезентативной мыши BALB/c 73% Treg были CD25<sup>hi</sup>, тогда как у репрезентативной мыши NZB x NZW только 35% Treg были CD25<sup>hi</sup>. Уровень экспрессии CD25 определяли по средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD25 в клетках Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>). Как показано на фиг. 2В, MFI CD25 составлял 1744,8 ± 98,9 (среднее ± SEM) для группы BALB/c, тогда как для мышей NZB x NZW составлял всего 364,2 ± 34,5. Следовательно, аномалия Treg низкой экспрессии CD25, наблюдаемая у пациентов с SLE, подобным образом наблюдается у мышей NZB x NZW.

#### Краткосрочное лечение mIL2-CD25 мышей BALB/c

**[0376]** Перед тестированием хронического эффекта mIL-2/CD25 на мышинной модели волчанки NZB x NZW проводили краткосрочное исследование (7 дней) на мышях BALB/c, получавших три дозы два раза в неделю. В качестве сравнения Fc-mIL2 вводили через день в виде четырех доз. Селезенки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии, плазму оценивали на продукцию цитокинов. Введение mIL-2/CD25 в дозах

0,25 мг/кг и 0,5 мг/кг приводило к большему увеличению процента Treg в гейте CD4<sup>+</sup> по сравнению с Fc-mIL2 (фиг. 3А). Процент клеток CD8<sup>+</sup> в гейте одиночных клеток был снижен из-за увеличения количества Treg, в то время как ни одна из молекул статистически не изменила процент НК-клеток (данные не показаны). Абсолютное количество различных типов клеток в селезенке рассчитывали на основе общего количества клеток в селезенке, чтобы обеспечить чувствительную меру потенциального вовлечения не-Treg. Подобным образом, введение mIL-2/CD25 в дозах 0,25 мг/кг и 0,5 мг/кг показало большее увеличение числа Treg по сравнению с Fc-mIL2 (фиг. 3В). Минимальные изменения в CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> и НК-клетках наблюдали для mIL-2/CD25, тогда как Fc-mIL2 значительно увеличивал эти популяции (фиг. 3С-Е). Измерения циркулирующих цитокинов подтверждают селективность Treg. При введении mIL-2/CD25 в этих дозах цитокины не повышались, и только IL-5 был слегка повышен при дозе 0,5 мг/кг (данные не представлены). Эти результаты подтвердили, что mIL-2/CD25 обеспечивает улучшенное вовлечение Treg и профиль селективности по сравнению с Fc-mIL2, с большим увеличением Treg и отсутствием признаков вовлечения не-Treg. На основании этих результатов был выбран диапазон доз 0,1-0,4 мг/кг два раза в неделю для дальнейшего тестирования эффективности mIL-2/CD25 на животных моделях волчанки.

#### mIL-2/CD25 при ранней волчанке у мышей NZB x NZW

[0377] Для оценки эффекта mIL-2/CD25 на животной модели SLE в исследование включали мышей NZB x NZW F1 в возрасте 22–24 недель с уровнем протеинурии 30 мг/дл (оценка 1). Мышам вводили либо подкожно PBS, либо mIL-2/CD25 два раза в неделю в дозах 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг, либо перорально вводили преднизолон в дозе 10 мг/кг три раза в неделю в качестве положительного контроля (n = 10 на группу). Экспозиция mIL-2/CD25 в сыворотке (AUC и C<sub>max</sub>), определенная после первой дозы, возрастала зависимым от дозы образом в диапазоне доз от 0,1 до 0,4 мг/кг со средним конечным периодом полужизни 20,6 часа. Параметры PK представлены в таблице 6. В ходе 14-недельного эксперимента введение mIL-2/CD25 хорошо переносилось, и не наблюдали потери массы тела (данные не представлены). Прогрессирование заболевания, на основании показателей протеинурии, значительно снижалось при введении mIL-2/CD25 зависимым от дозы образом (фиг. 4А). Процент животных, у которых развилась тяжелая протеинурия с оценкой 3 или выше, также был снижен (фиг. 4В). У мышей также брали кровь и проверяли на наличие аутоантител в сыворотке каждые 2-3 недели. Титры анти-дцДНК IgG были значительно снижены при лечении mIL-2/CD25 по сравнению с мышами, получавшими PBS, зависимым от дозы образом, с максимальным эффектом (достигаемым как при дозах 0,2, так и 0,4 мг/кг),

сравнимым с таковым, наблюдаемым у контрольных мышей преднизолона (фиг. 4С). Микроскопическая оценка выявила значительный гломерулонефрит в почках контрольных мышей, получавших PBS. Это характеризовалось разной степенью гиперклеточности и отложением матрикса в клубочках, белковыми цилиндрами в просветах канальцев и воспалительными клеточными инфильтратами в интерстициальной и периваскулярной тканях. Лечение mIL-2/CD25 значительно снижало гистологические показатели гломерулярного, тубулярного и интерстициального нефрита (фиг. 4D). В заключение, mIL-2/CD25 продемонстрировал эффективность в снижении уровня протеинурии, титров дцДНК IgG и показателей гистологии почек зависимым от дозы образом на модели волчанки NZB x NZW, максимальную эффективность наблюдали при дозах 0,2 мг/кг и 0,4 мг/кг (2 раза в неделю), что сравнимо с эффективностью высоких доз преднизолона.

**[0378]** Для того, чтобы сопоставить эффективность со степенью экспансии Treg, кровь и селезенки (n = 4 на группу) собирали для проточной цитометрии после четырех недель введения доз (через 48 часов после 8-й дозы). Доза лечения mIL-2/CD25 зависела от увеличения процентного Treg (CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) в гейте CD4<sup>+</sup> как в крови, так и в селезенке. В крови процент Treg был значительно увеличен от 2,3 ± 0,1% (среднее значение ± стандартная ошибка среднего) в группе PBS до 11,7 ± 2,3%, 21,9 ± 1,9%, 24,2 ± 0,5% в группах дозы 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг, соответственно (фиг. 5A). Точно так же наблюдали увеличение процента Treg в селезенке при всех дозах (фиг. 5B). Спленоциты также окрашивали на Ki67, чтобы продемонстрировать статус пролиферации Treg. Как показано на фиг. 5C, процент клеток Ki67<sup>+</sup> в гейте Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) увеличивался зависимым от дозы образом от 27,0 ± 6,4 % в группе PBS до 49,5 ± 5,9 %, 56,6 ± 2,4 % и 69,8 ± 8,0 % в группах лечения 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг mIL-2/CD25, соответственно. Экспрессия CD25 на Treg (CD25 MFI), которая была ниже у мышей NZB x NZW по сравнению с мышами Balb/c (фиг. 2B), также повышалась зависимым от дозы образом (фиг. 5D) от 1745 ± 96 MFI в группе, получавшей носитель, до 4361 ± 408, 5340 ± 390 и 5057 ± 335 (±SEM) MFI в группах лечения 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг mIL-2/CD25, соответственно. Treg крови и селезенки также анализировали через 14 недель введения дозы, и результаты были сопоставимы с результатами, полученными на 4 неделе (данные не показаны). В заключение, лечение mIL-2/CD25 увеличивало как количество Treg, так и экспрессию CD25 на Treg, что в результате ингибировало прогрессирование заболевания на мышинной модели волчанки NZB x NZW.

**Таблица 6. Экспозиция в сыворотке mIL-2/CD25 у мышей NZB x NZW**

Доза	0,1 мг/кг s.c.	0,2 мг/кг s.c.	0,4 мг/кг s.c.
Сmax (нМ)	9,5	26,5	56,9

T <sub>max</sub> (ч)	24	24	24
AUC <sub>(0-80h)</sub> (нМ·ч)	368,9	877,2	2045,9
T <sub>1/2</sub> (ч)	24	18	19

**[0379]** Уровни mIL-2/CD25 в сыворотке после подкожного введения 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг дозы mIL-2/CD25 повышались зависимым от дозы образом. Фармакокинетические параметры после подкожной дозы 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг составляли 368,9, 877,2 или 2045,9 нМ·ч, соответственно (AUC<sub>0-80 ч</sub>) и 9,5, 26,5 или 56,9 нМ, соответственно (C<sub>max</sub>). T<sub>max</sub> составляло 24 часа. Средний терминальный период полужизни составлял 20,6 часов.

#### mIL-2/CD25 при развитой волчанке у мышей NZB x NZW

**[0380]** mIL-2/CD25 дополнительно тестировали на его способность ослаблять признаки поздней стадии заболевания, что является более высокой планкой эффективности. Мышей с выраженной протеинурией ( $\geq 100$  мг/дл, возраст  $\sim 27$  недель) включали в 10-недельное исследование лечения. mIL-2/CD25 в дозе 0,3 мг/кг 2 раза в неделю показал значительное снижение уровней протеинурии (фиг. 6A), титров анти-дцДНК IgG (фиг. 6B), уровней IL-12p40 в плазме (фиг. 6C) и оценок гистологии почек на воспаление и повреждение (фиг. 6D). По окончании исследования проводили проточную цитометрию спленоцитов. Процент Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> в гейте CD4<sup>+</sup> увеличился от  $5,5 \pm 0,6\%$  (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего) в группе PBS до  $18,9 \pm 4,8\%$  и  $22,4 \pm 6,3\%$  в группах лечения mIL-2/CD25 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг, соответственно (фиг. 6E). Эти данные подтверждают терапевтический потенциал IL-2/CD25 при лечении пациентов, страдающих волчанкой, на более поздних стадиях.

