

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490476 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.13

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.08.25

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СЛИТЫЙ БЕЛОК

(31) 202110985497.7

(32) 2021.08.25

(33) CN

(86) PCT/CN2022/114858

(87) WO 2023/025249 2023.03.02

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ШЭНДИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:

Ма Сячжэнь, Тянь Чэньминь, Ли
Сяофэй (CN)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей слитый белок. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей слитый белок, содержащий ковалентно связанные IL-2 и антитело против IL-2, и к ее применению.

A1

202490476

202490476

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СЛИТЫЙ БЕЛОК

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее раскрытие относится к области фармацевтических препаратов. В частности, настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей слитый белок, содержащий IL-2 (интерлейкин-2) и антитело против IL-2, которые ковалентно связаны, и к его применению в качестве лекарственного средства.

10

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Приводящиеся в данном документе сведения просто предоставляют информацию предшествующего уровня техники, относящуюся к настоящему раскрытию, и не обязательно могут составлять предшествующий уровень техники.

15

Человеческий интерлейкин-2 (IL-2), также известный как фактор роста Т-клеток (TCGF), имеет ген, локализованный на хромосоме 4 (4q27), содержит последовательность всего из 7 т.п.н. и состоит из 133 аминокислот с молекулярной массой примерно 15 кДа. В 1976 и 1977 гг. Doris Morgan, Francis Ruscetti, Robert Gallo и Steven Gillis, Kendal Smith, et al., по отдельности обнаружили то, что культуральная среда активированных Т-клеток могла стимулировать пролиферацию Т-клеток. Затем стимулирующий фактор в данной культуральной среде очистили и идентифицировали в виде одиночного белка, т.е. IL-2.

20

IL-2 действует через IL-2R (рецептор IL-2) на поверхности клетки. IL-2R включает три субъединицы: IL-2R α (т.е. CD25), IL-2R β (т.е. CD122) и IL-2R γ (т.е. CD132). Данные три субъединицы могут образовать три формы рецепторов: рецептор с высокой авидностью связывания, содержащий все три субъединицы: IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$, рецептор со средней авидностью связывания, содержащий IL-2R β/γ , и рецептор с низкой авидностью связывания, представляющий собой: IL-2R α . Среди них IL-2R β и IL-2R γ необходимы для того, чтобы IL-2 активировал работающие ниже пути сигнализации, и при связывании IL-2 и с IL-2R β , и с IL-2R γ данные две субъединицы рецептора образуют гетеродимер, который фосфорилирует в клетках STAT5 и поступает в ядро клеток, вызывая транскрипцию и экспрессию соответствующего гена: и IL-2R α не является необходимым для сигнализации, но может усиливать связывание IL-2 с IL-2R β и IL-2R γ . Treg непрерывно

30

35

экспрессируют рецептор с высокой авидностью связывания IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$, тогда как неактивированные Т-клетки CD8⁺, NK-клетки (природные киллеры) и тому подобные экспрессируют только рецептор со средней авидностью связывания IL-2R β/γ . Следовательно, низкая доза IL-2 предпочтительно связывается с и активирует Treg, тогда как высокая доза IL-2 может активировать иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки CD8⁺ и NK-клетки.

Поскольку Treg имеют иммунодепрессивные эффекты, и низкая доза IL-2 имеет свойство предпочтительной активации Treg, сообщали о том, что низкая доза IL-2 является полезной для лечения ряда связанных с иммунитетом заболеваний, таких как аутоиммунные заболевания и воспалительные заболевания, например, системная красная волчанка (SLE), диабет типа I (T1D), хроническое заболевание трансплантат против хозяина (cGvHD), трансплантация гематопозитических стволовых клеток (HSCT), круговая алопеция, васкулит, индуцированный вирусом гепатита С, хроническое GvHD, астма, дерматит, острое повреждение легких, хроническое отравление бериллием и сепсис. У многих пациентов, получающих лечение низкой дозой IL-2, имеется увеличение отношения Treg к эффекторным Т-клеткам и облегчение симптомов. Однако в одном аспекте IL-2 имеет короткий период полувыведения и требует частого введения; в другом аспекте IL-2 имеет узкое окно введения, может активировать иммунные эффекторные клетки и усугублять аутоиммунные заболевания, если он вводится в слегка большей дозе. Данные собственные свойства или ограничения IL-2 затрудняют поддержание устойчивой низкой дозы IL-2 у пациентов, ограничивая, посредством этого, дальнейшее применение IL-2.

25 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок. Данная композиция имеет терапевтическую активность. Кроме того, данная композиция также имеет преимущества хорошей стабильности, будучи подходящей для лиофилизации и т.д.

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок и буфер, где указанный слитый белок содержит IL-2 и антитело против IL-2, которые связаны ковалентно; указанный буфер представляет собой гистидиновый буфер, ацетатный буфер или сукцинатный буфер. В некоторых воплощениях указанный буфер представляет

собой гистидиновый буфер или ацетатный буфер. В некоторых воплощениях указанный буфер представляет собой буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида или буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия. В некоторых воплощениях указанный буфер представляет собой буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где буфер имеет рН 5,0-6,5. В некоторых воплощениях указанный буфер имеет рН 5,0-6,0. В некоторых воплощениях указанный буфер имеет рН 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4 или 6,5. В некоторых воплощениях указанный буфер имеет рН 5,5-6,0. В некоторых воплощениях указанный буфер имеет рН 6,0.

В некоторых воплощениях имеется различие не больше, чем плюс/минус 0,3 между рН фармацевтической композиции и рН буфера, который содержит данная фармацевтическая композиция. В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция имеет рН 5,0-6,5. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет рН 6,0-6,5. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет рН 6,0-6,3. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет рН 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4 или 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация слитого белка составляет от 5 мг/мл до 50 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация слитого белка составляет от 5 мг/мл до 30 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация слитого белка составляет от 10 мг/мл до 30 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация слитого белка составляет 5 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл или 30 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация слитого белка составляет 30 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация слитого белка составляет 10 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых воплощениях указанное поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых воплощениях указанное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата, полисорбата 20, полисорбата 80, поллоксамера, Triton, натрия додецилсульфоната,

натрия лаурилсульфоната, натрия октилглицозода, лаурил-сульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лаураמידпропил-бетаина, кокарамидпропил-бетаина, линолеинамидпропил-бетаина, миристиламидпропил-бетаина, пальмитамидпропил-бетаина, изостеарамидпропил-бетаина, миристиламидпропил-диметиламина, пальмитамидпропил-диметиламина, изостеарамидпропил-диметиламина, натрия метилкокоила, натрия метилолеилтаурата, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этилен- и пропиленгликоля и тому подобных. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 (PS80), полисорбат 20 (PS20) или полоксамер 188 (PF68). В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полоксамер 188. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 мг/мл до 2 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 мг/мл до 1,0 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл, 1,9 мг/мл или 2,0 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 1,6 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 1,5 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,8 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,6

мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,4 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция содержит сахар. В некоторых воплощениях указанный сахар выбран из группы, состоящей из традиционных композиций $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$ и их производных, включающих моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахароспирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и тому подобные. Указанный сахар может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина, эритритола, глицерина, арабитола, силита, сорбита, маннита, меллибиозы, мелецитозы, раффинозы, маннотриозы, стахиозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, глюцитолола, мальтитолола, лактитолола, изо-мальтулозы и тому подобных. В некоторых воплощениях указанный сахар выбран из одного или более чем одного из сахарозы, маннита и трегалозы. В некоторых воплощениях указанный сахар представляет собой сахарозу.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация сахара составляет от 20 мг/мл до 100 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет от 30 мг/мл до 80 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет от 40 мг/мл до 80 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет от 30 мг/мл до 50 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 20 мг/мл, 30 мг/мл, 36 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 87 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 87 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 80 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 50 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 45 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 40 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахара составляет 36 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит вспомогательное вещество. В некоторых воплощениях вспомогательное вещество представляет собой глицин, метионин, пролин, гистидин, фенилаланин, гидрохлорид аргинина, глутаминовую кислоту,

аспарагиновую кислоту или эдетат динатрия. В некоторых воплощениях указанное вспомогательное вещество представляет собой глицин.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация
5 вспомогательного вещества составляет от 1 мг/мл до 30 мг/мл; предпочтительно концентрация вспомогательного вещества составляет от 5 мг/мл до 15 мг/мл. В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация вспомогательного
10 вещества составляет 12 мг/мл. В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация вспомогательного вещества составляет 10 мг/мл. В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из
15 приведенного выше, в которой концентрация вспомогательного вещества составляет 9 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой концентрация буфера
20 составляет от 5 мМ до 100 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет от 5 мМ до 30 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет от 10 мМ до 30 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет от 5 мМ до 10 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет 10 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера составляет 5 мМ.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция
25 согласно любому из приведенного выше, где значение KD аффинности антитела против IL-2 в отношении IL-2 меньше или равно 5 нМ. В некоторых воплощениях значение KD аффинности антитела против IL-2 в отношении IL-2 больше 5 нМ или больше или равно 10 нМ и меньше или равно 200 нМ, или меньше или равно 150 нМ, или меньше или равно 100 нМ, или меньше или равно 80 нМ, или меньше или
30 равно 60 нМ. В некоторых воплощениях указанное значение KD больше 5 нМ и меньше или равно 60 нМ, больше 5 нМ и меньше или равно 50 нМ, больше или равно 10 нМ и меньше или равно 50 нМ, больше или равно 10 нМ и меньше или равно 60 нМ, больше 5 нМ и меньше или равно 80 нМ, больше или равно 10 нМ и
35 равно 80 нМ, больше 5 нМ и меньше или равно 100 нМ, больше или равно 10 нМ и меньше или равно 100 нМ, больше 5 нМ и меньше или равно 150 нМ, или больше или равно 10 нМ и меньше или равно 150 нМ.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

- 5 HCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 13, 19, 25, 31, 37 или 43, и/или
HCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 14, 20, 26, 32, 38 или 44, и/или
HCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 15, 21, 27, 33, 39 или 45, и/или
LCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 16, 22, 28, 34, 40 или 46, и/или
LCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 17, 23, 29, 35, 41 или 47, и/или
LCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36, 42 или 48.

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

- 15 HCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 13, 25 или 37 и/или
HCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 14, 26 или 38 и/или
HCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 15, 27 или 39 и/или
LCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 16, 28 или 40 и/или
LCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 17, 29 или 41 и/или
LCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 18, 30 или 42.

20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

- 25 HCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 19, 31 или 43 и/или
HCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 20, 32 или 44 и/или
HCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 21, 33 или 45 и/или
LCDR1, изложенная в SEQ ID NO: 22, 34 или 46, и/или
LCDR2, изложенная в SEQ ID NO: 23, 35 или 47, и/или
LCDR3, изложенная в SEQ ID NO: 24, 36 или 48.

30 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

- HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 13-15, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 16-18, соответственно;
- HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 22-24, соответственно;
- 35 HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 25-27, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 28-30, соответственно;

HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 37-39, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 40-42, соответственно;

5 HCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 43-45, соответственно, и/или LCDR1-3, изложенную в SEQ ID NO: 46-48 соответственно.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

10 VH, изложенную в одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 и 11, или имеющую по меньшей мере 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и/или

VH, изложенную в одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 и 12, или имеющую по меньшей мере 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней.

15 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

20 VH, изложенную в SEQ ID NO: 1 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 2 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней;

VH, изложенную в SEQ ID NO: 3 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 4 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней;

25 VH, изложенную в SEQ ID NO: 5 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 6 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней;

VH, изложенную в SEQ ID NO: 7 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 8 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней;

30 VH, изложенную в SEQ ID NO: 9 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 10 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней; или

35 VH, изложенную в SEQ ID NO: 11 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и VL, изложенную в SEQ ID NO: 12 или имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой для переменных областей и CDR антитела против IL-2 используется система нумерации Kabat.

5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой переменная область тяжелой цепи (VH) антитела против IL-2 связывается с константной областью тяжелой цепи человеческого IgG1; переменная область легкой цепи (VL) связывается с константной областью цепи каппа или лямбда.

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

HC, изложенную в одной из SEQ ID NO: 157, 159, 161, 163, 165 и 167 или имеющую по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и/или

15 LC, изложенную в одной из SEQ ID NO: 158, 160, 162, 164, 166 и 168 или имеющую по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней.

20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит следующее:

25 полноразмерная тяжелая цепь (HC), изложенная в SEQ ID NO: 157 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и полноразмерная легкая цепь (LC), изложенная в SEQ ID NO: 158 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней;

HC, изложенная в SEQ ID NO: 159 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и LC, изложенная в SEQ ID NO: 160 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней;

30 HC, изложенная в SEQ ID NO: 161 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и LC, изложенная в SEQ ID NO: 162 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней;

35 HC, изложенная в SEQ ID NO: 163 или имеющая по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и LC, изложенная в SEQ ID NO: 164 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней;

НС, изложенная в SEQ ID NO: 165 или имеющая по меньшей мере 90%-ную идентичность с ней, и LC, изложенная в SEQ ID NO: 166 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней; или

5 НС, изложенная в SEQ ID NO: 167 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней, и LC, изложенная в SEQ ID NO: 168 или имеющая по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с ней.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2
10 представляет собой Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, линейное антитело, одноцепочечное антитело, scFv, sdAb, sdFv, нанотело, пептитело, доменное антитело или мультиспецифичное антитело (биспецифичное антитело, диатело, триатело или тетратело, тандемный ди-scFv или тандемный три-scFv); например, антитело против IL-2 представляет собой конкретно фрагмент scFv, Fv, Fab или Fab'.

15 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой IL-2 в слитом белке связывается с вариабельной областью легкой цепи или вариабельной областью тяжелой цепи антитела против IL-2; например, IL-2 связывается с N-концом вариабельной области легкой цепи или вариабельной области тяжелой цепи
20 антитела против IL-2. В некоторых воплощениях IL-2 связывается с N-концом вариабельной области легкой цепи антитела против IL-2.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой IL-2 в слитом белке связывается с антителом против IL-2 посредством линкера. В некоторых
25 воплощениях указанный линкер представляет собой гибкий пептидный линкер. В некоторых воплощениях указанный линкер имеет 5-50, 10-40, 20-30 или 25 аминокислот в длину. В некоторых воплощениях указанный линкер выбран из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных (G_mS_n)_x или (GGNGT)_x, или (YGNGT)_x, где m и n каждый независимо выбран из
30 группы, состоящей из целых чисел от 1 до 8 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), и x независимо выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20). В некоторых конкретных воплощениях указанный линкер имеет аминокислотную последовательность, представленную (G₄S)_x, в которой x независимо выбран из
35 группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6 (например, x представляет собой 4 или 5). Указанный линкер также может представлять собой другой линкер, который

является аналогичным по гибкости и длине аминокислотным последовательностям, представленным $(G_mS_n)_x$ или $(GGNGT)_x$, или $(YGNGT)_x$, описанным выше. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность данного линкера излагается в SEQ ID NO: 190.