#### Эффект комбинации mIL-2/CD25 и преднизона у мышей NZB x NZW

**[0381]** Для того, чтобы оценить потенциальную полезность терапии mIL-2/CD25 для снижения зависимости от кортикостероидов, текущего стандарта лечения волчанки, комбинированное исследование с частично эффективными дозами mIL-2/CD25 (0,1 мг/кг подкожно 2 раза в неделю) и преднизолона (1 мг/кг перорально 3 раза в неделю) тестировали на мышцах NZB x NZW с ранней волчанкой и протеинурией 30 мг/дл (возраст 21-23 недели). Группы высокой дозы преднизолона (10 мг/кг, перорально 3 раза в неделю) и mIL-2/CD25 (0,2 мг/кг подкожно 2 раза в неделю) включали в качестве контроля монотерапии с максимальной эффективностью. Как показано на фиг. 7, в то время как монотерапия либо 1 мг/кг преднизолона, либо 0,1 мг/кг mIL-2/CD25 показала частичную защиту в виде снижения уровня протеинурии и титров анти-дцДНК, комбинация обоих

продемонстрировала эффективность, сравнимую с высокой контрольной дозой преднизолона или mIL-2/CD25, которая превосходила любую терапию по отдельности (фиг. 7А и 7В). Превосходный эффект комбинированного лечения также был продемонстрирован в дальнейшем снижении экспрессии генов интерферона 1 типа в почках, таких как IFIT1, IFIT3, MX1, IRF7, GBP2 и LIGP1, на основе RT-PCR (фиг. 8А-8F, соответственно). Преимущество комбинированного лечения было менее очевидным по гистологическим показателям (фиг. 7С), поскольку высокий уровень снижения гистологических показателей уже был достигнут при монотерапии 0,1 мг/кг mIL-2/CD25 на основе полуколичественных гистологических оценок.

**[0382]** Эффект mIL-2/CD25 на Treg также оценивали в селезенке по завершении этого исследования (после 14 недель лечения). Как и ожидалось, монотерапия преднизолоном (в группах 1 и 10 мг/кг) не влияла на процент Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) или CD25 MFI на Treg. В соответствии с предыдущими исследованиями, монотерапия mIL-2/CD25 увеличивала процент Treg и CD25 MFI на Treg (фиг. 7D и 7E). Важно отметить, что совместное лечение преднизолоном не мешало эффекту mIL-2/CD25 в отношении увеличения процента Treg или CD25 MFI на Treg (фиг. 6D и 6E). Эти данные свидетельствуют о том, что терапия IL-2/CD25 может эффективно сочетаться со стандартной терапией стероидами без потери ее эффективности в отношении увеличения числа Treg и потенциально ингибирования прогрессирования заболевания у пациентов, страдающих SLE.

#### mIL-2/CD25 на модели волчанки MRL/lpr

**[0383]** mIL-2/CD25 также оценивали на другой мышинной модели волчанки, MRL/lpr. В этой модели неконтролируемая аберрантная пролиферация иммунных клеток приводит к спонтанному аутоиммунному волчаночноподобному синдрому. Подкожное введение mIL-2/CD25 в дозах 0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг 2 раза в неделю в течение 12 недель (n = 10 на группу) предотвращало ухудшение протеинурии (фиг. 9А), выработку аутоантител (фиг. 9В) и воспаление и повреждение почек (фиг. 9С). Аналогично данным исследований NZB x NZW, диапазон доз от 0,2 мг/кг до 0,4 мг/кг обеспечивает максимальную эффективность во всех трех вышеуказанных конечных точках. Снова, кровь и селезенку (n = 4 из каждой группы) собирали для проточной цитометрии по завершении исследования (12 недель после первой дозы, 48 часов после последней дозы). Дозу лечения mIL-2/CD25 повышали в зависимости от процентного содержания Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) в гейте CD4<sup>+</sup> как в крови, так и в селезенке. В крови процент Treg был значительно увеличен от 4,0 ± 0,8% (среднее значение ± стандартная ошибка среднего) в группе PBS до 14,3 ± 2,3%, 21,9

$\pm 6,2\%$  и  $28,1 \pm 5,5\%$  в группах доз 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг, соответственно (фиг. 9D). Подобным образом, наблюдали увеличение Treg в селезенке при всех дозах (фиг. 9E). Как показано на фиг. 9F, MFI CD25 в гейте CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> был значительно увеличен от  $1842 \pm 118$  (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего) в группе PBS до  $3301 \pm 470$ ,  $6185 \pm 713$  и  $6863 \pm 680$  в группах лечения 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг mIL-2/CD25, соответственно. В заключение, mIL-2/CD25 ингибирует прогрессирование заболевания у мышей MRL/lpr посредством увеличения количества Treg и экспрессии CD25 на Treg.

### Обсуждение

**[0384]** Лечение активной SLE является сложной задачей из-за гетерогенной природы заболевания (Franklyn, *et al.*, *Nat Rev Rheumatol.* 10: 567-71 (2014), Tsokos, *N Engl J Med.* 365: 2110-21 (2011)). Текущая терапия активной SLE основана в первую очередь на кортикостероидах и иммунодепрессантах для снижения активности заболевания. Однако эти препараты не являются полностью эффективными, и, таким образом, исходы еще более нивелируются значительными побочными эффектами, особенно инфекциями, связанными с лечением (Goldblatt, *et al.*, *Lupus* 18: 682-89 (2009), Kang *et al.*, *Curr Opin Rheumatol.* 15: 528-34 (2003), Bruce, *et al.*, *Lupus* 25: 699-709 (2016)). Treg обеспечивают широкий восходящий контроль над рядом важных типов клеток и путей в патогенезе SLE, что отличает модуляцию Treg от других клинических активнов SLE. В то время как основной мишенью Treg является активность эффекторных Т-клеток, контроль Treg над иммунным ответом выходит за рамки эффекторных Т-клеток, включая способность влиять на NK- и NK-Т-клетки, В-клетки и макрофаги/антиген-представляющие клетки, а также способствовать дальнейшему восстановлению тканей (Abbas, *et al.*, *Sci Immunol.* 3 (2018), Dutcher *et al.*, *J Immunother Cancer.* 2:26 (2014), Li *et al.*, *Front Immunol.* 9: 585 (2018), Tiemessen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19446-51 (2007), Williams *et al.*, *Nature* 441: 890-3 (2007)). Использование терапии низкими дозами IL-2 для стимуляции Т-регуляторной функции для подавления воспаления и аутоиммунитета привлекло внимание благодаря многообещающим предварительным результатам многочисленных клинических испытаний, включая исследования SLE (Castela *et al.*, *JAMA Dermatol.* 150: 748-51 (2014), Saadoun *et al.*, *N Engl J Med.* 365: 2067-77 (2011), Abbas *et al.*, *Sci Immunol.* 3 (2018), von Spee-Mayer *et al.*, *Ann Rheum Dis.* 75: 1407-15 (2016), He *et al.*, *Nat Med.* 22: 991-3 (2016), Churlaud *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 142: 1344-6 (2018), Rosenzwajg *et al.*, *J Autoimmun.* 58: 48-58 (2015), Rosenzwajg *et al.*, *Ann Rheum Dis.* 78: 209-17 (2019)). Предварительный результат применения низких доз IL-2 при 11 аутоиммунных заболеваниях продемонстрировал



потенциал широкого применения этого подхода (Rosenzweig *et al.*, *Ann Rheum Dis.* 78: 209-17 (2019)).

**[0385]** Агонист рецептора IL-2 длительного действия, состоящий из IL-2, слитого с CD25 с нерасщепляемым линкером, продемонстрировал улучшение по сравнению с рекомбинантным IL-2 в отношении времени полужизни в сыворотке и селективности в отношении Treg *in vivo* у мышей (Ward *et al.*, *J Immunol.* 201: 2579-92 (2018)). Слитый белок mIL-2/CD25 обладает уникальным механизмом действия (МОА), существуя преимущественно в виде самоблокирующейся неактивной гомодимерной молекулы в растворе. Медленное высвобождение активного мономера посредством диссоциации и захвата CD25-экспрессирующими Treg приводит к клеточной активации и пролиферации (Ward *et al.*, *J Immunol.* 201: 2579-92 (2018)). Этот МОА позволяет молекуле достигать фармакокинетического (PK) и фармакодинамического (PD) пролонгирования, которое не было достигнуто с другими механизмами доставки агонизма рецептора IL-2, отчасти благодаря способности молекулы избегать опосредованного мишенью клиренса (TMDD), поскольку она циркулирует в неактивной форме димера. Как показано в настоящем документе, mIL-2/CD25 имеет пролонгированную фармакокинетику (T<sub>1/2</sub>: 20,6 ч) и желаемую экспансию Treg/активацию CD25 на Treg как у мышей NZB x NZW, так и у мышей MRL/lpr, двух распространенных моделей волчанки и волчаночного нефрита. Кроме того, анализ Treg на модели NZB x NZW продемонстрировал снижение уровней CD25<sup>+</sup>Treg, аналогично наблюдениям у пациентов с SLE, маркер дефицита IL-2. Результат предполагает, что модель NZB x NZW повторяет элементы дисфункции Treg, наблюдаемые при заболеваниях человека. mIL-2/CD25 устранял очевидный дефицит IL-2 в этой модели, что приводило к увеличению количества Treg и экспрессии CD25.

**[0386]** Индукция и активация Treg, наблюдаемая для mIL-2/CD25, приводит к значительному снижению прогрессирования заболевания, о чем свидетельствуют сниженные уровни протеинурии, титры аутоантител и гистологические оценки почек, даже когда лечение начинают, когда у мышей NZB x NZW проявляются признаки прогрессирующего заболевания. Испытанные согласно настоящему изобретению дозы не активируют не-Treg-клетки или продукцию провоспалительных цитокинов. Важно отметить, что зависимость эффекта от дозы предполагает, что для максимальной эффективности в этой модели требуется значительное и устойчивое увеличение Treg, и предполагает, что для максимальной эффективности при заболевании человека потребуется надежное и устойчивое, но селективное увеличение Treg.

**[0387]** Кортикостероиды по-прежнему являются основным способом лечения волчанки, особенно при обострениях. Известно, что кортикостероиды ингибируют ответы

Т-клеток, однако, Treg могут быть менее восприимчивы к лечению стероидами, чем эффекторные Т-клетки (Prenek, *et al.*, *Apoptosis* 25: 715-29 (2020)). Согласно настоящему изобретению продемонстрировано, что лечение mIL-2/CD25 может повышать уровень Treg и улучшать течение заболевания даже в сочетании с низкими дозами стероидов. Комбинированное лечение приводит к улучшению большинства показателей эффективности по сравнению с любой монотерапией. Эти результаты свидетельствуют о потенциальной клинической пользе сочетания пролонгированного и селективного агонизма Treg IL-2R, такого как обеспечивается лечением mIL2/CD25, со стандартами лечения SLE для повышения эффективности.