5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой слитый белок селективно усиливает активность или стимулирует пролиферацию клеток, которые сильно экспрессируют IL-2Ra; клетки, которые сильно экспрессируют IL-2Ra, представляют собой, например, регуляторные Т-клетки (Treg).

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой IL-2 в слитом белке имеет замену аминокислоты в положении 3 (как, например, T3) или N-концевую делецию. В некоторых конкретных воплощениях аминокислота в положении 3 IL-2 заменяется Ala, Gln или Glu (как, например, T3A, T3Q или T3E), и N-концевая делеция представляет собой делецию первых 3 или 7 аминокислот от N-конца.

15 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой слитый белок содержит HC и LC, выбранную из группы, состоящей из:

20 HC, изложенной в SEQ ID NO: 169, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 158;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 171, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 160;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 159, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 172;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 173, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 162;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 175, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 164;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 163, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 176;
25 HC, изложенной в SEQ ID NO: 177, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 166;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 179, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 168;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 167, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 180;
HC, изложенной в SEQ ID NO: 161, и LC, изложенной в любой из SEQ ID NO:
174 и 181-186;

30 HC, изложенной в SEQ ID NO: 157, и LC, изложенной в SEQ ID NO: 170 или 187;

HC, изложенной в SEQ ID NO: 165, и LC, изложенной в любой из SEQ ID NO: 178, 188, и 189; и

35 последовательностей, имеющих по меньшей мере 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с описанными выше HC и LC.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой слитый белок селективно усиливает влияние IL-2 на активность Treg (например, активность, стимулирующая пролиферацию, активность, стимулирующая фосфорилирование STAT5) и/или селективно увеличивает способность IL-2 стимулировать экспрессию одного или более чем одного из FOXP3, CD25 и Icos в клетках Treg.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой слитый белок дополнительно имеет одно или более чем одно из (i)-(iii):

10 (i) активирует активность Treg больше, чем он активирует активность T-клеток CD8+;

(ii) стимулирует фосфорилирование STAT5 больше в клетках Treg, чем в T-клетках CD8+; и

15 (iii) стимулирует пролиферацию клеток Treg больше, чем он стимулирует пролиферацию T-клеток CD8+, T-клеток CD4+ или NK-клеток.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой антитело против IL-2 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи; переменная область тяжелой цепи имеет: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; переменная область легкой цепи имеет: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых воплощениях переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях антитело против IL-2 содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 166.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, в которой IL-2 слит, непосредственно или посредством линкера, с N-концом легкой цепи антитела против IL-2. В некоторых воплощениях аминокислотный остаток в положении 3 IL-2 представляет собой E. В некоторых воплощениях указанный слитый белок содержит тяжелую цепь с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 189.

5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,05 мг/мл до 2 мг/мл полисорбата или полуксамера, (c) от 20 мг/мл до 100 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, ацетатного буфера или сукцинатного буфера, причем указанный буфер имеет рН от 5,5 до 6,5.

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

15 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата или полуксамера, (c) от 30 мг/мл до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, ацетатного буфера или сукцинатного буфера, имеющего рН от 5,5 до 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

20 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата или полуксамера, (c) от 40 мг/мл до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, ацетатного буфера или сукцинатного буфера, имеющего рН от 5,5 до 6,5.

25 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

30 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл полисорбата или полуксамера, (c) от 40 мг/мл до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, ацетатного буфера или сукцинатного буфера, имеющего рН от 5,5 до 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

35 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата или полуксамера, (c) от 40 мг/мл до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, имеющего рН от 5,5 до 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

5 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл полисорбата или полоксамера, (c) от 40 мг/мл до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 мМ до 30 мМ гистидинового буфера, имеющего рН от 5,5 до 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

10 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ ацетатный буфер, имеющий рН 5,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

15 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ гистидиновый буфер, ацетатный буфер или сукцинатный буфер, имеющий рН 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

20 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ гистидиновый буфер, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

25 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ гистидиновый буфер, имеющий рН 6,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

30 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ ацетатный буфер, имеющий рН 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

35

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл трегалозы и (d) 10 мМ ацетатный буфер, имеющий pH 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл поллоксамера 188, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ ацетатный буфер, имеющий pH 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл поллоксамера 188, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ гистидиновый буфер, имеющий pH 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл поллоксамера 188, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH от 5,5 до 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,6 мг/мл поллоксамера 188, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,6 мг/мл поллоксамера 188, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,6 мг/мл полисорбата 80, (c) 80 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 87 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

15 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 87 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

20 (a) 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) 1,5 мг/мл полисорбата 80, (c) 87 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

25 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата или полоксамера, (c) от 30 мг/мл до 80 мг/мл сахарозы, (d) от 1 мг/мл до 30 мг/мл глицина и (e) от 5 мМ до 10 мМ буфера на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющего рН 6,0.

30 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

35 (a) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка, (b) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) от 30 мг/мл до 50 мг/мл сахарозы, (d) от 5 мг/мл до 15 мг/мл глицина и (e) от 5 мМ до 10 мМ буфера на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющего рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

5 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 1,6 мг/мл полисорбата 80, (c) 36 мг/мл сахарозы, (d) 12 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

10 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 36 мг/мл сахарозы и (d) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие
15 компоненты:

(a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 36 мг/мл сахарозы, (d) 12 мг/мл глицина и (e) 5 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция
20 согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 36 мг/мл сахарозы, (d) 12 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция
25 согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

30 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 1,6 мг/мл полисорбата 80, (c) 36 мг/мл сахарозы, (d) 12 мг/мл глицина и (e) 5 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

35 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 50 мг/мл сахарозы, (d) 9 мг/мл глицина и (e) 5 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий рН 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

5 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 50 мг/мл сахарозы, (d) 9 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

10 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 45 мг/мл сахарозы, (d) 10 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

15 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 45 мг/мл сахарозы, (d) 10 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

(a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 40 мг/мл сахарозы, (d) 10 мг/мл глицина и (e) 5 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

25 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, которая содержит следующие компоненты:

30 (a) 10 мг/мл указанного слитого белка, (b) 0,8 мг/мл полисорбата 80, (c) 40 мг/мл сахарозы, (d) 10 мг/мл глицина и (e) 10 мМ буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющий pH 6,0.

Подразумевается то, что числовые интервалы по настоящему раскрытию включают каждое число и поднабор чисел в пределах данного интервала, независимо от того, являются ли они конкретно раскрытыми или нет.

35 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция представляет собой жидкий препарат. В некоторых воплощениях

растворителем данного жидкого препарата является вода. В некоторых воплощениях путь введения данной композиции представляет собой подкожную, внутрикожную, внутривенную или внутримышечную инъекцию. В некоторых воплощениях путь введения данной композиции представляет собой подкожную
5 инъекцию.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, где указанный лиофилизированный препарат может быть восстановлен с образованием фармацевтической композиции согласно
10 любому из приведенного выше. Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, который представляет собой лиофилизированную форму фармацевтической композиции согласно любому из приведенного выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения лиофилизированного препарата, включающий стадию осуществления
15 лиофилизации фармацевтической композиции согласно любому из приведенного выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, где указанный лиофилизированный препарат получают осуществлением лиофилизации фармацевтической композиции согласно
20 любому из приведенного выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен восстановленный раствор, где указанный восстановленный раствор получают посредством осуществления растворения лиофилизированного препарата
25 согласно любому из приведенного выше. Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, который представляет собой восстановленную форму лиофилизированного препарата согласно любому из приведенного выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен продукт, содержащий контейнер, где указанный контейнер содержит фармацевтическую
30 композицию согласно любому из приведенного выше, лиофилизированный препарат согласно любому из приведенного выше или восстановленный раствор согласно любому из приведенного выше.

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено применение фармацевтической композиции согласно любому из
35 приведенного выше, лиофилизированного препарата согласно любому из приведенного выше, восстановленного раствора согласно любому из приведенного

выше или продукта согласно любому из приведенного выше в получении лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания или откладывания прогрессирования аутоиммунного заболевания.

5 Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ лечения аутоиммунного заболевания или откладывания прогрессирования аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции согласно любому из приведенного выше, лиофилизированного препарата согласно любому из приведенного выше, восстановленного раствора согласно любому из приведенного выше или продукта
10 согласно любому из приведенного выше.

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию дополнительно предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, лиофилизированный препарат согласно любому из приведенного выше, восстановленный раствор согласно любому из приведенного выше или продукт
15 согласно любому из приведенного выше для применения в лечении аутоиммунного заболевания или откладывания прогрессирования аутоиммунного заболевания.

В некоторых воплощениях указанное аутоиммунное заболевание выбрано из любого одного или комбинации следующих: волчанка, заболевание «трансплантат против хозяина», васкулит, индуцированный вирусом гепатита С, диабет I типа, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, хроническое GvHD (заболевание «трансплантат против хозяина»), астма, дерматит, круговая алопеция, острое поражение легкого, сепсис, реактивный артрит и ревматоидный артрит.
20

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1A и 1B показаны результаты ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) для антител против IL-2, блокирующих связывание IL-2 с IL-2R α и IL-2R β , соответственно, где на ФИГ. 1A показаны результаты ELISA
30 для антител против IL-2, блокирующих связывание IL-2 с IL-2R α , и на ФИГ. 1B показаны результаты ELISA для антител против IL-2, блокирующих связывание IL-2 с IL-2R β .

На ФИГ. 2 показаны способности антител против IL-2 к связыванию с IL-2 при измерении посредством ELISA.

На ФИГ. 3А-3Н показаны экспериментальные результаты стимуляции фосфорилирования STAT5 в Treg и Т-клетках CD8⁺ в человеческой периферической крови посредством нековалентных комплексов антитела против IL-2 и IL-2.

5 На ФИГ. 4А-4D показаны экспериментальные результаты активности слитых белков в отношении стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках (Treg) и Т-клетках CD8⁺ в человеческой периферической крови.

На ФИГ. 5А-5F показаны экспериментальные результаты влияния слитых белков на пролиферацию лимфоцитов в периферической крови мышей Balb/c.

10 На ФИГ. 6 показаны экспериментальные результаты влияния слитых белков на пролиферацию лимфоцитов в селезенке мышей, иммунизированных OVA.

На ФИГ. 7 показаны результаты эффективности слитых белков в модели замедленной гиперчувствительности мышей.

15 На ФИГ. 8А-8В показаны результаты эффективности слитых белков в мышинной модели артрита.

На ФИГ. 9А-9F показаны экспериментальные результаты активности слитых белков, образованных антителом против IL-2 и разными вариантами IL-2, в отношении стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках (Treg) и Т-клетках CD8⁺ в человеческой периферической крови.

20 На ФИГ. 10 показаны экспериментальные результаты влияния D2-60-b-T3E на содержание белка в моче мышей MRL/lpr (n равно 7-10).

25 На ФИГ. 11А и 11В показаны экспериментальные результаты влияния D2-60-b-T3E на содержание дцДНК (двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота) IgG и дцДНК IgM в сыворотке мышей MRL/lpr соответственно (**P меньше 0,01 относительно модельной контрольной группы).

На ФИГ. 12А и 12В показаны экспериментальные результаты влияния D2-60-b-T3E на почечную функцию мышей MRL/lpr соответственно. *P меньше 0,05, **P меньше 0,01, ****P меньше 0,0001 относительно модельной контрольной группы, n равно 9-10.

30 На ФИГ. 13А и 13В показаны экспериментальные результаты влияния D2-60-b-T3E на содержание IL-6 и INF- γ (интерферон-гамма) в сыворотке мышей MRL/lpr соответственно. *P меньше 0,05, **P меньше 0,01, ****P меньше 0,0001 относительно модельной контрольной группы, n равно 9-10.

35 На ФИГ. 14 показаны экспериментальные результаты влияния D2-60-b-T3E на содержание IL-10 в сыворотке мышей MRL/lpr. *P меньше 0,05, **P меньше 0,01, ****P меньше 0,0001 относительно модельной контрольной группы, n равно 9-10.

На ФИГ. 15 показано влияние D2-60-b-T3E на патологический балл мышей MRL/lpr. *P меньше 0,05, **P меньше 0,01, ****P меньше 0,0001 относительно модельной контрольной группы, n равно 9-10.

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Терминология

Для того, чтобы облегчить понимание настоящего раскрытия некоторые технические и научные термины конкретно определяются ниже. Если в данном документе не определено в явной форме иначе, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные обычным специалистам в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие.

Трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот, используемые в данном документе, являются такими, как описано в J. *biol. chem*, 243, p3558 (1968).

15 Подразумевается то, что термин «интерлейкин-2» или «IL-2» интерпретируется в широком смысле и включает любой относящийся к IL-2 продукт, включающий гомологи человеческого IL-2 и IL-2, не являющегося человеческим, фрагменты или усечения, слитые белки (например, слитые с сигнальным пептидом или другими активными компонентами (например, антитело) и неактивными компонентами), модифицированные формы (например, ПЭГилированные, гликозилированные, конъюгированные/слитые с альбумином, конъюгированные и/или слитые с Fc и гидроксиэтилированные формы), консервативно модифицированные белки и т.д. Указанный термин охватывает любой природный IL-2 из любого позвоночного-источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызунов (например, мыши и крысы). Указанный термин также охватывает не подвергавшийся процессингу IL-2, а также любую форму подвергавшегося процессингу IL-2, происходящего из клеток; встречающиеся в природе варианты IL-2, такие как образующиеся в результате сплайсинга или аллельные варианты; и консервативно модифицированные варианты IL-2.

30 Термин «IL-2R α », «CD25» или « α субъединица рецептора IL-2» относится к любому природному CD25 из любого источника-позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызунов (например, мыши и крысы). Указанный термин охватывает не подвергавшийся процессингу «полноразмерный» CD25, а также любую форму подвергавшегося процессингу CD25, происходящего из клеток; и встречающиеся в природе варианты CD25, такие

как образующиеся в результате сплайсинга или аллельные варианты. В некоторых воплощениях CD25 представляет собой человеческий CD25 с иллюстративной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 37.