**[0388]** На сегодняшний день разработанный слитый белок человеческий IL-2/CD25 демонстрирует пролонгированную и селективную активацию Treg у яванских макаков при определенных дозах (неопубликованные результаты). Человеческий IL-2/CD25 будет протестирован в клинических испытаниях для оценки PK, PD (Treg), безопасности и переносимости. Гипотеза селективного воздействия на пациентов, страдающих SLE, с дефицитом IL-2 в популяции Treg будет изучена в ходе клинических исследований. Потенциал этого механизма для обеспечения клинической эффективности, а также экономии стероидов и долгосрочной ремиссии еще предстоит увидеть в будущих исследованиях.

#### Материалы и способы

##### *Реагенты:*

**[0389]** mIL-2/CD25 представляет собой слитый белок, объединяющий мышинный IL-2 с альфа-субъединицей мышинового IL-2 рецептора (CD25) с линкером, состоящим из 12 аминокислот, между С-концом IL-2 и N-концом внеклеточной области CD25. Слитый белок mIL-2/CD25 образует нековалентный самоблокирующийся димер. Биохимические оценки подтверждают, что димер не связывается с рецептором и, следовательно, защищен от опосредованного мишенью распределения лекарственного средства. Медленная диссоциация дает низкую дозу активного мономера, что приводит к активации IL-2R (Ward *et al.*, *J Immunol.* 201: 2579-92 (2018)). Преднизолон (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) представляет собой противовоспалительное стероидное лекарственное средство, используемое в качестве контрольного соединения.

**[0390]** Панель антител для проточной цитометрии в исследованиях на мышах включает: CD4-V500 (клон RM4-5), pSTAT5-AF488 (клон 47/Stat5 pY694) от BD Biosciences, CD8-PerCP-Cy5.5 (клон 53-6.7), CD25-PE (клон PC61.5), Foxp3-ef450 (клон

FJK-16s) от ThermoFisher Scientific и CD335-BV605 (клон 29A1.4), Ki67-APC (клон 16A8) от Biolegend.

*Мыши:*

**[0391]** Самки мышей NZB x NZW F1, самки BALB/c и самцы мышей MRL/lpr были получены из лабораторий Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Все процедуры проводили в соответствии с протоколами, одобренными Комитетом по уходу и использованию животных BMS.

*Контроль протеинурии:*

**[0392]** Перед рандомизацией в группы лечения мышей оценивали на предмет протеинурии с использованием Albustix (Siemens, Munich, Germany), вызывая у мышей мочеиспускание на полоски Albustix. Мышей с показаниями уровня протеинурии, соответствующими следу 30 мг/дл, были включали в исследования для оценки эффективности на ранних стадиях заболевания. Типичный возраст мышей, включенных в исследования на ранних стадиях заболевания, составлял 21-23 недели для мышей NZB x NZW и 12-14 недель для мышей MRL/lpr. Мыши NZB x NZW с уровнем протеинурии более 100 мг/дл (возраст около 27 недель) были включены в исследование для оценки эффективности при поздних стадиях заболевания. Мышей продолжали контролировать на наличие протеинурии каждые 2-3 недели в течение всего периода исследования. Протеинурию оценивали в соответствии с инструкциями производителя следующим образом: След: 0.5,  $\geq 30$  мг/дл: 1,  $\geq 100$  мг/дл: 2,  $\geq 300$  мг/дл: 3,  $\geq 2000$  мг/дл: 4.

*Введение дозы мышам*

**[0393]** Мышам вводили путем инъекции mIL-2/CD25 подкожно (s.c.) два раза в неделю с объемом дозы 200 мкл на инъекцию в носители PBS. Мышам, получавшим преднизолон, вводили дозу 10 мг/кг три раза в неделю перорально (p.o.) с объемом дозирования 10 мл/кг, растворенным в воде.

*Титры антител в сыворотке*

**[0394]** Мышей анестезировали изофлураном и пускали кровь каждые 2-3 недели в ходе исследования. По завершении исследования сыворотку проверяли на наличие анти-дцДНК аутоантител с помощью ELISA. Объединенную сыворотку мышей MRL/lpr с прогрессирующей волчанкой использовали в качестве положительного сравнения в каждом анализе. Уровни аутоантител количественно определяли в условных единицах на основе

кривой, полученной с использованием положительной контрольной сыворотки. Уровни сывороточного белка IL-12p40 измеряли в сыворотке, взятой в конце 10-недельного периода дозирования mIL-2/CD25, с использованием набора IL-12p40 ELISA от BD Biosciences в соответствии с инструкциями производителя.

### *Гистология*

**[0395]** По окончании исследования одну почку от каждого животного вырезали, фиксировали погружением в 10% NBF на 72 часа, а после полной фиксации поперечно обрезали, обрабатывали обычным парафином (RPPE) и делали срезы 4 мкм для окрашивания H&E и 3 мкм для окрашивания PASH. Предметные стекла были оценены обученным гистопатологом простым слепым методом для микроскопического анализа нефрита. Гломерулярный нефрит (GN) и тубулоинтерстициальный нефрит (TIN) оценивали по полуколичественной шкале от 0 до 4 с индивидуальной оценкой соответствующих патологий. GN оценивали по изменениям мезангиума, образованию клеточных цилиндров, моноклеарной клеточной инфильтрации клубочков и фиброзу капсулы Боумана. TIN оценивали по изменениям канальцево-люминального инфильтрата, регенерации эпителиальных клеток канальцев, белковым цилиндрам, интерстициальному фиброзу и инфильтрации моноклеарными клетками. Теоретическая максимальная общая оценка нефрита составила 36.

### *Получение и окрашивание крови и селезенки*

**[0396]** Образцы крови собирали в пробирки с гепарином, а затем немедленно лизировали и фиксировали лизирующим раствором 1X BD FACS в течение 10 минут при 37°C. Клетки один раз промывали PBS, затем второй раз PBS, содержащим 2% FBS, с последующей пермеабиллизацией с использованием ледяного метанола в течение 30 минут при 4°C. Затем образцы дважды промывали для удаления избытка метанола для окрашивания.

**[0397]** Образцы селезенки, собранные в PBS, измельчали с использованием GentMACS™ для приготовления суспензии отдельных клеток, затем фильтровали через фильтр 70 мкм. Используя буфер для лизиса ACK, эритроциты лизировали, и клеточную суспензию еще раз фильтровали через фильтр 40 мкм. Клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 2% FBS, и  $1 \times 10^6$  клеток сразу фиксировали с использованием 1,5% параформальдегида в течение 10 минут при 37°C. Клетки промывали PBS, содержащим 2% FBS, с последующей пермеабиллизацией с использованием ледяного метанола в течение 30

минут при 4°C. Затем образцы дважды промывали для удаления избытка метанола перед окрашиванием.

**[0398]** Подготовленные образцы крови или селезенки блокировали моноклональным антителом CD16/CD32 (BD Biosciences) с последующим одновременным окрашиванием клеточными поверхностными (CD4/CD8/CD25/CD335) и внутриклеточными (Foxp3/Ki67/pSTAT5) маркерами в течение 45 минут при 4°C. Образцы исследовали с использованием проточного цитометра BD Canto X, а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar).

#### *ОТ-ПЦР почек*

**[0399]** По завершении исследования одну почку от каждой мыши собирали в RNA Later, а затем гомогенизировали в лизирующем буфере для улавливания мРНК с помощью Tissue Lyser. мРНК очищали с помощью mRNA Catcher PLUS в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen). кДНК синтезировали с использованием SuperScript II со случайными гексамерными праймерами. ПЦР проводили с использованием SYBR Green Master Mix (Invitrogen). Относительный количественный анализ определяли с использованием метода 2-ΔΔCT с использованием циклофилина (PPIA) в качестве гена домашнего хозяйства. Анализировали экспрессию воспалительных цитокинов и лейкоцитарных поверхностных рецепторов. Пары праймеров:

Ifit1: 5'-AGAGCAGAGAGTCAAGGCAGGT-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-TGGTCACCATCAGCATTCTCTCCCA-3' (SEQ ID NO: 36)

Ifit3: 5'-GCTCAGCCACACCCAGCTTT-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-AGATTCCCGGTTGACCTCACTCAT-3' (SEQ ID NO: 38)

Mx1: 5'-ACTACCAGGAGTGCAGACGGAA-3' (SEQ ID NO: 39), 5'-TCCTCCAGGAACCAGCTGCACTTA-3' (SEQ ID NO: 40)

If7: 5'-GAGTCTGGGGCAGACCCCGT-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-CTGCGCTCGGTGAGAGCTGG-3' (SEQ ID NO: 42)

Gbp2: 5'-AGCTGCTAAACTTCGGGAACAGGA-3' (SEQ ID NO: 43), 5'-AGAGGTTTGGGCCTTGGGCCT-3' (SEQ ID NO: 44)

Ligp1: 5'-GGACACAGGAGTTTCTGTGCCTTT-3' (SEQ ID NO: 45), 5'-AGGTGAAGAGAACAGCTGACCCA-3' (SEQ ID NO: 46)

#### *Фармакокинетика*

**[0400]** Уровни mIL-2/CD25 в сыворотке определяли у мышей NZB x NZW F1 после введения первой дозы (0,1, 0,2 или 0,4 мг/кг подкожно). Образцы крови (0,1 мл)

получали путем подбродочного кровотоечения через 24, 48 и 80 часов после введения дозы с использованием сложного образца (4 мыши на момент времени). Образцам крови давали возможность коагулировать и центрифугировали при 4°C (1500-2000xg) с получением сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -80°C до проведения анализа с помощью анализа связывания лиганда на платформе хемилюминесценции. Фармакокинетические параметры (AUC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> и период полужизни) mIL-2/CD25 получали путем некомпартментного анализа данных о концентрации в сыворотке в зависимости от времени (Phoenix WinNonlin, Version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ).

*Анализ связывания лиганда для количественного определения mIL-2/CD25 в сыворотке*

**[0401]** Образцы, стандарты и контроли качества доводили до конечной концентрации матрицы, равной 33% мышинной сыворотки в PBS с 1% BSA. Кратко, 96-луночные черные планшеты покрывали крысиным антимышиным CD25 (eBioscience - клон: PC61.5) при 1,0 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали на 1 час с помощью PBS/Tween/20% казеина перед инкубацией с сывороткой в течение 2 часов при комнатной температуре. mIL-2/CD25 определяли последовательной инкубацией с биотинилированным крысиным антимышиным IL-2 (eBioscience - клон: JES6-SH4), NeutrAvidin - пероксидазой хрена (Thermo Scientific) и раствором субстрата Pico Chemiluminescent (Thermo Scientific). Планшеты считывали в считывателе планшетов SpectraMax в режиме люминесценции. Концентрацию mIL-2/CD25 в сыворотке мышей рассчитывали по интенсивности люминесценции с использованием линейной калибровочной кривой (Softmax Analysis Program, Molecular Devices), полученной с помощью калибраторов mIL-2/CD25. Анализ LLOQ показал 25 пг/мл.