5 Термин «высокоаффинный рецептор IL-2» относится к гетеротримерной форме рецептора IL-2, которая состоит из субъединицы γ рецептора (также известной как субъединица γ обычного рецептора цитокина, γ c или CD132), субъединицы β рецептора (также известной как CD122, p70 или IL-2R β) и субъединицы α рецептора (также известной как CD25, p55 или IL-2R α). В отличие от него, термин «рецептор IL-2 с умеренной аффинностью» относится к рецептору
10 IL-2, который содержит только субъединицы γ и β , но не субъединицу α (см., например, Olejniczak and Kasprzak, MedSci Monit 14, RA179-189 (2008)).

Термин «консервативные модификации» применим к аминокислотным и нуклеотидным последовательностям. Относительно конкретных нуклеотидных последовательностей, консервативные модификации относятся к тем нуклеиновым
15 кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, в случае нуклеотидов, не кодирующих аминокислотные последовательности, к по существу идентичным нуклеотидным последовательностям. Относительно аминокислотных последовательностей термин «консервативные модификации» относится к замене аминокислот в белке
20 другими аминокислотами, имеющими аналогичные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформация остова и жесткость), таким образом, что можно часто делать замены без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно то, что, вообще говоря, замена одной аминокислоты в несущественной области
25 полипептида существенно не изменяет биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., стр. 224, (4-е издание)).

Термин «мутации аминокислот» включают замены, делеции, вставки, модификации аминокислот и их любую комбинацию для получения конечной
30 конструкции, которая обладает желательными свойствами, такими как повышенная стабильность и увеличенная активность. Делеции и вставки аминокислотной последовательности включают аминоконцевые и/или карбоксиконцевые делеции и вставки аминокислот. Предпочтительные мутации аминокислот представляют собой замены аминокислот. Для изменения свойств связывания, например,
35 антитела против IL-2, можно делать неконсервативные замены аминокислот, т.е.

одна аминокислота заменяется другой аминокислотой, имеющей другие структурные и/или химические свойства. Предпочтительные замены аминокислот включают замену гидрофобных аминокислот гидрофильными аминокислотами. Замены аминокислот включают замену не встречающимися в природе аминокислотами или встречающимися в природе аминокислотными производными

5 20 стандартных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Мутации аминокислот могут быть генерированы с использованием хорошо известных в данной области генетических или химических способов, включая сайт-направленный мутагенез, ПЦР

10 (полимеразная цепная реакция), синтез генов, химическую модификацию и тому подобные.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает целый ряд структур антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифичные антитела, мультиспецифичные антитела (например,

15 биспецифичные антитела); и полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты или антигенсвязывающие группировки), но не ограничиваясь ими, при условии, что они демонстрируют желательную активность связывания антигена. Термин «антитело» может относиться к иммуноглобулину, который представляет собой структуру из четырех пептидных цепей, образованную

20 двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями, связанными межцепочечными дисульфидными связями. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина отличаются по их аминокислотному составу и организации, и, таким образом, по их антигенной специфичности. Соответственно, иммуноглобулины могут подразделяться на пять классов или изотипов иммуноглобулинов, а именно: IgM,

25 IgD, IgG, IgA и IgE с их соответствующими тяжелыми цепями, представляющими собой цепь μ , цепь δ , цепь γ , цепь α и цепь ϵ соответственно. Ig того же самого класса может быть разделен на разные подклассы согласно различиям аминокислотного состава шарнирных областей и числа и положений дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть разделен на

30 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи подразделяют на цепи κ или λ согласно различиям в константных областях. Каждый из данных пяти классов Ig может иметь цепь κ или цепь λ . В тяжелых и легких цепях антитела последовательности из примерно 110 аминокислот около N-конца значительно варьируют и, таким образом, именуется переменными областями (области V); остальные

35 аминокислотные последовательности около C-конца являются относительно

стабильными и, таким образом, называются константными областями (области C).
Вариабельные области содержат 3 гипервариабельные области (CDR) и 4
каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями.
Данные 3 гипервариабельные области определяют специфичность антитела и,
5 таким образом, также известны как области, определяющие комплементарность
(CDR). Каждая из вариабельных областей легкой цепи (VL) и вариабельных
областей тяжелой цепи (VH) состоит из 3 областей CDR и 4 областей FR,
организованных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке:
FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. 3 области CDR легкой цепи относятся к
10 LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и 3 области CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1,
HCDR2 и HCDR3.

Для выявления или определения CDR однозначное описание CDR может
осуществляться определением структуры антитела и/или определением структуры
комплекса антитело-лиганд и идентификацией остатков, участвующих в
15 антигенсвязывающем сайте. Это может осуществляться любой из целого ряда
методик, известной специалистам в данной области, такой как рентгеновская
кристаллография. Для идентификации CDR можно использовать целый ряд
способов анализа, включая схему нумерации Kabat, схему нумерации Chothia,
схему нумерации AbM, схему нумерации IMGT, контактное определение и
20 конформационное определение.

Схема нумерации Kabat является стандартом для нумерации остатков в
антителах и обычно используется для идентификации областей CDR (см.,
например, Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28:214-8).

Схема нумерации Chothia является аналогичной схеме нумерации Kabat, за
25 исключением того, что в ней принимается во внимание расположение
определенных областей структурных петель (см., например, Chothia et al., 1986, *J.*
Mol. Biol., 196:901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342:877-83).

В схеме нумерации AbM для моделирования структур антител применяется
интегрированный пакет компьютерной программы, произведенный Oxford Molecular
30 Group (см., например, Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272;
"AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies", Oxford,
UK; Oxford Molecular, Ltd.). В системе нумерации AbM для моделирования
третичной структуры антител из основных последовательностей применяется
комбинация базы данных известной информации и способ *de-novo* (см. способы,
35 описанные в Samudrala et al., 1999, "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a

Combined Hierarchical Approach”, *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198).

5 Контактное определение основывается на анализе доступных кристаллических структур комплекса (см., например, MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45).

При конформационном определении положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые содействуют энталпии связывания антигена (см., например, Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166).

10 Другие определения границ CDR могут не следовать строго одному из приведенных выше способов, но все-таки перекрываются по меньшей мере с частью CDR по Kabat, хотя они и могут быть сокращены или удлинены на основе прогнозирований или экспериментальных результатов о том, что конкретный остаток или конкретная группа остатков значимо не влияет на связывание
15 антигена. CDR в том виде, как указанный термин используется в данном документе, может относиться к CDR, определенному любым способом, известным в данной области, включая комбинации способов. В способах, используемых в данном документе, можно использовать CDR, определенные согласно любому из данных способов. Для любого данного воплощения, включающего больше, чем
20 один CDR, CDR могут быть определены согласно любому из определений Kabat, Chothia, расширенному, AbM, IMGT, контактному и/или конформационному.

«Моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, включенные в данную популяцию, являются идентичными, за исключением
25 возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от поликлональных антител, каждое моноклональное антитело нацелено на одну детерминанту на антигене. Модификатор «моноклональное»
30 указывает на характеристики антитела, полученного из популяции по существу гомогенных антител, и указанный термин не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые согласно настоящему раскрытию, можно получать способами гибридомы, впервые описанными Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:
35 495, или можно получать способом генной инженерии, описанным в патенте США № 4816567. Например, моноклональные антитела также можно выделять из

полученной фаговой библиотеки с использованием методики, описанной в McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554.

«Человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие от последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческое антитело по настоящему раскрытию может включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro*, или соматические мутации *in vivo*). Однако «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающего (такого как мышь), были привиты в последовательность человеческого каркаса (т.е. «гуманизированные антитела»).

«Человеческое антитело» или «рекомбинантное человеческое антитело» включает человеческие антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные способами генной инженерии, включающими методики и способы, хорошо известные в данной области, такие как:

(1) антитела, выделенные от трансгенных генов человеческого иммуноглобулина, трансхромосомных животных (например, мышей) или гибридом, полученных из них;

(2) антитела, выделенные из клеток-хозяев, которые были трансформированы для экспрессии антител, таких как трансфектомы;

(3) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител; и

(4) антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные таким способом, как осуществление сплайсинга последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, в которых используются специфические последовательности человеческого иммуноглобулина зародышевой линии, и также включают последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антитела.

Термин «антиген (Ag)» относится к молекуле, используемой для иммунизации иммунологически активного позвоночного с получением антитела (Ab), которое распознает Ag; или молекуле, или имитации, используемой для скрининга в экспрессионной библиотеке, например, особенно в библиотеке

фагового, дрожжевого или рибосомального дисплея. Ag определяется в данном документе более широко, и обычно подразумевается то, что он включает молекулы-мишени, распознаваемые Ab (антитело). Следовательно, Ag включает молекулы или их части, или имитации, используемые в способах иммунизации для

5 получения Ab или при скрининге библиотек для отбора Ab. Следовательно, антитело по настоящему раскрытию, которое связывается с IL-2, полноразмерный IL-2 от видов млекопитающих (например, IL-2 человека, обезьяны, мыши и крысы), включая его мономеры и полимеры (например, димеры, тримеры и т.д.), а также

10 разрезанные варианты и другие варианты IL-2, все называются антигенами.

Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин (или антитело). Эпитоп может образоваться из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом посредством третичного сворачивания белка. Эпитоп, образованный из смежных аминокислот, обычно сохраняется после воздействия денатурирующего

15 растворителя, тогда как эпитоп, образованный посредством третичного сворачивания, обычно теряется после обработки денатурирующим растворителем. Эпитоп обычно содержит, например, от 3 до 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какой эпитоп связывается данным антителом, хорошо известны в данной области и включают

20 анализ иммуноблоттингом, анализ иммуноосаждением и тому подобные. Способы определения пространственной конформации эпитопа включают методики, известные в данной области, и методики, описанные в данном документе, такие как рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс.

«Фрагмент антитела» включает одноцепочечные антитела; Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-

25 dsFv, однодоменные антитела (например, VH или VL, или VHH), scFv, двухвалентные или трехвалентные, или четырехвалентные антитела, бис-scFv, диатела, тритела, триатела, тетратела и эпитопсвязывающие фрагменты любого из приведенных выше. Способы продуцирования и получения таких фрагментов

30 антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Fab-Fv был впервые раскрыт в WO2009/040562, и его стабилизированная дисульфидом форма Fab-dsFv была впервые раскрыта в WO2010/035012. Антигенсвязывающий фрагмент по настоящему раскрытию также включает фрагменты Fab и Fab', описанные в

35 WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Многовалентные антитела могут содержать многие специфичности (например, биспецифичности) или могут

быть моноспецифичными (см., например, WO92/22583 и WO05/113605), и пример последнего представляет собой Tri-Fab (или TFM), описанный в WO 92/22583.

Фраза «связывание с IL-2» относится к способности взаимодействовать с IL-2 или его эпитопом, где IL-2 или его эпитоп могут происходить от человека.

5 Термин «антигенсвязывающий сайт» относится к непрерывному или прерывистому трехмерному пространственному сайту на антигене, который распознается антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему раскрытию.

10 Термин «регуляторная Т-клетка» или «Treg» относится к специализированному типу Т-клеток CD4⁺, которая может ингибировать ответ других Т-клеток. Treg отличаются экспрессией субъединицы α рецептора IL-2 (CD25) и транскрипционного фактора forkhead box P3 (FOXP3) и играют ключевую роль в индукции и поддержании периферической аутолерантности к антигенам, включая антигены, экспрессируемые опухолями. Treg требуют IL-2 для ее функции

15 и развития, а также для индукции ее ингибирующих характеристик.

Термин «эффекторная функция» относится к тем биологическим активностям, которые приписывают области Fc антитела (либо области с природной последовательностью Fc, либо области варианта аминокислотной последовательности Fc), и которые варьируют с изотипом антитела. Примеры

20 эффекторных функций антитела включают; связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток); и активацию В-клеток. «ADCC» относится к прямому умерщвлению покрытых

25 антителом клеток-мишеней посредством клеток, экспрессирующих рецептор Fc, через распознавание сегмента Fc антитела. Эффекторная функция ADCC антитела может уменьшаться или устраняться посредством модификации сегмента Fc IgG. Данная модификация относится к мутациям в константной области тяжелой цепи антитела, таким как мутации, выбранные из группы, состоящей из N297A, L234A, L235A и P329G IgG1, химеры IgG2/4 и F234A/L235A

30 IgG4. «CDC» относится к активации цитотоксической формы каскада комплемента посредством связывания компонента C1q комплемента с Fc антитела. Способы выявления активности ADCC и CDC антитела известны в данной области. Например CDC можно оценивать посредством определения активности

35 связывания между антителом, подлежащим анализу, и рецептором Fc (например, C1q).

Термин «рецептор Fc» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с областью Fc антитела. Предпочтительный FcR представляет собой человеческий FcR. Кроме того, предпочтительный FcR представляет собой FcR (рецептор γ), связывающийся с антителом IgG, и он включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и формы данных рецепторов, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA («активированный рецептор») и Fc γ RIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, которые отличаются, главным образом, в их цитоплазматических доменах.

5

10 Активированный рецептор Fc γ RIIA содержит в его цитоплазматическом домене мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит в его цитоплазматическом домене ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) (см. обзор M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Обзор FcRs дается в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). В данном документе термином «FcR» охватываются другие FcR, включая рецепторы, подлежащие идентификации в будущем. Указанный термин также включает неонатальный рецептор FcRn, ответственный за перенос материнского IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

15

20

Термин «специфичное связывание» или «селективное связывание» относится к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Типично антитело связывается с заданным антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации (K_D) примерно меньше, чем 10^{-7} М или даже меньше и с

25

аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности для связывания с неспецифичным антигеном, отличным от заданного антигена (или его эпитопа), или с близкородственным антигеном (например, BSA (бычий сывороточный альбумин) и т.д.) при определении методиками поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе с использованием рекомбинантного

30

человеческого IL-2 или его эпитопа в качестве аналита и антитела в качестве лиганда. Термин «антитело, распознающее антиген» используется в данном документе взаимозаменяемо с термином «специфично связывающееся антитело».

Термин «аффинность» используется в данном документе в качестве меры силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном). Термин

35

«аффинность» используется для описания одновалентных взаимодействий (собственной активности). Аффинность связывания между двумя молекулами можно количественно определять посредством определения константы диссоциации (K_D). K_D можно определять измерением кинетики образования и диссоциации комплекса с использованием, например, способа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называют константой скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}) соответственно. K_D соотносится с k_a и k_d посредством уравнения $K_D = k_d/k_a$.