**[0402]** Следует понимать, что раздел «Подробное раскрытие», а не разделы «Краткое раскрытие» и «Реферат», предназначен для использования для толкования формулы изобретения. В разделах «Краткое раскрытие» и «Реферат» могут быть изложены один или несколько, но не все иллюстративные аспекты или варианты осуществления настоящего изобретения, предусмотренные автором (авторами), и, таким образом, они никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения.

**[0403]** Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных стандартных блоков, иллюстрирующих реализацию определенных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных стандартных блоков были определены в настоящем документе произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут

быть определены при условии, что заданные функции и их отношения выполняются надлежащим образом.

**[0404]** Вышеизложенное описание конкретных аспектов или вариантов осуществления настолько полно раскрывает общую сущность настоящего изобретения, что другие могут, применяя знания в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные аспекты или варианты осуществления без чрезмерных усилий экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов или вариантов осуществления, основываясь на принципах и рекомендациях, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что фразеология или терминология в настоящем документе предназначены для описания, а не для ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете указаний и руководств.

**[0405]** Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных аспектов или вариантов осуществления, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

**[0406]** Пункты приложенной формулы изобретения отличаются от пунктов формулы первичной заявки или других связанных заявок. Таким образом, заявитель отменяет любой отказ от объема притязаний, сделанный в первичной заявке или любой предшествующей заявке в отношении настоящей заявки. Поэтому рекомендуется пересмотреть любой такой предыдущий отказ от притязаний и процитированные ссылки, на основе которых он был сделан. Кроме того, необходимо отметить, что любое заявление об отказе от притязаний, сделанное в настоящей заявке, не должно относиться к первичной заявке или против нее.

**Таблица перечня последовательностей**

SEQ ID NO	Последовательность
1	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG EMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ

2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT
3	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG EMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
4	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG E
5	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
6	GGGSGGGSGGGS
7	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
8	APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMT FKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLK GSDNTFEC QFDDESATVVDLRRWIAFCQSIISTSPQ
9	MYSMQLASCVTTLTVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDL QELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKS FQLEDAENFISNIRVTVVKLK GSDNTFECQFDDESATVVDLRRWIAFCQSIISTSPQ
10	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG EMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAV AGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSRTI
11	MDSYLLMWGLLTFIMVPGCAELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAES VCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQ TEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSRTI



12	ELCLYDPPEVPNATFKALSUKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHED SKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHH RFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYKVAVASCLFL LISILLLSGLTWQHRWRKSRRTI
13	MEPRLMLGFLSLTIVPSCRAELCLYDPPEVPNATFKALSUKNGTILNCECKRGFRR LKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQS MHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMK CGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTA MTETFVLTMEYKVAVASCLFLLISILLLSGLTWQHRWRKSRRTI
14	ELCLYDPPEVPNATFKALSUKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQC TSNILRASHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWK HEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDER EHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
15	GGGS
16	GGGGS
17	GGGSGGGSGGGSGGGGS
18	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
19	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
20	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
21	GGGGSGGGSGGGGS
22	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
23	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
24	GGGGSGGGGS
25	GGGGS
26	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
27	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
28	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
29	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ

30	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
31	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCP PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTS SATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
32	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCP PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTS SATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFP GEEKPQASPEGRPESETSP
33	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
34	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
35	AGAGCAGAGAGTCAAGGCAGGT
36	TGGTCACCATCAGCATTCTCTCCA
37	GCTCAGCCCACACCCAGCTTT
38	AGATTCCCGGTTGACCTCACTCAT
39	ACTACCAGGAGTGCAGACGGAA
40	TCCTCCAGGAACCAGCTGACTTA
41	GAGTCTGGGGCAGACCCCGT

42	CTGCGCTCGGTGAGAGCTGG
43	AGCTGCTAAACTTCGGGAACAGGA
44	AGAGGTTTGGGCCTTGGGCCT
45	GGACACAGGAGTTTCTGTGCCTTT
46	AGGTGAAGAGAACAGCTGACCCA

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту дозы слитого белка интерлейкина-2 (IL2), где слитый белок содержит:

(a) первый полипептид, содержащий полипептид IL2, и

(b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора альфа интерлейкина-2 (IL2R $\alpha$ ),

где (i) внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1), и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2),

где доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 9 мг.

2. Способ по п. 1, где слитый белок вводят субъекту местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, подоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, интракапсулярным, внутриорбитальным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или внутригрудинным путем.

3. Способ по п. 1, где слитый белок вводят субъекту внутривенным путем.

4. Способ по п. 3, где доза составляет от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 9 мг.

5. Способ по п. 3, где доза составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 9 мг.

6. Способ по п. 5, где доза составляет от приблизительно 6 мг до приблизительно 9 мг.

7. Способ по п. 3, где доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 3 мг.

8. Способ по п. 7, где доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 1 мг.

9. Способ по п. 8, где доза составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,3 мг.

10. Способ по п. 3, где доза составляет от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 6 мг.

11. Способ по п. 10, где доза составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.
12. Способ по п. 3, где доза составляет более приблизительно 9 мг.
13. Способ по п. 1, где слитый белок вводят субъекту подкожным путем.
14. Способ по п. 13, где доза составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 8 мг.
15. Способ по п. 14, где доза составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 8 мг.
16. Способ по п. 15, где доза составляет от приблизительно 6 мг до приблизительно 8 мг.
17. Способ по п. 14, где доза составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 6 мг.
18. Способ по п. 17, где доза составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.
19. Способ по п. 14, где доза составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 6 мг.
20. Способ по п. 13, где доза составляет приблизительно 1 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 6 мг или приблизительно 8 мг.
21. Способ по п. 13, где доза составляет более приблизительно 8 мг.
22. Способ по любому из пп. 1-21, где две или более дозы вводят с интервалом между введениями двух доз.
23. Способ по п. 22, где интервал между введениями составляет по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно два дня, по меньшей мере приблизительно три дня, по меньшей мере приблизительно четыре дня, по меньшей мере приблизительно пять дней, по меньшей мере приблизительно шесть дней, по меньшей мере приблизительно одну неделю, по меньшей мере приблизительно две недели, по меньшей мере приблизительно три недели, по меньшей мере приблизительно четыре недели, по меньшей мере приблизительно месяц, по меньшей мере приблизительно пять недель, по меньшей мере приблизительно шесть недель, по меньшей мере приблизительно семь недель, по меньшей мере приблизительно восемь недель, по меньшей мере приблизительно два месяца, по меньшей мере приблизительно девять недель, по меньшей мере приблизительно десять недель, по меньшей мере приблизительно одиннадцать недель, по меньшей мере приблизительно двенадцать недель или по меньшей мере приблизительно три месяца.

24. Способ по п. 23, где интервал между введениями составляет по меньшей мере приблизительно три недели.

25. Способ по п. 22, где интервал между введениями составляет приблизительно три недели.

26. Способ по любому из пп. 22-25, где интервал между введениями является одинаковым для доз.

27. Способ по любому из пп. 22-25, где интервал между введениями является различным для доз.

28. Способ по любому из пп. 22-25, где по меньшей мере одну из двух или более доз вводят внутривенно, и по меньшей мере одну из двух или более доз вводят подкожно.

29. Способ по любому из пп. 28, где дозу, вводимую внутривенно, вводят до дозы, вводимой подкожно.

30. Способ по любому из пп. 22-29, где первую дозу вводят внутривенно, а последнюю дозу вводят подкожно.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание или иммуноопосредованное заболевание.

32. Способ по п. 31, где иммуноопосредованное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание.

33. Способ по п. 31, где иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, аутоиммунной глютеновой болезни, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, кожной красной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, системного склероза, реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD), псориаза, круговой алопеции, васкулита, вызванного вирусом гепатита С, синдрома Шегрена, вульгарной пузырчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаясу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена, воспалительной болезни кишечника, иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии, X-связанного (IPEX) синдрома и синдрома активации макрофагов.

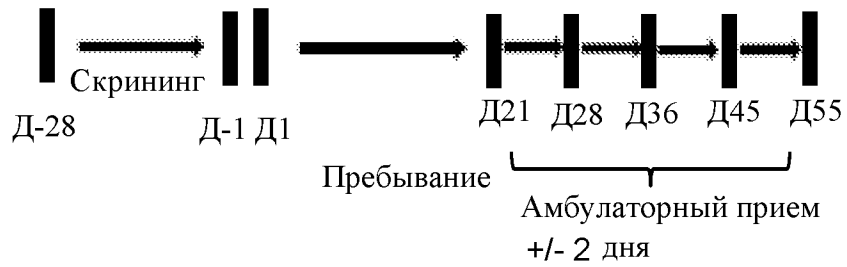
34. Способ по п. 33, где иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка, волчаночный нефрит или кожная красная волчанка.

35. Способ по п. 34, где иммуноопосредованным заболеванием является системная красная волчанка.

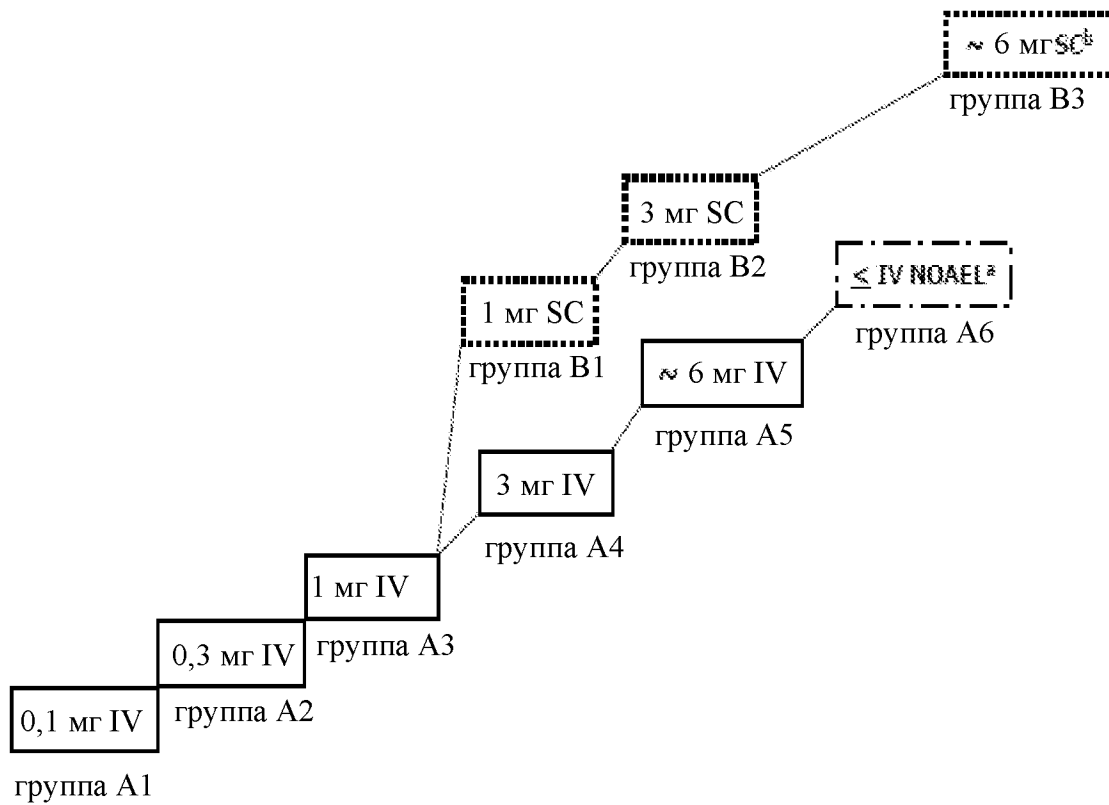
36. Способ по любому из пп. 31-35, дополнительно предусматривающий введение субъекту кортикостероида.

37. Способ по п. 36, где кортикостероид представляет собой преднизолон.
38. Способ по п. 36 или 37, где кортикостероид вводят субъекту местным, пероральным, внутривенным или внутримышечным путем.
39. Способ по любому из пп. 36-38, где кортикостероид вводят до, одновременно с или после каждой дозы слитого белка.
40. Способ по любому из пп. 36-39, где две или более доз кортикостероида вводят субъекту с интервалом между введениями каждой дозы.
41. Способ по любому из пп. 1-40, где внеклеточный домен полипептида IL2R $\alpha$  имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше, по меньшей мере на два гликозилирования меньше, по меньшей мере на три гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять гликозилирований меньше, по меньшей мере на шесть гликозилирований меньше, по меньшей мере на семь гликозилирований меньше, по меньшей мере на восемь гликозилирований меньше или по меньшей мере на девять гликозилирований меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL2R $\alpha$  (SEQ ID NO: 1).
42. Способ по любому из пп. 1-41, где полипептид IL2 имеет по меньшей мере на одно гликозилирование меньше по сравнению с нативным IL2 (SEQ ID NO: 2).
43. Способ по любому из пп. 1-42, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 2.
44. Способ по любому из пп. 1-43, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 3.
45. Способ по любому из пп. 1-44, где второй полипептид представляет собой SEQ ID NO: 4.
46. Способ по любому из пп. 1-44, где второй полипептид представляет собой SEQ ID NO: 3.