Значение константы диссоциации можно определять непосредственно хорошо известными способами и можно рассчитывать такими способами, как способы, описанные Casesi et al (1984, Byte 9:340-362) даже для сложных смесей. Например, K_D можно определять посредством применения анализа связывания на основе двойного фильтрования через нитроцеллюлозный фильтр, такого как анализ, раскрытый Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432). В данной области известны другие стандартные анализы для оценки способности антитела к связыванию с антигеном-мишенью, и они включают, например, ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинг, RIA (радиоиммуноанализ) и проточную цитометрию, а также другие анализы, проиллюстрированные примерами в других местах в данном документе. Кинетику связывания и аффинность связывания антитела также можно оценивать стандартными анализами, известными в данной области, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), например, с использованием системы Biacore™ или KinExA. Авидности связывания, ассоциированные с разными молекулярными взаимодействиями, например, авидности связывания разных антител с данным антигеном, можно сравнивать посредством сравнения значений K_D антител/слитых белков. Аналогичным образом, специфичность взаимодействия можно оценивать определением и сравнением значения K_D интересующего взаимодействия (например, специфического взаимодействия между антителом и антигеном) со значением K_D для отсутствия интересующего взаимодействия (например, контрольного антитела, для которого известно то, что оно не связывается с IL-2). В некоторых воплощениях антитело против IL-2 по настоящему раскрытию способно к связыванию с его мишенью с аффинностью по меньшей мере в 2 раза, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз или 10000 раз большей, чем его аффинность связывания с другой молекулой, не являющейся IL-2, без ограничения в данном документе.

Термины «ингибирование» и «блокирование» используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Подразумевается то, что ингибирование и блокирование также включает любое измеримое снижение аффинности связывания и активности, стимулирующей пролиферацию клетки (например, Т-клетки), IL-2, находящегося в контакте с антителом против IL-2, по сравнению с IL-2, не находящимся в контакте с антителом против IL-2.

Термины «гомология» или «идентичность» относятся к сходству последовательностей между двумя последовательностями полинуклеотидов или между двумя полипепидами. При занятии положений в двух сравниваемых последовательностях идентичными основаниями или мономерными субъединицами аминокислот, например, если положение каждой из двух молекул ДНК занято аденином, данные молекулы являются гомологичными в данном положении. Процентная доля гомологии между двумя последовательностями представляет собой функцию числа соответствующих или гомологичных положений, которые делят две последовательности, поделенного на число сравниваемых положений, умноженному на 100%. Например, если 6 из 10 положений являются соответствующими или гомологичными при оптимальном выравнивании двух последовательностей, две данные последовательности являются на 60% гомологичными. Обычно при выравнивании двух последовательностей осуществляют сравнение для получения максимальной процентной доли гомологии.

Термин «фармацевтическая композиция» означает то, что она содержит один или более чем один слитый белок, как описано в данном документе, а также другие компоненты, такие как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Подразумевается то, что фармацевтическая композиция стимулирует введение в организм таким образом, чтобы облегчать поглощение активного ингредиента, оказывая, посредством этого, биологическую активность. Термины «фармацевтическая композиция» и «препарат» в том виде, как они используются в данном документе, не являются взаимоисключающими.

«Эффективное количество» содержит достаточное количество для облегчения или предупреждения симптома или признака медицинского состояния. Эффективное количество также относится к достаточному количеству для обеспечения или облегчения постановки диагноза. Эффективное количество для конкретного субъекта или ветеринарного субъекта может варьировать, в зависимости от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, общее

состояние здоровья субъекта, способ, путь, и дозировка введения, и тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или схему введения для избежания значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

5 Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает любое вещество, которое, при объединении с активным ингредиентом, позволяет данному ингредиенту сохранять биологическую активность и не реагирует с иммунной системой субъекта. Примеры включают любой стандартный фармацевтический носитель, такой как фосфатно-солевой
10 буферный раствор, вода, эмульсия, такая как эмульсия типа масло/вода, и разные типы увлажнителей, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях разбавителем для аэрозольного или парентерального введения является фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или нормальный (0,9%) физиологический раствор. Композиции, содержащие такие носители, готовят
15 хорошо известными традиционными способами.

Термин «буфер» относится к буферу, который сопротивляется изменениям рН посредством действия его компонентов сопряженной пары кислота-основание. Примеры буферов, которые поддерживают рН в пределах подходящего интервала, включают ацетатный, сукцинатный, глюконатный, гистидиновый, оксалатный,
20 лактатный, фосфатный, цитратный, тартратный, фумаратный, глицил-глициновый буферы и буферы на основе других органических кислот.

«Гистидиновый буфер» представляет собой буфер, содержащий гистидин. Примеры гистидиновых буферов включают гистидин-гистидина гидрохлорид, гистидин-гистидина ацетат, гистидин-гистидина фосфат, гистидин-гистидина
25 сульфат и тому подобные. Буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида является предпочтительным. Буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида может быть получен из гистидина и соляной кислоты, или из гистидина и гистидина гидрохлорида.

«Цитратный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы цитрата. Примеры цитратных буферов включают лимонную кислоту-цитрат натрия,
30 лимонную кислоту-цитрат калия, лимонную кислоту-цитрат кальция, лимонную кислоту-цитрат магния и тому подобные. Предпочтительный цитратный буфер представляет собой лимонную кислоту-цитрат натрия.

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы сукцината. Примеры сукцинатных буферов включают янтарную кислоту-натриевую
35 соль янтарной кислоты, янтарную кислоту-сукцинат калия, янтарную кислоту-

кальциевую соль янтарной кислоты и тому подобные. Предпочтительный сукцинатный буфер представляет собой янтарную кислоту-натриевую соль янтарной кислоты. В качестве иллюстрации, янтарную кислоту-сукцинат натрия можно получать из янтарной кислоты и гидроксида натрия или из янтарной кислоты и натриевой соли янтарной кислоты.

«Фосфатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы фосфата. Примеры фосфатных буферов включают динатрия гидрофосфат-натрия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-калия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-лимонную кислоту и тому подобные. Предпочтительный фосфатный буфер представляет собой динатрия гидрофосфат-натрия дигидрофосфат.

«Ацетатный буфер» представляет собой буфер содержащий ацетатные ионы. Примеры ацетатных буферов включают уксусную кислоту-ацетат натрия, гистидин-гистидина ацетат, уксусную кислоту-ацетат калия, уксусную кислоту-ацетат кальция, уксусную кислоту-ацетат магния и тому подобные. Предпочтительный ацетатный буфер представляет собой уксусную кислоту-ацетат натрия.

Термин «лиофилизированный препарат» относится к препарату или фармацевтической композиции, полученной лиофилизацией фармацевтической композиции или препарата в виде жидкости или раствора в вакууме.

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может достигать эффекта стабильности: фармацевтическая композиция, в которой слитый белок по существу сохраняет его физическую и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность после хранения; предпочтительно данная фармацевтическая композиция по существу сохраняет ее физическую и химическую стабильность, а также ее биологическую активность после хранения. Период хранения обычно выбирают на основе предварительно определенного срока хранения данной фармацевтической композиции. В настоящее время доступно множество аналитических методик для измерения стабильности белка, и можно измерять стабильность после хранения в течение выбранного периода времени при выбранной температуре.

Стабильным препаратом является препарат, в котором не наблюдается значимого изменения при следующих условиях: хранение при температуре охлаждения (2-8°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно 6 месяцев, более предпочтительно 1 года и даже более предпочтительно вплоть до 2 лет. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные характеристики после хранения при

температурах, включающих 25°C, в течение периодов, включающих 1 месяц, 3 месяца или 6 месяцев. Типичные примеры в отношении стабильности являются следующими: обычно агрегирует или деградирует не больше, чем примерно 10%, предпочтительно, не больше, чем примерно 5% молекул слитого белка при измерении ГФ-ВЭЖХ (гель-фильтрация-высокоэффективная жидкостная хроматография). Указанный препарат представляет собой бледно-желтую, почти бесцветную и прозрачную жидкость или бесцветную и прозрачную жидкость, или является от прозрачного до слегка опалесцентного при визуальном анализе. Концентрация, pH и осмоляльность данного препарата имеют изменения не больше, чем плюс/минус 10%, предпочтительно изменения не больше, чем плюс/минус 5%. Обычно в данном препарате формируется агрегация не больше, чем примерно 10%, предпочтительно, не больше, чем примерно 5%.

Слитый белок «сохраняет его физическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если он не демонстрирует значимого увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальной проверке цвета и/или прозрачности, или при определении посредством рассеяния света в УФ (ультрафиолетовый диапазон спектра), гель-фильтрации (ГФ) и динамического рассеяния света (ДРС). Изменения конформации белка можно оценивать посредством флуоресцентной спектроскопии (которая определяет третичную структуру белка) и посредством спектроскопии FTIR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) (которая определяет вторичную структуру белка).

Слитый белок «сохраняет его химическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если он не демонстрирует значимого химического изменения. Химическую стабильность можно оценивать посредством выявления и количественного измерения измененных форм данного белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белков, включают гидролиз или фрагментацию (оцениваемые такими способами, как гель-фильтрация и CE-SDS (капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия)), окисление (оцениваемое такими способами, как пептидное картирование в комбинации с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), деаμίдирование (оцениваемое такими способами, как ионообменная хроматография, капиллярная изоэлектрофокусировка, пептидное картирование и определение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризация (оцениваемая по определению содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидному картированию и т.д.).

Слитый белок «сохраняет его биологическую активность» в фармацевтическом препарате, если биологическая активность данного слитого белка в указанное время находится в пределах заданного интервала биологической активности, демонстрируемого во время получения данного фармацевтического препарата.

«Введение», «давание» и «обработка», при применении к животным, человеку, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относится к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства или композиции с животными, человеком, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. «Введение», «давание» и «обработка», например, могут относиться к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение в контакт реактива с клетками и приведение в контакт реактива с жидкостью, где данная жидкость находится в контакте с клетками. «Введение», «давание» и «обработка» также относятся к обработке, например, клеток реактивами, диагностическими, связывающими композициями или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Осуществление обработки», при применении к человеку, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтической обработке, предупредительным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим приложениям.

«Лечение» относится к введению терапевтического средства, например, содержащего любую из фармацевтических композиций по настоящему раскрытию, либо внутренне, либо внешне пациенту с одним или более чем одним симптомом заболевания, для которого известно, что указанное терапевтическое средство имеет терапевтический эффект. Обычно терапевтическое средство вводят в эффективном количестве для облегчения одного или более чем одного симптома заболевания у подвергающегося лечению субъекта или популяции для индукции регрессии таких симптомов или для ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени. Эффективное количество терапевтического средства для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также известное как «терапевтически эффективное количество») может варьировать, в зависимости от целого ряда факторов, таких как состояние заболевания, возраст и масса субъекта, и способность данного лекарственного средства давать желательный терапевтический эффект у данного пациента. То, был ли облегчен симптом заболевания, можно оценивать любыми способами клинического анализа,

обычно используемыми врачами или другими профессионалами системы здравоохранения, для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя воплощения настоящего раскрытия (например, способы лечения или продукты) и могут быть неэффективными в облегчении симптомов каждого интересующего заболевания, они должны уменьшать симптомы интересующего заболевания у статистически значимого числа пациентов при определении посредством любого способа статистического анализа, известного в данной области, такого как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

Подробности одного или более чем одного воплощения настоящего раскрытия излагаются в приведенном выше описании изобретения. Хотя в воплощении на практике или тестировании настоящего раскрытия и можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или идентичные способам и материалам, описанным в данном документе, предпочтительные способы и материалы описываются ниже. Другие характеристики, объекты и преимущества настоящего раскрытия будут очевидными из описания изобретения и формулы изобретения. В данном описании изобретения и формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные обычным специалистам в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Все патенты и публикации, процитированные в данном описании изобретения, включаются посредством ссылки. Следующие примеры излагаются для того, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные воплощения настоящего раскрытия. Данные примеры не следует истолковывать любым образом как ограничивающие объем настоящего раскрытия, которое определяется формулой изобретения.

30 Примеры – слитые белки

Настоящее раскрытие дополнительно описывается ниже со ссылкой на примеры, которые, однако не предназначены для того, чтобы ограничивать объем настоящего раскрытия. PCT/CN2021/076806 (приоритет: CN202010107662.4) включается в указанный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

35 Экспериментальные методики без указанных конкретных условий в примерах или опытных примерах обычно проводятся согласно традиционным

условиям или согласно условиям, рекомендованным изготовителями исходных веществ или коммерческих продуктов. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY.

5 Реактивы без конкретного указанного происхождения представляют собой имеющиеся в продаже традиционные реактивы.

Пример 1. Скрининг на антитела против IL-2

А) Скрининг библиотеки природных фагов с человеческими Fab

Сохраненную суспензию библиотеки природных фагов разводили, 10 блокировали BSA (бычий сывороточный альбумин) и инкубировали с магнитными шариками Dynabeads (M-280, Invitrogen). Данные фаги отбирали после негативного скрининга и инкубации. Шарика связывали и промывали согласно способу системы скрининга магнитных шариков Kingfisher (Thermo Scientific) и инкубировали с 5% BSA. Осуществляли покрытие Dynabeads и блокировку IL-2, меченным биотином, с 15 меткой человеческого Fc (Sanyou Biopharmaceutical, № доступа GenBank: P60568-1), инкубировали с суспензией фага, отобранной после негативного скрининга, и связывали и промывали согласно способу системы скрининга магнитных шариков Kingfisher. Фаги элюировали панкреатином. После элюции раствор фагов хорошо смешивали с клетками *E. coli* SS320 (Sanyou Biopharmaceutical) в логарифмической 20 фазе роста и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Наносили клетки *E. coli* SS320 на планшет 2YT-Car⁺-Tet⁺ и культивировали в течение ночи в инкубаторе при 37°C. Рассчитывали количество фага на входе, выходе и тому подобное, и фаги на входе получали посредством соскабливания с планшетов и скрининга за 3 цикла.

25 В) Первичный скрининг моноклональных фагов, экспрессирующих Fab против IL-2, способный к связыванию с IL-2, посредством ELISA

2000 клонов от 3-го цикла скрининга отбирали и культивировали в течение 30 ночи в 96-луночном глубоколуночном планшете. Супернатант отбирали центрифугированием. Антитело против человеческого IgG (STAR161, Bio-rad) разводили до 2 мкг/мл PBS и добавляли в объеме 30 мкг/лунку для покрытия планшета ELISA, и указанный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Указанный планшет промывали PBST (PBS, pH 7,4 плюс 0,1% Tween 20) 3 раза. Указанный планшет блокировали 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали PBST 3 раза. Добавляли 30 мкл супернатанта, 35 полученного центрифугированием, и указанный планшет инкубировали при

комнатной температуре в течение 2 ч и промывали PBST 3 раза. IL-2, меченный биотином, с меткой человеческого Fc разводили до 2 мкг/мл PBS и добавляли в планшет в объеме 30 мкл/лунку. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и промывали PBST 3 раза. Добавляли 30 мкл вторичного антитела NeutrAvidin-HRP(пероксидаза хрена), разведенного в соотношении 1:8000. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и промывали PBST 9 раз. Добавляли 30 мкл TMB (тетраметилбензидин) для развития окрашивания на 5-10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 30 мкл 2 М HCl или H₂SO₄ для завершения реакции. Указанный планшет считывали в отношении данных посредством микропланшет-ридера при ОП 450 (оптическая плотность при длине волны 450 нм). Наконец, получали 364 клона со специфическими последовательностями.

С) Первичный скрининг на Fab против IL-2, способные блокировать связывание IL-2 с IL-2R β , посредством ELISA

Приведенные выше 364 клона инокулировали в 50 мл среды 2YT-Car⁺-Tet⁺ в соотношении 1:1000 и культивировали в течение ночи при 37°C. Бактериальный раствор переносили в 50 мл центрифужную пробирку и центрифугировали при комнатной температуре. Супернатант отбрасывали, и добавляли к нему 0,5 мл буфера для лизиса белка (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 25 U/мл нуклеаза бензолазы (Merck)), предварительно охлажденного до 4°C. Данную смесь оставляли постоять на льду, инкубировали в течение 1 ч и центрифугировали при 4°C. Указанный супернатант отбирали для более позднего применения.

IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) (№ доступа GenBank: NP_000869.1) разводили до 8 мкг/мл с использованием PBS и добавляли в объеме 30 мкл/лунку для покрытия планшета ELISA, и указанный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Указанный планшет 3 раза промывали PBST. Указанный планшет блокировали 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и 3 раза промывали PBST. Полученный лизат Fab инкубировали с IL-2, меченным биотином, с меткой человеческого Fc (2,5 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 1 ч и добавляли в планшет в объеме 30 мкл/лунку. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 3 раза промывали PBST. Добавляли 30 мкл вторичного антитела NeutrAvidin-HRP, разведенного в соотношении 1:8000. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 9 раз промывали PBST. Добавляли 30 мкл TMB для развития окрашивания на 5-10 мин при комнатной температуре, затем добавляли

30 мкл 2 М HCl или H₂SO₄ для завершения реакции. Указанный планшет считывали на данные посредством микропланшет-ридера при ОП 450.

Получали 6 Fab с сильной способностью к блокированию связывания IL-2 с IL-2Rβ. Для 6 антител полностью человеческого происхождения последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи показаны в Таблице 1, и последовательности областей, определяющей комплементарность (CDR), согласно разным системам нумерации показаны в Таблице 2.

Таблица 1. Последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и легкой цепи (LCVR) полностью человеческих антител против IL-2

| № антитела | Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL) | | № последовательности |
|------------|--|--|----------------------|
| A2-22 | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDW MEYEYYYGMDVWGQGTLLVTVSS | SEQ ID NO: 1 |
| | VL | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSNLYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYSCQQYGSSPLTFGQGT LEIK | SEQ ID NO: 2 |
| A3-21 | VH | EVQLLESGGGLAQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSGITGTGYRTYYADSVKGR FTVSRDNRNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRESG HYYGWFDSWGQGTLLVTVSS | SEQ ID NO: 3 |
| | VL | QSALTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYN VHWYQQVPGTVPKLLIDGKGNRPSGVPDRFSGS KSGTASLAITGLQAEDEADYYCQSYDYMLSGSV VFGRGTKLTVL | SEQ ID NO: 4 |
| B2-15 | VH | EVQLLESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGN SSGYNAFDIWGQGTMTVTVSS | SEQ ID NO: 5 |
| | VL | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSG ADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGK VEIK | SEQ ID NO: 6 |
| C2-53 | VH | EVQLVESGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTALYYCAKDQLR WGTYYYYGMDVWGQGTLLVTVSS | SEQ ID NO: 7 |
| | VL | DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSVSIWVAW YQQKPGKAPKLLIYKASSLERGVPTRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYHCQQYDTGATFGQGTKE MK | SEQ ID NO: 8 |
| D2-60 | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGI SWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREY SSWYSGGMDVWGQGTLLVTVSS | SEQ ID NO: 9 |

| | | | |
|-------|----|---|------------------|
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAW YQQKPGKVPKLLIYAASSTLQSGVPSRFGSGSGT DFTLTISLQPEDVATYYCQKYDSAPFTFGQGTRL EIK | SEQ ID NO: 10 |
| D3-68 | VH | QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGI SWVRRAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDL QSPTYYYGSGVIDYWGQGLTVTVSS | SEQ ID NO: 11 |
| | VL | DIQLTQSPSTLSASVGDRTISCRASRAVSPWLAW YQHRPGQAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYRSYPFTFGPGTTV DIR | SEQ ID NO: 12 |

Таблица 2. Последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи полностью человеческих антител против IL-2

| № антитела | CDR | Система нумерации Kabat | Система нумерации Chothia | Система нумерации IMGT | Система нумерации AbM |
|------------|-------|--|--|--|---|
| A2-22 | HCDR1 | SYMH (SEQ ID NO: 13) | GYTFTSY (SEQ ID NO: 49) | GYTFTSY (SEQ ID NO: 85) | GYTFTSYMH (SEQ ID NO: 121) |
| | HCDR2 | IINPSGGSTSYA QKFQG (SEQ ID NO: 14) | NPSGGS (SEQ ID NO: 50) | INPSGGST (SEQ ID NO: 86) | IINPSGGSTS (SEQ ID NO: 122) |
| | HCDR3 | EDWMEY EYYY GMDV (SEQ ID NO: 15) | EDWMEY EYY YGMDV (SEQ ID NO: 51) | AREDWMEY E YYYGMDV (SEQ ID NO: 87) | EDWMEY EYYY GMDV (SEQ ID NO: 123) |
| | LCDR1 | RASQSVSNLYL A (SEQ ID NO: 16) | RASQSVSNNY LA (SEQ ID NO: 52) | QSVSNNY (SEQ ID NO: 88) | RASQSVSNLYL A (SEQ ID NO: 124) |
| | LCDR2 | GASSRAT (SEQ ID NO: 17) | GASSRAT (SEQ ID NO: 53) | GA (SEQ ID NO: 89) | GASSRAT (SEQ ID NO: 125) |
| | LCDR3 | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 18) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 54) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 90) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 126) |
| A3-21 | HCDR1 | SYAMS (SEQ ID NO: 19) | GFTFSSY (SEQ ID NO: 55) | GFTFSSYA (SEQ ID NO: 91) | GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 127) |
| | HCDR2 | GITGTGYRTYY ADSVKG (SEQ ID NO: 20) | TGTGYR (SEQ ID NO: 56) | ITGTGYRT (SEQ ID NO: 92) | GITGTGYRTY (SEQ ID NO: 128) |
| | HCDR3 | ESGHYYGWFD S (SEQ ID NO: 21) | ESGHYYGWFD DS (SEQ ID NO: 57) | VRESGHYYG WFDS (SEQ ID NO: 93) | ESGHYYGWFD S (SEQ ID NO: 129) |

| | | | | | |
|-------|-------|--|--|--|--|
| | LCDR1 | TGSSSNIGAGY NVH (SEQ ID NO: 22) | TGSSSNIGAG YNVH (SEQ ID NO: 58) | SSNIGAGYN (SEQ ID NO: 94) | TGSSSNIGAGY NVH (SEQ ID NO: 130) |
| | LCDR2 | GKGNRPS (SEQ ID NO: 23) | GKGNRPS (SEQ ID NO: 59) | GK (SEQ ID NO: 95) | GKGNRPS (SEQ ID NO: 131) |
| | LCDR3 | QSYDYMLSGS VV (SEQ ID NO: 24) | QSYDYMLSG SVV (SEQ ID NO: 60) | QSYDYMLSG SVV (SEQ ID NO: 96) | QSYDYMLSGSV V (SEQ ID NO: 132) |
| B2-15 | HCDR1 | SYMMH (SEQ ID NO: 25) | GYTFTSY (SEQ ID NO: 61) | GYTFTSYY (SEQ ID NO: 97) | GYTFTSYMMH (SEQ ID NO: 133) |
| | HCDR2 | IINPSGGSTSYA QKFQG (SEQ ID NO: 26) | NPSGGS (SEQ ID NO: 62) | INPSGGST (SEQ ID NO: 98) | IINPSGGSTS (SEQ ID NO: 134) |
| | HCDR3 | EGNSSGYNA FDI (SEQ ID NO: 27) | EGNSSGYN AFDI (SEQ ID NO: 63) | AREGNSSGY YNAFDI (SEQ ID NO: 99) | EGNSSGYNAF DI (SEQ ID NO: 135) |
| | LCDR1 | RASQSVSSSYL A (SEQ ID NO: 28) | RASQSVSSSY LA (SEQ ID NO: 64) | QSVSSSY (SEQ ID NO: 100) | RASQSVSSSYL A (SEQ ID NO: 136) |
| | LCDR2 | GASNRAT (SEQ ID NO: 29) | GASNRAT (SEQ ID NO: 65) | GA (SEQ ID NO: 101) | GASNRAT (SEQ ID NO: 137) |
| | LCDR3 | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 30) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 66) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 102) | QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 138) |
| C2-53 | HCDR1 | DYAMH (SEQ ID NO: 31) | GFTFDDY (SEQ ID NO: 67) | GFTFDDYA (SEQ ID NO: 103) | GFTFDDYAMH (SEQ ID NO: 139) |
| | HCDR2 | GISWNSGSIGY ADSVKG (SEQ ID NO: 32) | SWNSGS (SEQ ID NO: 68) | ISWNSGSI (SEQ ID NO: 104) | GISWNSGSIG (SEQ ID NO: 140) |
| | HCDR3 | DQLRWGTYYY YGMDV (SEQ ID NO: 33) | DQLRWGTY YGM DV (SEQ ID NO: 69) | AKDQLRWGT YYYYGMDV (SEQ ID NO: 105) | DQLRWGTYYY YGMDV (SEQ ID NO: 141) |
| | LCDR1 | RASQSVSIWVA (SEQ ID NO: 34) | RASQSVSIWV A (SEQ ID NO: 70) | QSVSIW (SEQ ID NO: 106) | RASQSVSIWVA (SEQ ID NO: 142) |
| | LCDR2 | KASSLER (SEQ ID NO: 35) | KASSLER (SEQ ID NO: 71) | KA (SEQ ID NO: 107) | KASSLER (SEQ ID NO: 143) |
| | LCDR3 | QQYDTGAT (SEQ ID NO: 36) | QQYDTGAT (SEQ ID NO: 72) | QQYDTGAT (SEQ ID NO: 108) | QQYDTGAT (SEQ ID NO: 144) |

| | | | | | |
|-------|-------|--|---|---|--|
| D2-60 | HCDR1 | SYGIS (SEQ ID NO: 37) | GYTFTSY (SEQ ID NO: 73) | GYTFTSYG (SEQ ID NO: 109) | GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 145) |
| | HCDR2 | WISAYNGNTNY AQKLQG (SEQ ID NO: 38) | SAYNGN (SEQ ID NO: 74) | ISAYNGNT (SEQ ID NO: 110) | WISAYNGNTN (SEQ ID NO: 146) |
| | HCDR3 | EYSSWYSGGM DV (SEQ ID NO: 39) | EYSSWYSGG MDV (SEQ ID NO: 75) | AREYSSWYS GGMDV (SEQ ID NO: 111) | EYSSWYSGGM DV (SEQ ID NO: 147) |
| | LCDR1 | RASQGISNYLA (SEQ ID NO: 40) | RASQGISNYL A (SEQ ID NO: 76) | QGISNY (SEQ ID NO: 112) | RASQGISNYLA (SEQ ID NO: 148) |
| | LCDR2 | AASTLQS (SEQ ID NO: 41) | AASTLQS (SEQ ID NO: 77) | AA (SEQ ID NO: 113) | AASTLQS (SEQ ID NO: 149) |
| | LCDR3 | QKYDSAPFT (SEQ ID NO: 42) | QKYDSAPFT (SEQ ID NO: 78) | QKYDSAPFT (SEQ ID NO: 114) | QKYDSAPFT (SEQ ID NO: 150) |
| D3-68 | HCDR1 | SYGIS (SEQ ID NO: 43) | GYTFTSY (SEQ ID NO: 79) | GYTFTSYG (SEQ ID NO: 115) | GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 151) |
| | HCDR2 | WISAYNGNTNY AQKLQG (SEQ ID NO: 44) | SAYNGN (SEQ ID NO: 80) | ISAYNGNT (SEQ ID NO: 116) | WISAYNGNTN (SEQ ID NO: 152) |
| | HCDR3 | DLQSPTYYYGS GVIDY (SEQ ID NO: 45) | DLQSPTYYYG SGVIDY (SEQ ID NO: 81) | ARDLQSPTYYY YGSGVIDY (SEQ ID NO: 117) | DLQSPTYYYGS GVIDY (SEQ ID NO: 153) |
| | LCDR1 | RASRAVSPWL A (SEQ ID NO: 46) | RASRAVSPWL A (SEQ ID NO: 82) | RAVSPW (SEQ ID NO: 118) | RASRAVSPWLA (SEQ ID NO: 153) |
| | LCDR2 | AASSLQS (SEQ ID NO: 47) | AASSLQS (SEQ ID NO: 83) | AA (SEQ ID NO: 119) | AASSLQS (SEQ ID NO: 155) |
| | LCDR3 | QQYRSYPFT (SEQ ID NO: 48) | QQYRSYPFT (SEQ ID NO: 84) | QQYRSYPFT (SEQ ID NO: 120) | QQYRSYPFT (SEQ ID NO: 156) |

Пример 2. Получение полноразмерных полностью человеческих антител против IL-2

5 Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи 6 антител из Примера 1 связывали с константной областью тяжелой цепи человеческого IgG1 и константной областью цепи каппа или лямбда, соответственно, для конструирования полноразмерных полностью человеческих антител против IL-2. Константная область тяжелой цепи несет мутации L234A и L235A (мутация LALA)

для устранения возможной функции ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) антитела. Полноразмерные последовательности данных 6 антител показаны в Таблице 3.