Фиг. 1А

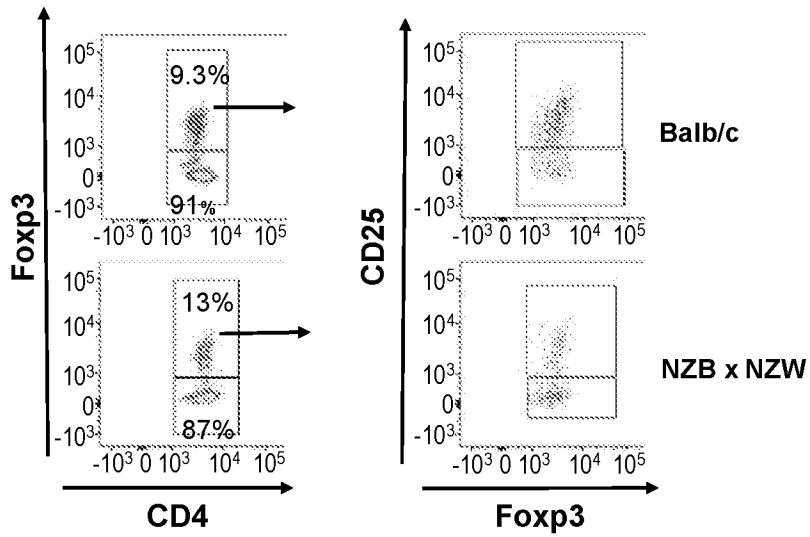


Фиг. 1В

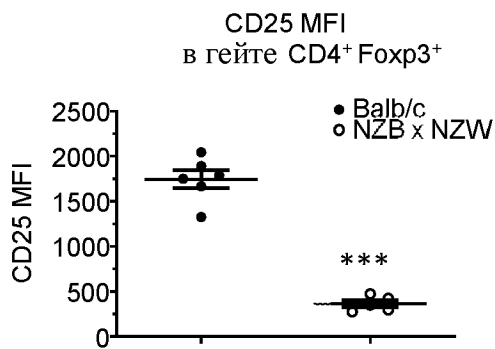




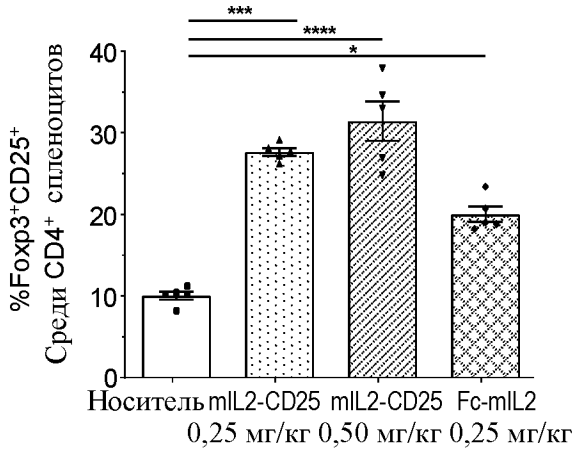
Фиг. 2А



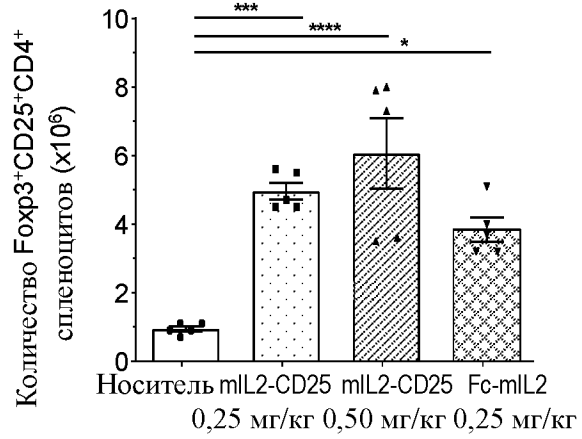
Фиг. 2В



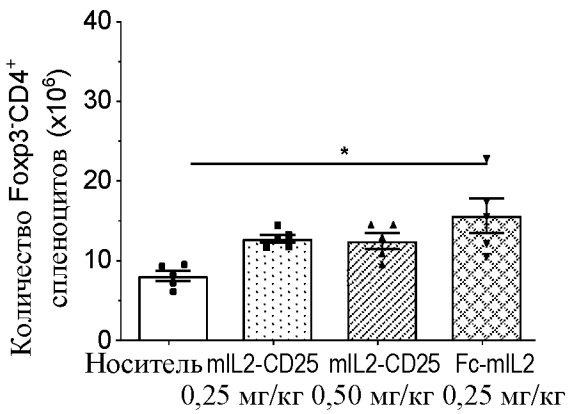
Фиг. 3А



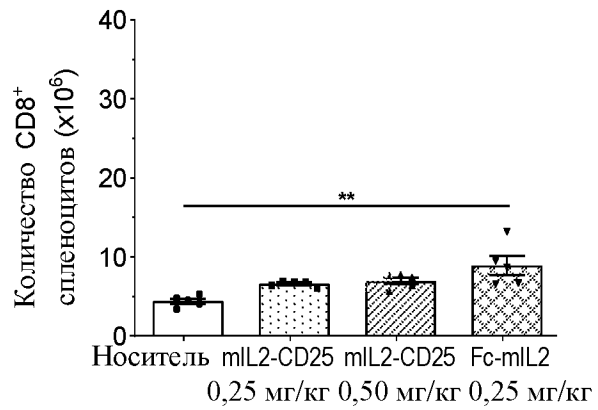
Фиг. 3В



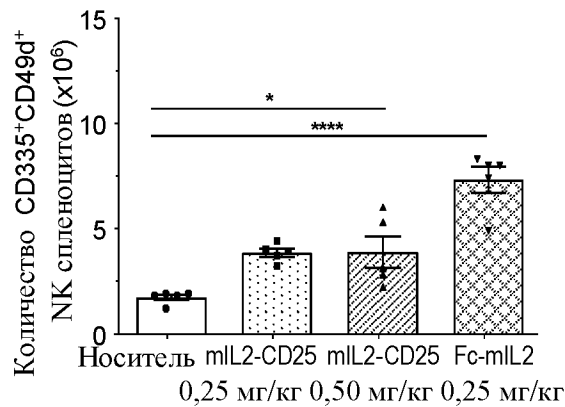
Фиг. 3С



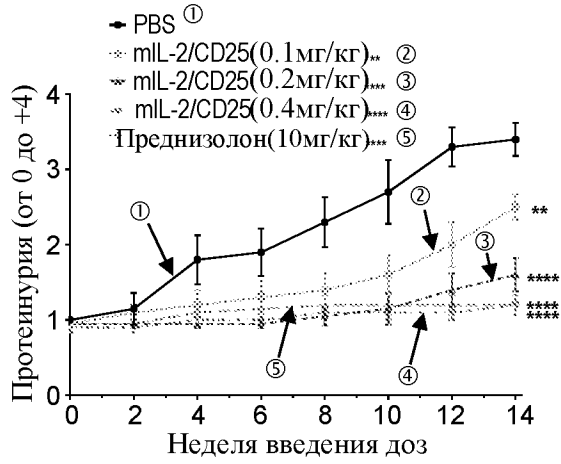
Фиг. 3Д



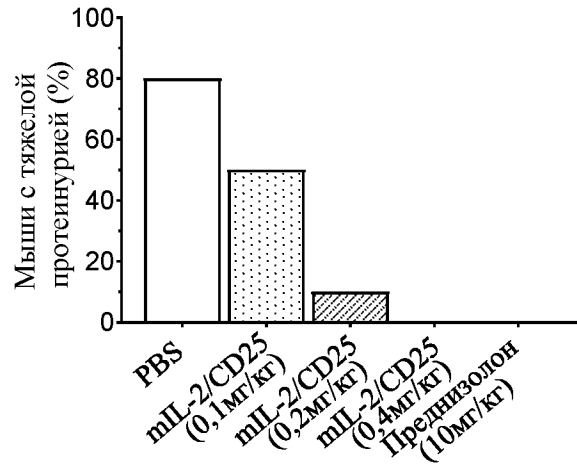
Фиг. 3Е



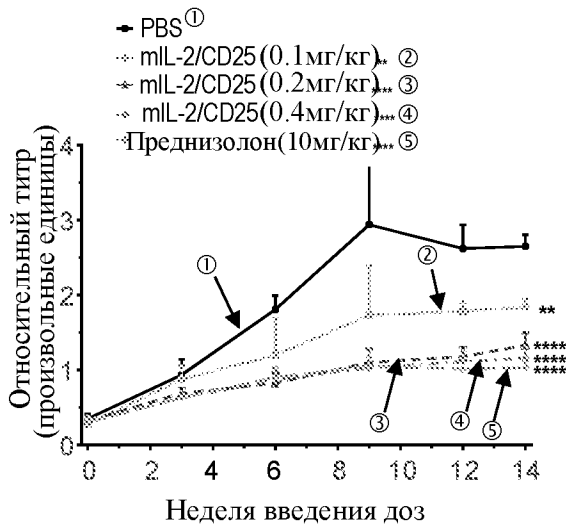
Фиг. 4А



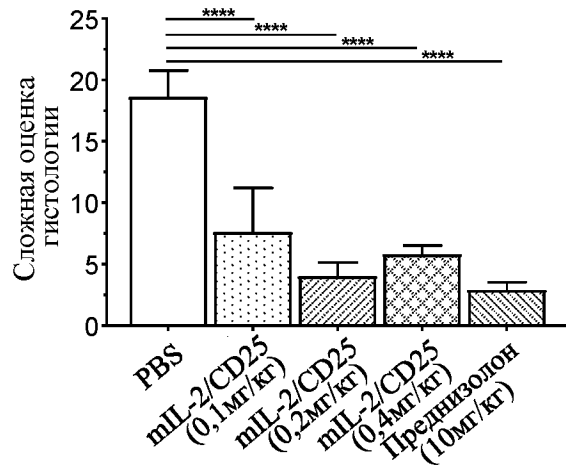
Фиг. 4В



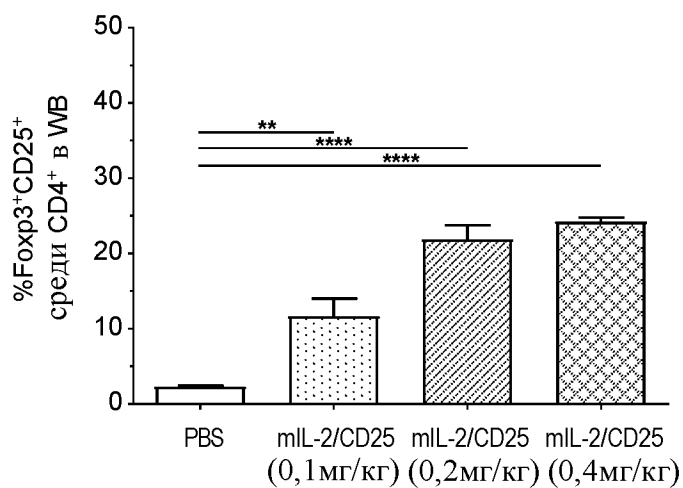
Фиг. 4С



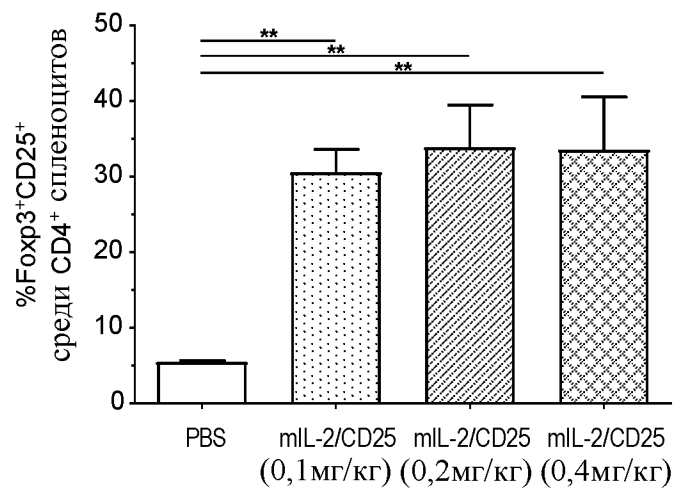
Фиг. 4D



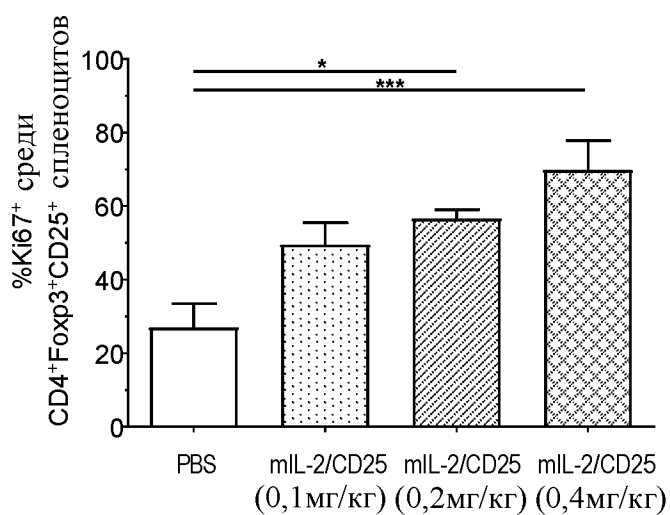
Фиг. 5А



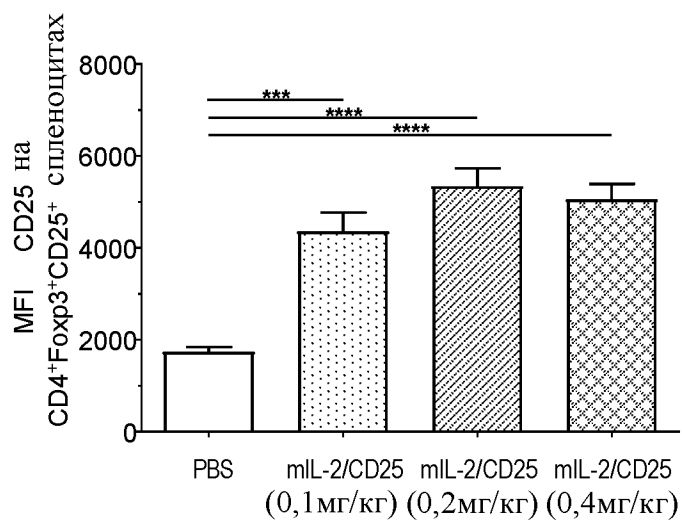
Фиг. 5В



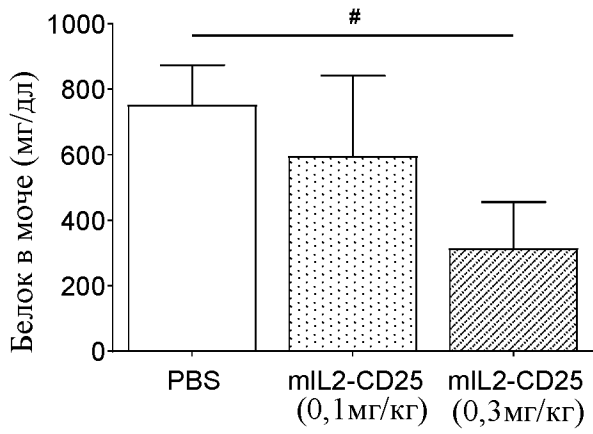
Фиг. 5С



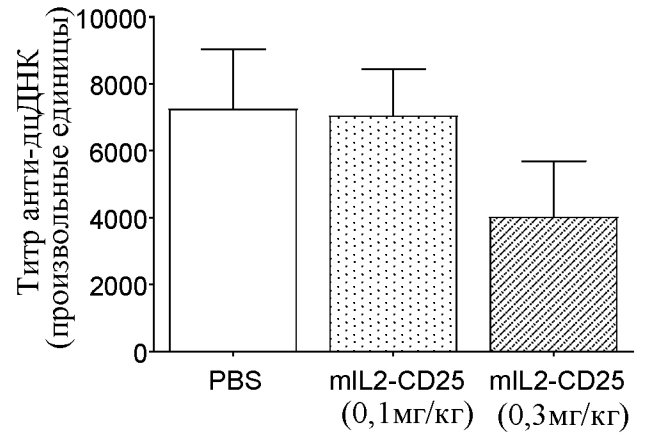
Фиг. 5D



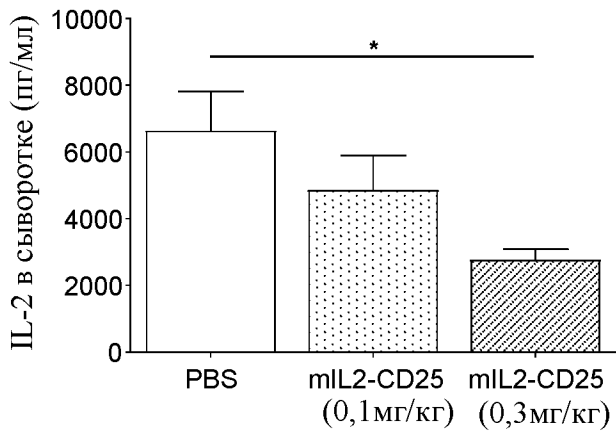
Фиг. 6А



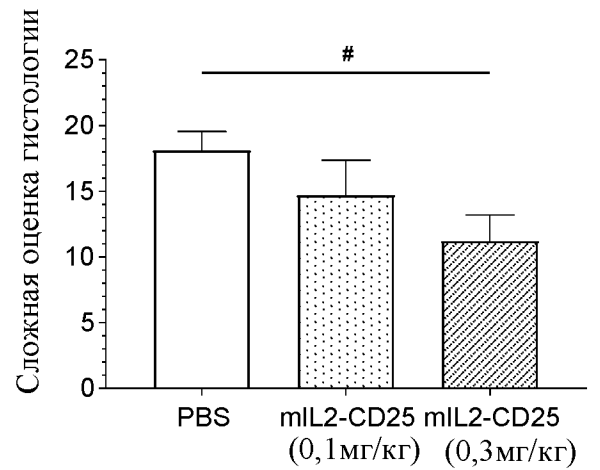
Фиг. 6В



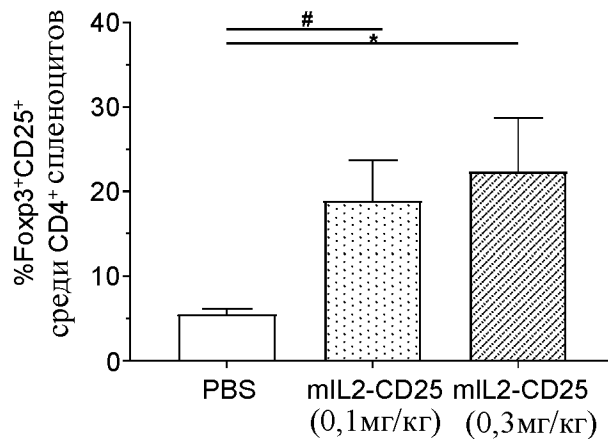
Фиг. 6С



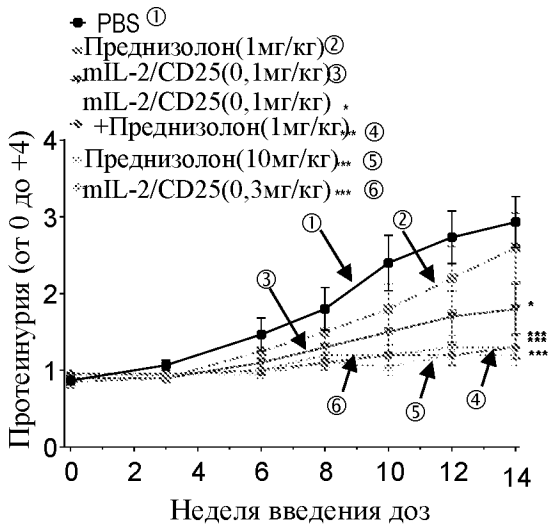
Фиг. 6D



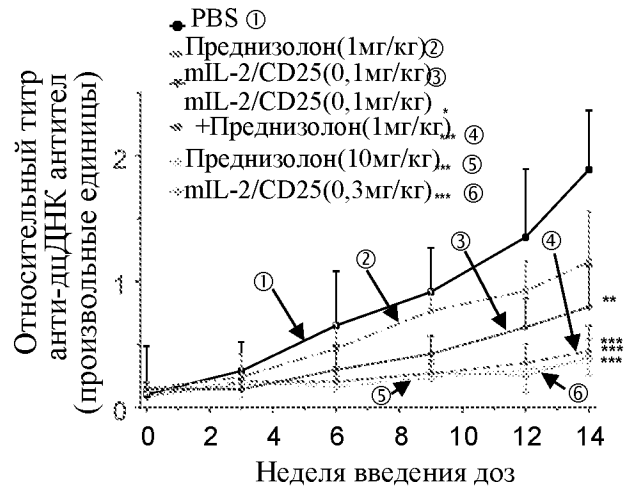
Фиг. 6Е



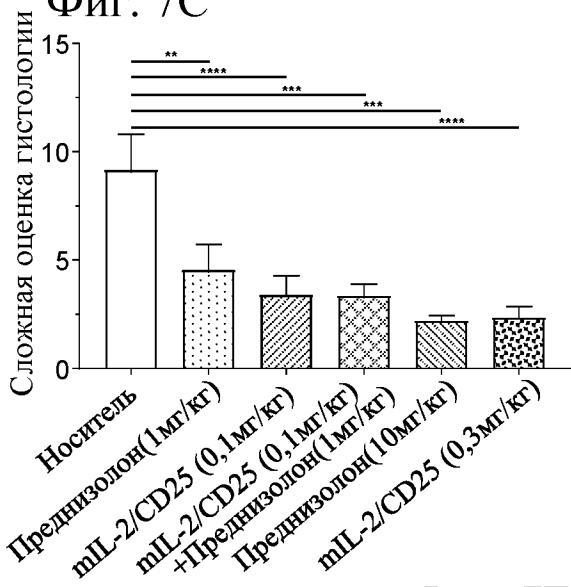
Фиг. 7А



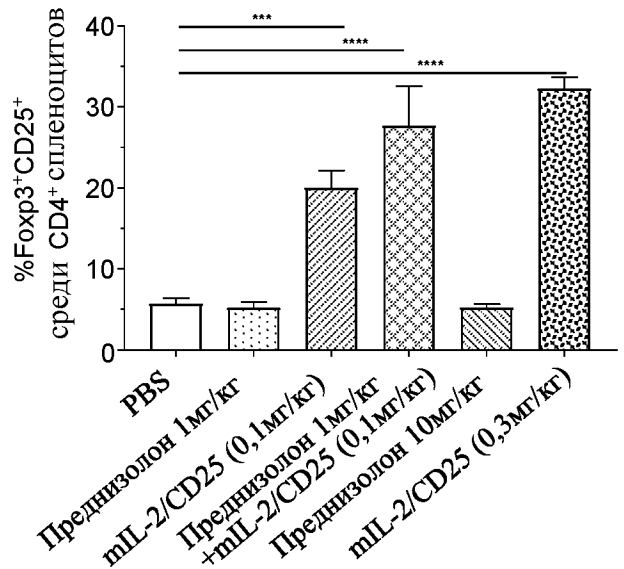
Фиг. 7В



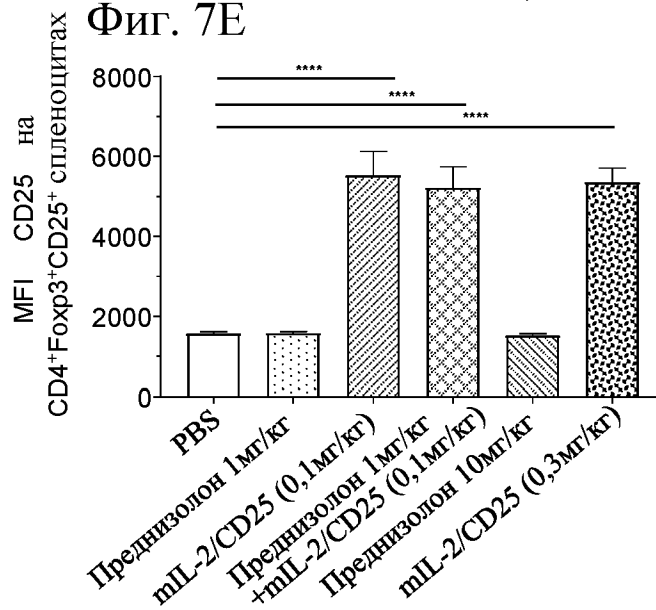