Таблица 3. Полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей полностью человеческих антител против IL-2

5

| № антитела | Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи (HC) и полноразмерной легкой цепи (LC) | | № последовательности |
|------------|--|---|----------------------|
| A2-22 | HC | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQA</u> <u>PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM</u> <u>ELSSLRSEDTAVYYCAREDWMEYEEYGGMDWVGQGLTQTV</u> <u>SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV</u> <u>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT</u> <u>CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS</u> <u>KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 157 |
| | LC | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNNYLAWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA</u> <u>VYSCQQYGSSPLTFGGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> <u>GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN</u> <u>RGEC</u> | SEQ ID NO: 158 |
| A3-21 | HC | <u>EVQLLESGGGLAQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMSWVRQA</u> <u>PGKLEWVSGITGTGYRTYYADSVKGRFTVSRDNRNTVYL</u> <u>QMNSLRAEDTAVYYCVRESGHYYGWFDWVGQGLTQTVSSA</u> <u>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</u> <u>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 159 |
| | LC | <u>QSALTQPPSVSGAPQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQV</u> <u>PGTVPKLLIDGKGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAE</u> <u>DEADYYCQSYDYMLSGSVVFRGRTKLVLGQPKANPTVTLF</u> <u>PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVE</u> <u>TTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST</u> <u>VEKTVAPTECS</u> | SEQ ID NO: 160 |
| B2-15 | HC | <u>EVQLLESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCAREGNSSGYNAFDIWGQGTMTVSSA</u> <u>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</u> <u>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 161 |

| | | | |
|-------|----|---|----------------|
| | LC | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD</u> <u>SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | SEQ ID NO: 162 |
| C2-53 | HC | <u>EVQLVESGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSGISWNSGSGIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYQMNSLRAEDTALYYCAKQQLRWGTYYYGMDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 163 |
| | LC | <u>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSIWVAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLERGVPTFRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYHCQQYDTGATFGQGTKEVMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD</u> <u>SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | SEQ ID NO: 164 |
| D2-60 | HC | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSSWYSGGMDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 165 |
| | LC | <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYDSAPFTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD</u> <u>SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | SEQ ID NO: 166 |
| D3-68 | HC | <u>QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRRAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLQSPYTYGSGVIDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</u> | SEQ ID NO: 167 |
| | LC | <u>DIQLTQSPSTLSASVGDRTISCRASRAVSPWLAWYQHRPGQAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYRSYPFTFGPGTTVDIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD</u> <u>SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | SEQ ID NO: 168 |

(Примечание: подчеркнутая часть HC представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, и подчеркнутая часть LC представляет собой константную область цепи каппа).

Приведенные выше последовательности синтезировали, расщепляли BamHI и XhoI и вставляли в экспрессионный вектор pcDNA3.1 (Life Technologies, кат. № V790-20) через сайт ферментативного расщепления BamHI/XhoI. Указанный экспрессионный вектор и трансфекционный реактив PEI (Polysciences, Inc., кат. № 23966) трансфицировали в клетки HEK293 (Life Technologies, кат. № 11625019) при соотношении 1:2, и данные клетки помещали в инкубатор с CO₂ и инкубировали в течение 4-5 суток. Экспрессируемые антитела выделяли посредством центрифугирования, очищали традиционным способом и идентифицировали для получения полноразмерных антител полностью человеческого происхождения по настоящему раскрытию.

15 **Пример 3. Анализ ELISA по антителам против IL-2, способным блокировать или уменьшать связывание IL-2 с IL-2R α и блокировать связывание IL-2 с IL-2R β**

А) Анализ ELISA по блокированию или уменьшению связывания IL-2 с IL-2R α посредством антител

20 IL-2R α -Fc (CJ78, Novoprotein) (№ доступа NP_000408) разводили до 0,5 мкг/мл PBS и добавляли в объеме 30 мкл/лунку для покрытия планшета ELISA, и указанный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Указанный планшет 3 раза промывали PBST. Указанный планшет блокировали 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и 3 раза промывали PBST. Антитело против IL-2 разводили в градиенте до 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,63 мкг/мл, 0,31 мкг/мл, 0,16 мкг/мл и 0,08 мкг/мл PBS, pH 7,4, инкубировали с IL-2, меченным биотином, с меткой человеческого Fc (конечная концентрация: 1 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 15 мин, добавляли в планшет в объеме 30 мкл/лунку. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 3 30 раза промывали PBST. Добавляли 30 мкл вторичного антитела NeutrAvidin-HRP, разведенного в соотношении 1:6000, и указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 9 раз промывали PBST. Добавляли 30 мкл TMB для развития окрашивания в течение 5-10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 30 мкл 2 M HCl или H₂SO₄ для завершения реакции. Указанный 35 планшет считывали на данные посредством микропланшет-ридера при ОП 450.

Результаты показаны на ФИГ. 1А. Данные результаты показывают то, что С2-53, D3-68 и А3-21 могли полностью блокировать связывание IL-2 с IL-2R α , а остальные клоны возможно имеют лишь слабую способность блокировать (т.е. уменьшать) связывание IL-2 с IL-2R α при высокой концентрации 10 мкг/мл.

5 Значения IC₅₀ (полумаксимальная ингибирующая концентрация) для антител показаны в Таблице 4.

Таблица 4. Значения IC₅₀ для блокирования антителами против IL-2 связывания IL-2 с IL-2R α

| № антитела | IC ₅₀ (мкг/мл) |
|------------|---------------------------|
| A2-22 | N.A. |
| A3-21 | 1,456 |
| B2-15 | N.A. |
| C2-53 | 0,6591 |
| D2-60 | N.A. |
| D3-68 | 1,196 |

(Примечание: N.A.: из-за слабого блокирующего эффекта не могли быть
10 получены значимые значения IC₅₀ посредством аппроксимации кривой).

В) Анализ ELISA по блокированию связывания IL-2 с IL-2R β посредством антител

IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) разводили до 8 мкг/мл PBS и добавляли в
15 объеме 30 мкл/лунку для покрытия планшета ELISA, и указанный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Указанный планшет 3 раза промывали PBST. Указанный планшет блокировали 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и 3 раза промывали PBST. Антитело против IL-2 разводили в градиенте до 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,63 мкг/мл, 0,31 мкг/мл,
20 0,16 мкг/мл и 0,08 мкг/мл PBS, pH 7,4, инкубировали с IL-2, меченным биотином, с меткой человеческого Fc (конечная концентрация: 5 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 15 мин, добавляли в планшет в объеме 30 мкл/лунку. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 3
25 раза промывали PBST. Добавляли 30 мкл вторичного антитела NeutrAvidin-HRP, разведенного в соотношении 1:6000, и указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 9 раз промывали PBST. Добавляли 30 мкл TMB для развития окрашивания в течение 5-10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 30 мкл 2 М HCl или H₂SO₄ для завершения реакции. Указанный планшет считывали на данные посредством микропланшет-ридера при ОП 450.

Результаты показаны на ФИГ. 1В. Данные результаты показывают то, что все антитела могли полностью блокировать связывание IL-2 с IL-2R β . Значения IC₅₀ для антител показаны в Таблице 5.

Таблица 5. Значения IC₅₀ для блокирования антителами против IL-2 связывания IL-2 с IL-2R β

| № антитела | IC ₅₀ (мкг/мл) |
|------------|---------------------------|
| A2-22 | 2,728 |
| A3-21 | 3,475 |
| B2-15 | 3,045 |
| C2-53 | 1,441 |
| D2-60 | 8,272 |
| D3-68 | 2,134 |

Пример 4. Анализ Octet по блокированию или уменьшению антителами против IL-2 связывания IL-2 с IL-2R α и блокированию связывания IL-2 с IL-2R β

10 А) Анализ Octet по блокированию или уменьшению связывания IL-2 с IL-2R α посредством антител

Биосенсор Streptavidin (Fortebio, №18-5020) погружали в 200 мкл буфера KB (PBS, pH 7,4, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA) на 60 с для увлажняющей обработки. Затем биотинилированный IL-2R α -Fc (CJ78, Novoprotein) разводили до 10 мкг/мл 15 буфером KB, и указанный сенсор погружали в 200 мкл раствора на 150 с. Сенсор погружали в буфер KB на 60 с для элюции избытка IL-2R α . IL-2-His (CX66, Novoprotein) смешивали с антителом против IL-2 и разводили буфером KB до конечных концентраций 100 нМ и 500 нМ, и инкубировали при комнатной 20 температуре в течение 30 мин. Сенсор погружали в смесь на 300 с для ассоциации. Чем сильнее способность антитела против IL-2 блокировать или уменьшать связывание IL-2 с IL-2R α , тем меньше показание. Считывали значения в 230 с после начала связывания. Результаты показаны в Таблице 6.

Таблица 6. Блокирование или уменьшение связывания IL-2 с IL-2R α посредством антител против IL-2 в анализе Octet

| № антитела | Значения для блокирования IL-2R α на уровне Octet |
|------------|--|
| C2-53 | 0,410 |
| A3-21 | 0,428 |
| D3-68 | 0,473 |
| B2-15 | 0,700 |
| D2-60 | 0,754 |
| A2-22 | 0,848 |

В) Анализ Octet по блокированию связывания IL-2 с IL-2R β посредством антител

Биосенсор Streptavidin (Fortebio, №18-5020) погружали в 200 мкл буфера KB (PBS, pH 7,4, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA) на 60 с для увлажняющей обработки. Затем биотинилированный IL-2-Fc (Sanyou Biopharmaceutical) разводили до 10 мкг/мл буфером KB, и указанный сенсор погружали в 200 мкл раствора на 300 с. Сенсор погружали в буфер KB на 60 с для элюции избытка IL-2. Антитело против IL-2 разводили до конечной концентрации 500 нМ буфером KB, и сенсор погружали в раствор антитела для ассоциации на 300 с. Указанный сенсор погружали в буфер KB на 60 с для элюции избытка антитела против IL-2. IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) разводили до конечной концентрации 8000 нМ буфером KB, и сенсор погружали в раствор антитела для ассоциации на 300 с. Чем сильнее способность антитела против IL-2 блокировать связывание IL-2 с IL-2R β , тем меньше показание. Считывали значения в 230 с после начала связывания IL-2R β -Fc. Результаты показаны в Таблице 7.

Таблица 7. Блокирование связывания IL-2 с IL-2R β посредством антител против IL-2 в анализе Octet

| № антитела | Значения для блокирования IL-2R β на уровне Octet |
|------------|---|
| A3-21 | 0,003 |
| C2-53 | 0,017 |
| D3-68 | 0,027 |
| A2-22 | 0,042 |
| B2-15 | 0,056 |
| D2-60 | 0,086 |

20 **Пример 5. Анализ ELISA по связыванию антител против IL-2 с IL-2**

Антитело против человеческого IgG (STAR161, Bio-rad) разводили до 2 мкг/мл PBS и добавляли в объеме 30 мкл/лунку для покрытия планшета ELISA, и указанный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Указанный планшет 3 раза промывали PBST. Планшет блокировали 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и 3 раза промывали PBST. Антитело против IL-2 разводили в градиенте до 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,625 мкг/мл, 0,3125 мкг/мл и 0,15625 мкг/мл с использованием PBS. 30 мкл раствора антитела добавляли в планшет ELISA, и указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 3 раза промывали PBST. Добавляли IL-2, меченный биотином, с меткой человеческого Fc (Sanyou Biopharmaceutical), разведенный до 2

мкг/мл PBS, и добавляли в планшет в объеме 30 мкл/лунку. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 3 раза промывали PBST. Добавляли 30 мкл вторичного антитела NeutrAvidin-HRP, разведенного в соотношении 1:6000. Указанный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и 9 раз промывали PBST. Добавляли 30 мкл TMB для развития окрашивания в течение 5-10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 30 мкл 2 М HCl или H₂SO₄ для завершения реакции. Указанный планшет считывали на данные посредством микропланшет-ридера при ОП 450. Результаты показаны на ФИГ. 2 и в Таблице 8. Данные результаты показывают то, что все антитела могли связываться с IL-2 в данном анализе, среди которых C2-53 имело более сильную способность к связыванию.

Таблица 8. Значения EC₅₀ для связывания антител против IL-2 с IL-2

| № антитела | EC ₅₀ (мкг/мл) |
|------------|---------------------------|
| A2-22 | 1,289 |
| A3-21 | 1,350 |
| B2-15 | 2,117 |
| C2-53 | 0,7301 |
| D2-60 | 1,428 |
| D3-68 | 1,205 |

Пример 6. Анализ Biacore по аффинности и кинетике антител против IL-2 в отношении IL-2

Антитела захватывали сенсорным чипом с белком А (GE, кат. № 29127556) прибора Biacore (Biacore T200, GE), в котором антитела против IL-2 были разведены до 1 мкг/мл с использованием 1× HBS-EP и текли со скоростью тока 10 мкл/мин в течение 30 с. Затем растворы IL-2 (C013, Novoprotein) в серии концентрационных градиентов протекали над поверхностью чипа со скоростью тока 30 мкл/мин для ассоциации в течение 120 с. Растворы текли со скоростью тока 30 мкл/мин для диссоциации в течение 300 с. Сигналы реакции выявляли в реальном времени с получением кривых ассоциации и диссоциации. После завершения диссоциации для каждого цикла анализа чип промывали и регенерировали с использованием 10 mM Gly-HCl, pH 2,0. Данные, полученные из данного анализа, аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1 с получением значений аффинности антител против IL-2 в отношении IL-2. Результаты показаны в Таблице 9. Данные результаты показывают то, что все антитела могли связываться с IL-2 со значениями аффинности, охватывающими от 0,267 нМ для C2-53 до 39,8 нМ для A2-22.

Таблица 9. Аффинность антител против IL-2 в отношении IL-2

| № антитела | Kon (1/Mс) | Koff (1/с) | KD (M) |
|------------|------------|------------|----------|
| C2-53 | 1,64E+07 | 4,37E-03 | 2,67E-10 |
| D3-68 | 1,16E+07 | 5,46E-02 | 4,72E-09 |
| D2-60 | 5,09E+05 | 6,51E-03 | 1,28E-08 |
| B2-15 | 1,46E+06 | 4,48E-02 | 3,06E-08 |
| A2-22 | 1,33E+06 | 5,27E-02 | 3,98E-08 |

Пример 7. Определение активности нековалентных комплексов антитела против IL-2 и IL-2 в отношении фосфорилирования STAT5 в PBMC (однойядерные клетки периферической крови) человеческой периферической крови

Способность антител регулировать активность IL-2 выявляли на основе уровней фосфорилирования STAT5 в разных популяциях клеток (включающих Treg, Т-клетки CD4⁺ и Т-клетки CD8⁺) в человеческой периферической крови, обработанной разными концентрациями нековалентных комплексов антител против IL-2 и IL-2.

Базовая среда: RPMI 1640 плюс 10% фетальной телячей сыворотки.

Смесь антител: CD3 APC-Cy7 (BD 557832), CD4 BV515 (BD 564419), CD8 BV700 (BD 566452), CD25 BV421 (BD 564033) и pSTAT5 AF647 (BD 562076).

Анализ фосфорилирования STAT5 человеческих PBMC: свежeweыделенные человеческие клетки PBMC доводили до плотности $6,5 \times 10^6$ клеток/мл базовой средой, и 80 мкл данной смеси добавляли в 96-луночный планшет. Антитело против IL-2 в разных концентрациях предварительно смешивали с IL-2 в разных концентрациях в течение 30 мин при комнатной температуре, и 20 мкл данной смеси добавляли к 90 мкл PBMC и стимулировали при 37°C в течение 20 мин.

Сразу после данные клетки иммобилизовали с использованием предварительно нагретого буфера BD Cytotfix (BD, кат. № 554655) при 37°C в течение 15 мин и затем иммобилизовали на льду в течение еще 15 мин. Указанный планшет центрифугировали при 400 g в течение 7 мин при 4°C. Супернатант удаляли, и планшет один раз промывали 150 мкл PBS. Добавляли 150 мкл BD Phosflow Perm Buffer III (BD, кат. № 558050), предварительно охлажденного при -20°C, для осуществления разрыва мембран в течение ночи при -20°C. Указанный планшет центрифугировали при 500 g в течение 7 мин при 4°C. Супернатант удаляли, и планшет дважды промывали 150 мкл PBS, pH 7,4. Добавляли 100 мкл реактива, блокирующего FcR, разведенного в соотношении 1:200, и указанный планшет

инкубировали при 4°C в течение 20 мин. Планшет центрифугировали при 500 g в течение 7 мин при 4°C. Супернатант удаляли, добавляли 50 мкл смеси антител, и клетки окрашивали при 4°C в течение 1 ч. Планшет центрифугировали при 500 g в течение 7 мин при 4°C. Супернатант удаляли, и указанный планшет один раз промывали 200 мкл PBS, pH 7,4. Клетки ресуспендировали в 150 мкл PBS с pH 7,4 и выявляли посредством проточной цитометрии (BD FACSCelesta). Т-клетки CD8⁺ определяли как клетки CD3⁺CD4⁻CD8⁺, и Tregs определяли как клетки CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD25⁺.

Значения флуоресценции (MFI) (средняя интенсивность флуоресценции) pSTAT5 подсчитывали для обеих популяций клеток, и процентную долю значения MFI pSTAT5 при каждой концентрации относительно максимального значения MFI pSTAT5 в полностью активированном состоянии рассчитывали и аппроксимировали с использованием компьютерной программы или способа расчета четырехпараметрической регрессии. Результаты показаны на ФИГ. 3А-3Н.

Данные результаты показывают то, что изотипы IgG1 не имели какого-либо влияния на активацию pSTAT5 в Treg и Т-клетках CD8⁺ посредством IL-2 по мере увеличения концентрации антитела. В отличие от этого, А3-21 и С2-53 по существу не влияли на активность IL-2 в отношении Treg, но значительно снижали активность IL-2 в отношении Т-клеток CD8⁺ в широком интервале концентрации. Только при высоких концентрациях, таких как 100 нМ (А3-21) и 33,3 нМ (С2-53), имелось определенное снижение активности IL-2 в отношении Treg, но при данных условиях IL-2 полностью не имел активности в отношении Т-клеток CD8⁺. Другими словами, А3-21 и С2-53 могли ингибировать или в большей степени снижать активность IL-2 в отношении иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки CD8⁺, не влияя или снижая в меньшей степени активность IL-2 в отношении Treg. Аналогичным образом, D3-68 также может снижать активность IL-2 в отношении Т-клеток CD8⁺ в большей степени, чем в отношении Treg, хотя данная способность и может быть не такой значимой, как активность А3-21 и С2-53.

30 **Пример 8. Получение слитых белков**

Нековалентные комплексы антитела против IL-2 и IL-2 можно легко диссоциировать *in vivo* с получением свободного IL-2, приводящего к токсичности. Авторы данного изобретения получили 12 слитых белков антитела против IL-2 и IL-2 посредством конъюгирования человеческого IL-2 с N-концом тяжелой или легкой

цепи антитела против IL-2 через ручку (G₄S)₅ линкера (т.е., GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 190).

Для нумерации антител, если IL-2 находится на N-конце тяжелой цепи антитела, данному слитому белку дается суффикс «а»; и если IL-2 находится на N-конце легкой цепи антитела, данному слитому белку дается суффикс b.

Относительно слитого IL-2, он несет мутацию Т3А (т.е. мутацию аминокислоты в положении 3 от Thr до Ala) для устранения возможного гликозилирования. Зрелый человеческий белок IL-2 не содержит аминокислоту М в положении 1, таким образом, нумерация начинается на аминокислоте А в положении 2. Аминокислотные последовательности из 12 слитых белков являются следующими:

Таблица 10. Полноразмерные последовательности слитых белков

| № антитела | Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи (HC) и полноразмерной легкой цепи (HL) | | № последовательности |
|------------|--|---|----------------------|
| A2-22-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYM HWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREDWMEYEEY YGMDVWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK | SEQ ID NO: 169 |
| | LC | SEQ ID NO: 158 | SEQ ID NO: 158 |
| A2-22-b | HC | SEQ ID NO: 157 | SEQ ID NO: 157 |
| | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNLYA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF LTISRLEPEDFAVYSCQYGSPLTFGQGRLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 170 |

| | | | |
|---------|----|---|-------------------|
| A3-21-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLAQPGSLRLSCAGSGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSGITGTGYRTYYADSVKGRFTVS RDNSRNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRESGHYYGWF DSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK | SEQ ID NO: 171 |
| | LC | SEQ ID NO: 160 | SEQ ID NO: 160 |
| A3-21-b | HC | SEQ ID NO: 159 | SEQ ID NO: 159 |
| | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSQSALTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNV HWYQQVPGTVPKLLIDGKGNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAI TGLQAEDA DYCYQSYDYMLSGSVVFRGRTKLT VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS | SEQ ID NO: 172 |
| B2-15-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSEVQLLESGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGNSSGYNA FDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK | SEQ ID NO: 173 |
| | LC | SEQ ID NO: 162 | SEQ ID NO: 162 |
| B2-15-b | HC | SEQ ID NO: 161 | SEQ ID NO: 161 |
| | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM | SEQ ID |

| | | | |
|---------|----|---|-------------------|
| | | LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGGADF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | NO: 174 |
| C2-53-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSGYADSVKGRFTIS RDNANKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDQLRWGTYYY YGMVWVGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQS SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK | SEQ ID NO: 175 |
| | LC | SEQ ID NO: 164 | SEQ ID NO: 164 |
| C2-53-b | HC | SEQ ID NO: 163 | SEQ ID NO: 163 |
| | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSIWVAV YQQKPGKAPKLLIYKASSLERGVPTRFSGSGSGTEFTL TISSLPEDFATYHCQQYDTGATFGQGTKEVEMKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 176 |
| D2-60-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGI SWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVT MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSSWYSG GMDVWVGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS GLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA | SEQ ID NO: 177 |

| | | | |
|---------|----|--|-------------------|
| | | LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK | |
| | LC | SEQ ID NO: 166 | SEQ ID NO: 166 |
| | HC | SEQ ID NO: 165 | SEQ ID NO: 165 |
| D2-60-b | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAW YQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDVATYYCQKYDSAPFTFGQGTREIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 178 |
| D3-68-a | HC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGI SWVRRAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLQSPTYYG SGVIDYWQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK | SEQ ID NO: 179 |
| | LC | SEQ ID NO: 168 | SEQ ID NO: 168 |
| | HC | SEQ ID NO: 167 | SEQ ID NO: 167 |
| D3-68-b | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVTISCRASRAVSPWLAW YQHRPGQAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQYRSYPFTFGPGTTVDIRRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 180 |

Приведенные выше 12 слитых белков экспрессировали и очищали согласно способу из Примера 2. Уровень экспрессии и чистота в ГФ-ВЭЖХ (гель-

фильтрация-высокоэффективная жидкостная хроматография) показаны в Таблице 11 ниже.

Таблица 11. Уровень экспрессии и чистота слитых белков

| № антитела | Уровень экспрессии (мг/л) | Чистота (%) |
|------------|---------------------------|-------------|
| A2-22-a | 39 | 90,780 |
| A2-22-b | 104 | 96,308 |
| A3-21-a | 82 | 89,358 |
| A3-21-b | 2 | 82,095 |
| B2-15-a | 89 | 53,821 |
| B2-15-b | 70 | 99,839 |
| C2-53-a | N.A. | 54,940 |
| C2-53-b | 6 | 26,598 |
| D2-60-a | 2,4 | 40,248 |
| D2-60-b | 129 | 97,540 |
| D3-68-a | 0,3 | N.A. |
| D3-68-b | 106 | 100 |

- 5 Данные результаты показывают то, что для разных антител против IL-2 IL-2, конъюгированный на N-конце тяжелой или легкой цепи, сильно влиял на уровень экспрессии и чистоту слитого белка. Низкий уровень экспрессии или чистота свидетельствуют о том, что IL-2 и антитело могут не образовать нормального внутримолекулярного связывания, но образуют межмолекулярное связывание в
- 10 слитом белке, вызывая, посредством этого, агрегацию белка. Слитые белки с более высокими уровнями экспрессии (по меньшей мере 20 мг/л) и чистотой (по меньшей мере 90%) отбирали для последующей идентификации.

Пример 9. Анализ Octet по связыванию слитых белков с IL-2R α и IL-2R β

- 15 Биосенсор с белком А (Fortebio, №18-5010) погружали в 200 мкл буфера KB (PBS, pH 7,4, 0,02% Tween-20, 0,1% BSA) на 60 с для увлажняющей обработки. Затем указанный слитый белок разводили до 10 мкг/мл буфером KB, и сенсор погружали в 200 мкл раствора, пока показатель не составлял 1,2 нм. Указанный сенсор погружали в буфер KB на 100 с для элюции избытка слитого белка
- 20 антитела против IL-2. IL-2R α (ILA-H52H9, Acrobiosystem) разводили в 2-кратном градиенте до 100 нМ – 3,125 нМ буфером KB. Сенсор погружали в раствор на 60 с для ассоциации. Сенсор погружали в буфер KB на 60 с для диссоциации. Данные аппроксимировали в динамическом режиме связывания 1:1. Аффинность слитых белков в отношении IL-2R α показана в Таблице 12. Данные результаты
- 25 показывают то, что IL-2, конъюгированный с антителами против IL-2, имел

пониженное связывание с IL-2R α по сравнению с IL-2, среди которых A3-21-a и D3-68-b вообще не связывались с IL-2R α .

Таблица 12. Аффинность слитых белков в отношении IL-2R α

| Опытный образец | Kon (1/Mc) | Koff (1/c) | KD (M) |
|-----------------|------------|------------|----------------|
| IL-2 | 1,40E+06 | 2,51E-02 | 1,80E-08 |
| A2-22-a | 9,22E+05 | 3,75E-02 | 4,06E-08 |
| A2-22-b | 1,63E+06 | 4,13E-02 | 2,53E-08 |
| A3-21-a | N.A. | N.A. | Нет связывания |
| B2-15-b | 1,23E+06 | 3,30E-02 | 2,68E-08 |
| D2-60-b | 1,24E+06 | 5,61E-02 | 4,51E-08 |
| D3-68-b | N.A. | N.A. | Нет связывания |

(Примечание: N.A.: нет связывания, таким образом, не могут быть получены числовые значения посредством аппроксимации. В анализе на аффинность между IL-2 и IL-2R α IL-2R α использовали в качестве неподвижной фазы, а IL-2 использовали в качестве подвижной фазы.)

Аналогично приведенным выше способам, данные аппроксимировали в стационарном режиме посредством Octet. Определенная аффинность слитых белков антитела против IL-2 в отношении IL-2R β (CD2-H5221, Acrobiosystem) показана в Таблице 13. Слитый белок антитела использовали в качестве неподвижной фазы, а IL-2R β использовали в качестве подвижной фазы. Данные результаты показывают то, что большая часть IL-2, конъюгированного с антителами против IL-2, совсем не связывалась с IL-2R β по сравнению с IL-2, и индивидуальные слитые белки антитела против IL-2, такие как D3-68-b, были ослабленными в связывании с IL-2R β , но все еще имели определенную степень связывания. В анализе аффинности IL-2 в отношении IL-2R β IL-2R β использовали в качестве неподвижной фазы, а IL-2 использовали в качестве подвижной фазы.

Таблица 13. Аффинность слитых белков антитела против IL-2 и IL-2 в отношении IL-2R β

| Анализируемый образец | KD (нМ) |
|-----------------------|----------------|
| IL-2 | 4,6E-07 |
| A2-22-a | Нет связывания |
| A2-22-b | Нет связывания |
| A3-21-a | Нет связывания |
| B2-15-b | Нет связывания |
| D2-60-b | Нет связывания |
| D3-68-b | 1,1E-06 |

Пример 10. Определение активности слитых белков в отношении фосфорилирования STAT5 в человеческой периферической крови (PBMC)

Активность слитых белков в отношении фосфорилирования STAT5 в Treg и T-клетках CD8⁺ в человеческой периферической крови (PBMC) определяли согласно способу Примера 7. Как показано на ФИГ. 4A-4D, экспериментальные результаты демонстрируют то, что все слитые белки имели пониженную активность в отношении Treg и T-клеток CD8⁺ по сравнению с IL-2. Однако для A2-22-a, A2-22-b, B2-15-b, D2-60-b и A3-21-b активность данных слитых белков в отношении T-клеток CD8⁺ снижалась больше, чем в отношении Treg, свидетельствуя о том, что IL-2 в данных слитых белках может быть более склонным к активации Treg.

Однако для D3-68-b его активность в отношении Treg снижалась больше, чем в отношении T-клеток CD8⁺ (показана на ФИГ. 4C и 4D). Значения EC₅₀ для слитых белков, активирующих pSTAT5 в Treg и T-клетках CD8⁺, показаны в Таблицах 14 и 15.