Фиг. 7С



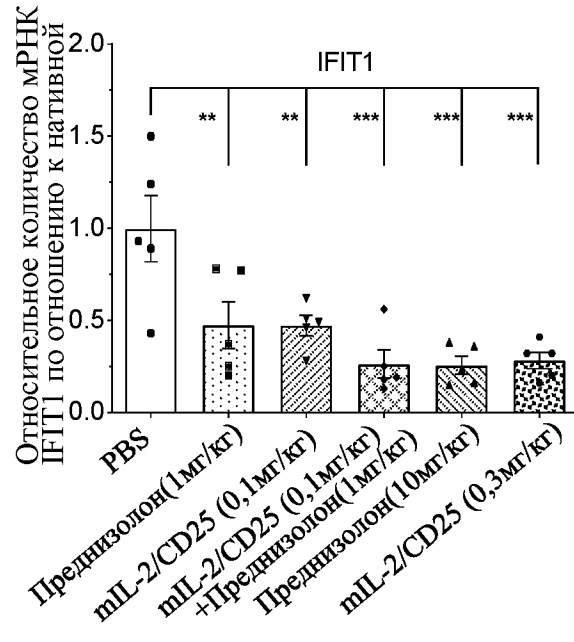
Фиг. 7D



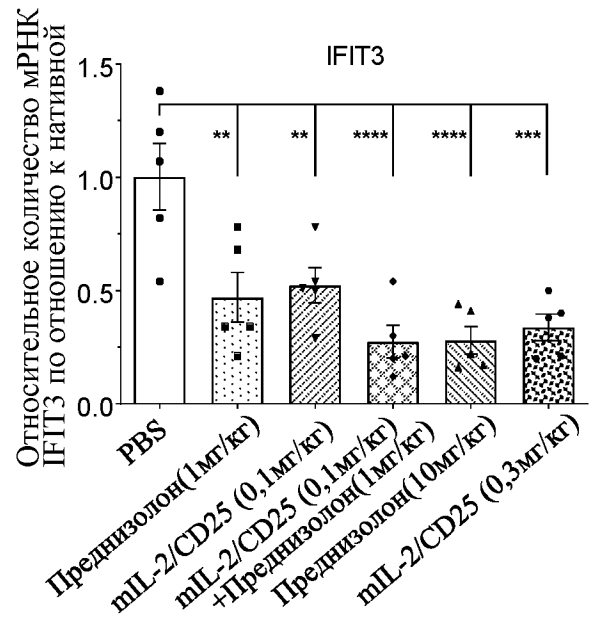
Фиг. 7Е



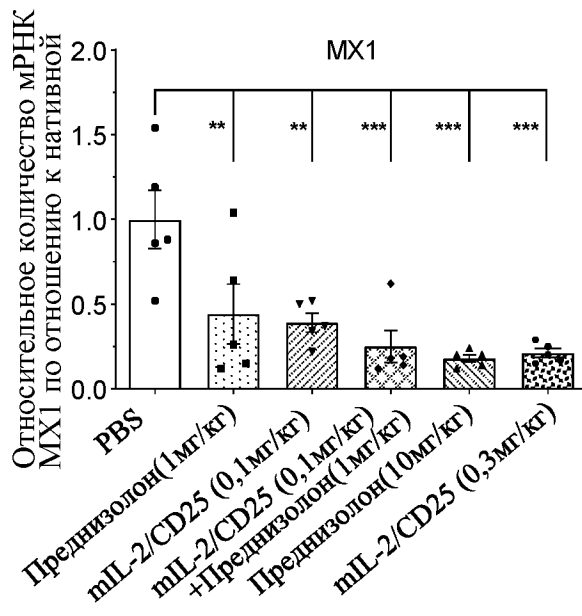
Фиг. 8А



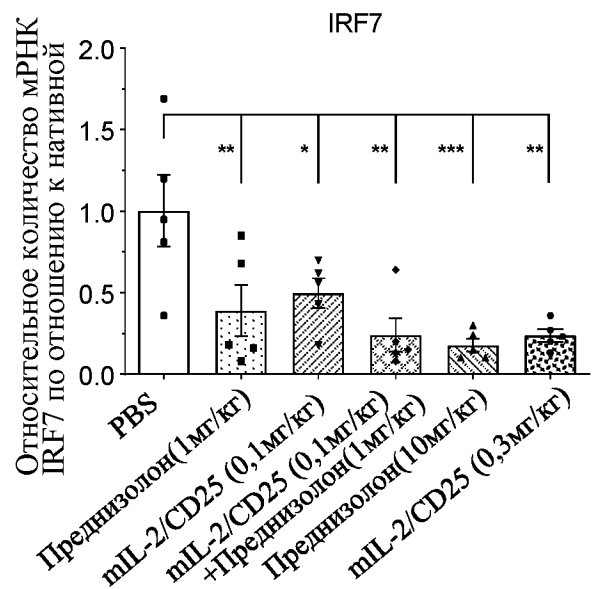
Фиг. 8В



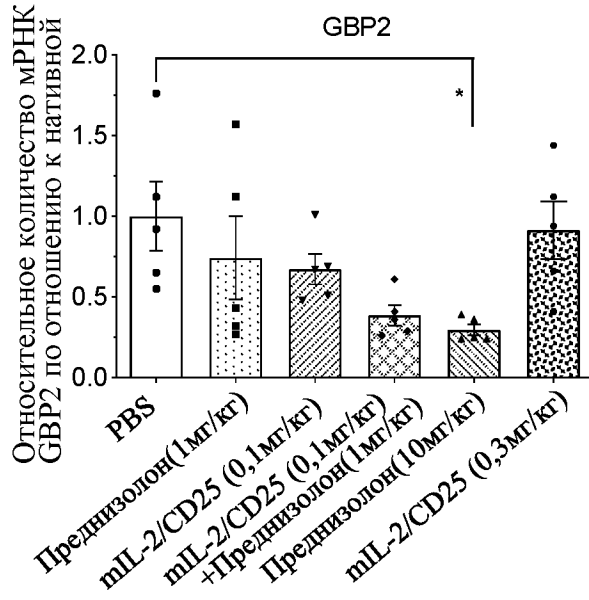
Фиг. 8С



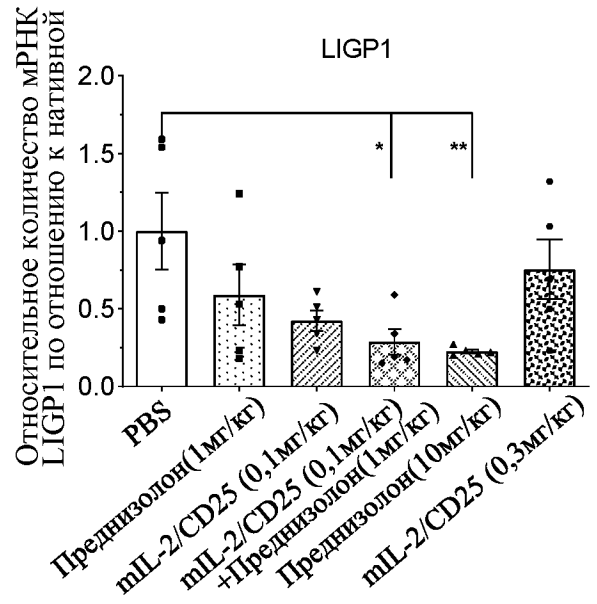
Фиг. 8D



Фиг. 8Е

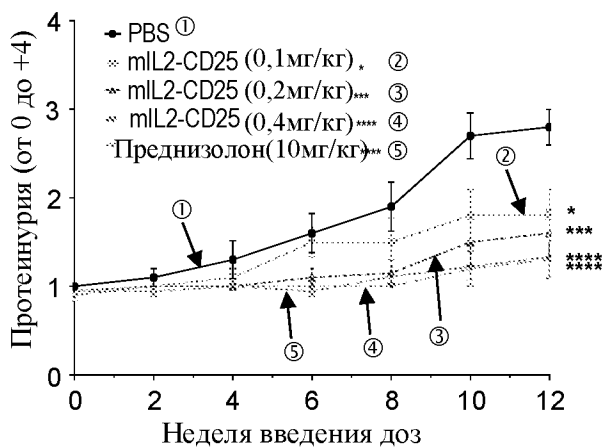


Фиг. 8F

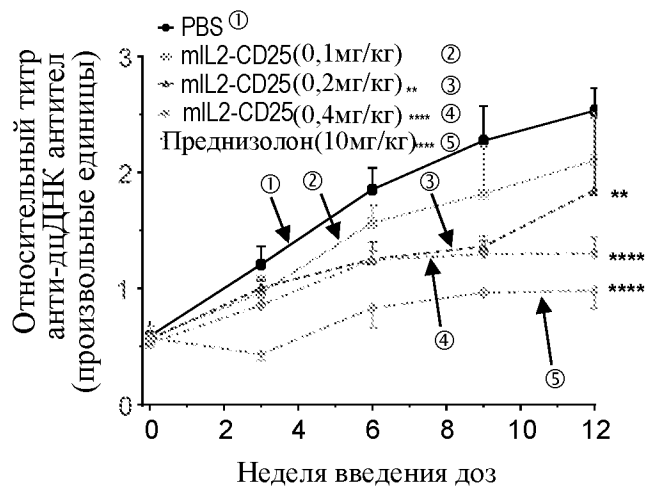




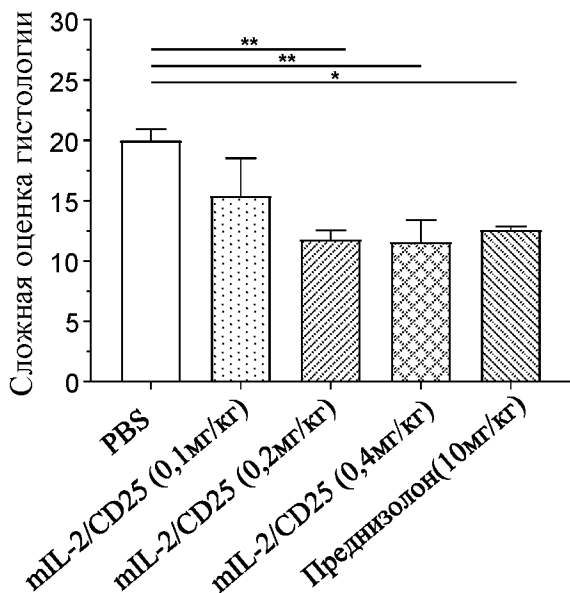
Фиг. 9А



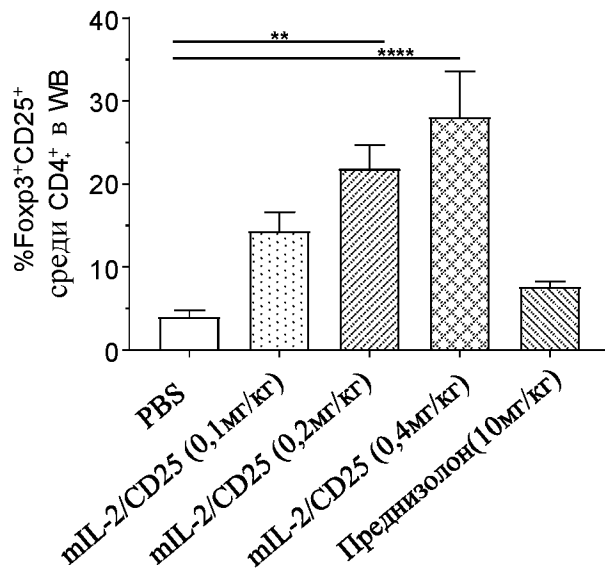
Фиг. 9В



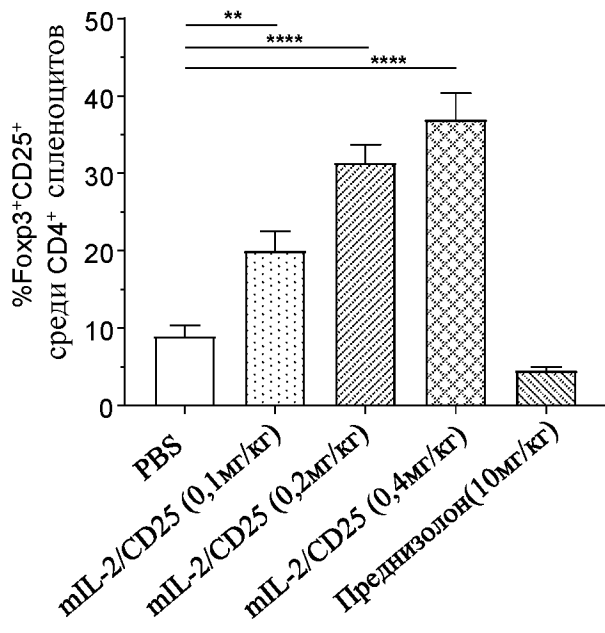
Фиг. 9С



Фиг. 9D



Фиг. 9Е



Фиг. 9F