Таблица 14. Значения EC₅₀ для слитых белков, активирующих pSTAT5 в клетках Treg

| Анализируемый образец | EC ₅₀ (нМ) |
|-----------------------|-----------------------|
| IL-2 | 0,0003714 |
| A2-22-a | 0,04439 |
| A2-22-b | 0,05677 |
| B2-15-b | 0,01072 |
| D2-60-b | 0,1940 |
| D3-68-b | 0,1731 |
| A3-21-a | 0,1923 |

Таблица 15. Значения EC₅₀ для слитых белков, активирующих pSTAT5 в T-клетках CD8⁺

| Анализируемый образец | EC ₅₀ (нМ) |
|-----------------------|-----------------------|
| IL-2 | 0,4343 |
| A2-22-a | N.A. |
| A2-22-b | N.A. |
| B2-15-b | N.A. |
| D2-60-b | N.A. |
| D3-68-b | 31,06 |
| A3-21-a | N.A. |

(Примечание: N.A.: значения при наивысшей анализируемой концентрации все еще были низкими, и точные значения EC₅₀ не могли быть получены посредством аппроксимации).

5 **Пример 11. Определение влияния слитых белков на иммунные клетки в периферической крови мышей Balb/c**

Самок мышей BALB/c (приобретенных в Charles River Laboratories, Пекин) в возрасте 6-8 недель и весящих 18-20 г, подвергали адаптивному кормлению в течение 5 суток перед экспериментом. Всех мышей BALB/c содержали в системе IVC (клетка с индивидуальной вентиляцией) с постоянной температурой и давлением в помещении для животных класса SPF (свободный от специфических патогенов) при температуре 20-26°C с влажностью 40-70%, с циклом 12/12 часов света/темноты. Не больше, чем 6 мышей BALB/c содержали в каждой клетке. Мышей группировали согласно массе тела, и введение осуществляли после группировки. Тип введенного лекарственного средства, доза введения и путь введения показаны в Таблице 16. Сутками группировки модели были сутки 0.

Таблица 16. Схема введения для мышей

| Группа | N | Обработка | Доза (мг/кг) | Путь введения | Время введения |
|--------|---|-----------|--------------|---------------|----------------|
| 1 | 3 | A2-22-b | 0,7 | Подкожно | Одно введение |
| 2 | 3 | B2-15-b | 0,7 | Подкожно | Одно введение |
| 3 | 3 | D2-60-b | 0,7 | Подкожно | Одно введение |

20 Свежеотобранную кровь, обработанную против свертывания, в каждый момент времени лизировали буфером для лизиса эритроцитов и один раз промывали PBS. Смешанный окрашивающий раствор получали с PBS, содержащим 1% FBS (фетальная бычья сыворотка). Смешанный окрашивающий раствор содержит CD3 APC-Cy7 (Biolegend 100329), CD8 PE (Biolegend 100708),
 25 CD4 PE-Cy7 (eBioscience 25-0042-82) и CD25 PerCP-Cy5.5 (BD 561112). 100 мкл смешанного окрашивающего раствора добавляли в каждый образец, и данную смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Данную смесь дважды промывали PBS, содержащим 1% FBS. Фиксацию и разрыв мембран осуществляли с использованием набора буферов для транскрипционных факторов True-Nuclear™
 30 (Biolegend 424401) в течение 60 мин, и 100 мкл антитела против мышинового Foxp3 (Biolegend 126405) и антитела против мышинового Ki67 eBioscience, 25-5698-82)

инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Данную смесь дважды промывали PBS (pH 7,4), наконец ресуспендировали в 500 мкл промывочного буфера PBS с pH 7,4 и анализировали на приборе. Т-клетки CD8⁺ определяли как клетки CD3⁺CD4⁺CD8⁺, и Treg определяли как клетки CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

5 Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 5А-5F. Для А2-22-в, В2-15-в и D2-60-в в цельной крови мышей процентная доля Treg относительно Т-клеток CD4⁺ увеличивалась с суток 2, и процентная доля Ki67⁺ среди Treg также значимо увеличивалась с суток 2 по сравнению с сутками 0, указывая то, что А2-22-в, В2-15-в и D2-60-в могут сильно стимулировать пролиферацию Treg. В
10 отличие от этого процентная доля Ki67⁺ относительно Т-клеток CD4⁺CD25⁻ и Т-клеток CD8⁺ демонстрировала слабое или не демонстрировала изменения, и процентная доля Т-клеток CD8⁺ относительно Т-клеток CD3⁺ также демонстрировала маленькое изменение, указывая на то, что А2-22-в, В2-15-в и D2-60-в едва ли активируют Т-клетки CD8⁺.

15

Пример 12. Определение влияния слитых белков на иммунные клетки в селезенке мышей Balb/c, иммунизированных куриным овалбумином (OVA)

Куриный овалбумин (OVA, Sigma A5503) растворяли в PBS с получением 0,5 мг/мл раствора. Полный адъювант Фрейнда (CFA, содержащий 1 мг/мл инактивированного *Mycobacterium tuberculosis*, Sigma, F5881). Самцы мышей C57B16/J (приобретены в Shanghai Laboratory Animal Center) в возрасте 6-8 недель и весящие 18-20 г. Мышей группировали согласно массе тела. В сутки 1 эксперимента отбирали 8 мл раствора OVA, хорошо смешивали с 8 мл CFA и эмульгировали с образованием раствора типа «вода в масле». Каждое животное
20 иммунизировали внутрибрюшинной инъекцией 200 мкл раствора. Каждой мыши во всех группах подкожно инъецировали (п.к.) 10 мл/кг анализируемого слитого белка или контроль в виде PBS в сутки 3 и 8. Тип введенного лекарственного средства, доза введения и путь введения показаны в Таблице 17.

25

Таблица 17. Схема иммунизации мышей

| № группы | Номер | Иммунизация | Анализируемый образец | Путь введения | Доза (мг/кг) | Время введения |
|----------|-------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|----------------|
| 1 | 4 | OVA (50 мкг) | PBS | Подкожно | NA | Сутки 3 и 8 |
| 2 | 4 | OVA (50 мкг) | A2-22-в | Подкожно | 0,7 | Сутки 3 и 8 |
| 3 | 4 | OVA (50 мкг) | B2-15-в | Подкожно | 0,7 | Сутки 3 и 8 |

| | | | | | | |
|---|---|--------------|---------|----------|-----|-------------|
| 4 | 4 | OVA (50 мкг) | D2-60-b | Подкожно | 0,7 | Сутки 3 и 8 |
|---|---|--------------|---------|----------|-----|-------------|

В сутки 10 мышей умерщвляли, селезенки отбирали и обрабатывали для выявления релевантных иммунных клеток посредством проточной цитометрии. Методики были следующими: после погружения в 75%-ный этанол на 5 мин селезенку мышей вынимали при асептических условиях, 1-2 раза промывали PBS и затем разрезали на куски. В 50 мл центрифужную пробирку помещали фильтровальную сетку, кусочки ткани селезенки переносили в сетку и растирали при непрерывном добавлении свежего PBS. Суспензию после растирания центрифугировали при 1800 об./мин в течение 3 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли 10 мл буфера для лизиса эритроцитов, оставляли смесь постоять на льду в течение 5 мин перед добавлением PBS для остановки лизиса. Данную смесь дважды центрифугировали при 1800 об./мин в течение 3 мин. После окрашивания согласно способу окрашивания антител в проточной цитометрии BioLegend клетки дважды ресуспендировали в PBS, просеивали и выявляли посредством проточной цитометрии.

Выявленные клетки и их маркеры были следующими:

В-клетки герминального центра селезенки (GCB) (Fas⁺GL-7⁺B220⁺);

фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh) (PD1-высокий, CXCR5-высокий, FOXP3⁻CD4⁺);

фолликулярные регуляторные Т-клетки (Tfr) (PD1-высокий, CXCR5-высокий, FOXP3⁺CD4⁺);

регуляторные Т-клетки (Treg) (FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺CXCR5-низкий).

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 6. Все из A2-22-b, B2-15-b и D2-60-b могли стимулировать пролиферацию Treg и Tfr в селезенке и ингибировать количество Tfr GCB в селезенке, указывая то, что A2-22-b, B2-15-b и D2-60-b имеют функцию ингибирования иммунной системы посредством активации Treg.

Пример 13. Эксперимент по эффективности слитых белков в мышинной модели гиперчувствительности замедленного типа

Экспериментальные методики были следующими: 2,4-динитрофторбензол (DNFB, Sigma, 42085-50G) растворяли со смесью ацетона и оливкового масла (4:1) с получением 1%-ного раствора (1 г/100 мл) для применения позднее, который затем разводили до 0,5%-ного (0,5 г/100 мл) раствора для применения позднее.

Самцы мышей ICR (приобретенные в Shanghai Laboratory Animal Center) в возрасте 6 недель и весящие 18-20 г. Мышей группировали согласно массе тела. В сутки 0 эксперимента мышей иммунизировали нанесением 50 мкл 1%-ного раствора DNFB (динитрофторбензол) на живот; в сутки 5 эксперимента мышей стимулировали нанесением 10 мкл 0,5%-ного раствора DNFB (всего 20 мкл) внутрь и снаружи правого уха; и в сутки 6 эксперимента ткани левого и правого уха по отдельности удаляли с использованием 8 мм пробойника и взвешивали, рассчитывали разницу массы между тканями левого и правого уха. Анализируемое лекарственное средство вводили подкожно один раз каждые 5 суток, с 2 суток до начала эксперимента (Сутки -2).

Тип введенного лекарственного средства, доза введения и путь введения показаны в Таблице 18.

Таблица 18. Схема иммунизации мышей

| № группы | Число | Анализируемый образец | Доза (мкг/кг) | Путь введения | Время введения |
|----------|-------|-----------------------|---------------|---------------|----------------|
| 1 | 5 | PBS | NA | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 2 | 5 | A2-22-b | 1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 3 | 5 | A2-22-b | 0,3 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 4 | 5 | A2-22-b | 0,1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 5 | 5 | B2-15-b | 1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 6 | 5 | B2-15-b | 0,3 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 7 | 5 | B2-15-b | 0,1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 8 | 5 | D2-60-b | 1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 9 | 5 | D2-60-b | 0,3 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |
| 10 | 5 | D2-60-b | 0,1 | Подкожно | Сутки -2 и 3 |

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 7. Все из A2-22-b, B2-15-b и D2-60-b могли снижать степень опухания уха и демонстрировали связь доза-ответ, указывая то, что A2-22-b, B2-15-b и D2-60-b имеют функцию ингибирования иммунной системы.

Пример 14. Эксперимент по эффективности слитых белков в мышинной модели артрита

Самцов инбредных мышей DBA/1 приобретали у Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd. Модель артрита индуцировали иммунизацией коровьего коллагена типа II (Biolead, 20022). В сутки 0 эксперимента брали 2,5 мл коровьего коллагена типа II/ледяной уксусной кислоты (2 мг/мл) и хорошо смешивали с 2,5 мл полного

адьюванта Фрейнда с образованием эмульсии типа «вода в масле». 0,1 мл данной эмульсии внутривенно инъецировали в корень хвоста каждой мыши под легкой эфирной анестезией, с последующей одной бустерной инъекцией через 3 недели. Модельных животных случайным образом делили на 6 групп: нормальная контрольная группа, модельная контрольная группа, группа IL-2 (C013, novoprotein), группа A2-22-b и группа B2-15-b, с 8 животными в каждой группе. Тем временем, нормальных контрольных животных включали в нормальную контрольную группу. Данные группы показаны в Таблице 19.

Таблица 19. Схема иммунизации для мышей

| № группы | Группа | Число животных | Доза (мг/кг) | Частота введения | Путь введения | Объем (мл/кг) |
|----------|-------------------------------|----------------|--------------|------------------|--------------------------|---------------|
| 1 | Нормальная контрольная группа | 8 | - | Q5D × 14 суток | в.б. (внутрибрюшинно) | - |
| 2 | Модельная контрольная группа | 8 | - | Q5D × 14 суток | в.б. | - |
| 3 | Группа IL-2 | 8 | 100000IU | Q2D × 14 суток | п.к. | 5 |
| 4 | Группа A2-22-b | 8 | 0,7 | Q5D × 14 суток | в.б. | 5 |
| 5 | Группа B2-15-b | 8 | 0,7 | Q5D × 14 суток | в.б. | 5 |

10 (Примечание: Q5D – один раз каждые пять суток; Q2D – один раз каждые двое суток; в.б. – внутрибрюшинное введение; п.к. – подкожное введение).

Оценка воспаления суставов: мышей взвешивали и давали им полуколичественную бальную оценку (клинические баллы) в отношении тяжести воспаления суставов каждые 3 суток, начиная с вторичной иммунизации:

- 15 0 баллов: нет красноты и припухлости;
 1 балл: воспаление или краснота и припухлость в одном месте на ступне;
 2 балла: легкое воспаление на ступне или краснота и припухлость в двух или более чем двух местах на всей ступне;
 3 балла: умеренная краснота и припухлость на всей ступне; и
 20 4 балла: тяжелая краснота и припухлость, равномерная скованность в суставе, нарушение деформируемости и подвижности на всей ступне.

Максимальный балл составляет 4 балла на ступню и 16 баллов на мышцу. Наблюдение тяжести воспаления суставов продолжали до завершения эксперимента.

25 Измерение концентрации антитела против коровьего коллагена типа II в сыворотке: в конце эксперимента отбирали кровь, отделяли сыворотку и хранили при -80°C. Уровень антитела против коровьего коллагена типа II в сыворотке

измеряли с использованием набора для выявления ELISA (Chondrex, 20322T). Конкретные стадии проводили согласно инструкциям.

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 8А и 8В. Масса мышей в модельной контрольной группе значимо снижалась, и балл артрита был значимо
 5 повышен (p меньше 0,001) по сравнению с баллом в нормальной контрольной группе; и В2-15-b мог значимо ингибировать потерю массы мышью модели артрита и значимо снижать балл артрита (p меньше 0,05) по сравнению с модельной контрольной группой. Концентрация антитела IgG2a против коровьего
 10 коллагена типа II в сыворотке мышей в модельной контрольной группе была значимо повышенной (p меньше 0,001) по сравнению с концентрацией в нормальной контрольной группе; и введение В2-15-b могло значимо снижать секрецию антитела IgG2a против коровьего коллагена типа II в сыворотке
 15 артритных мышей (p меньше 0,01) по сравнению с модельной контрольной группой.

Пример 15: влияние разных длин ручек линкера на уровень экспрессии и чистоту слитого белка

Ручку линкера $(G_4S)_5$ между IL-2 и легкой цепью антитела против IL-2 В2-15 в В2-15-b укорачивали до 4 повторов G_4S , тогда как тяжелая цепь оставалась
 20 неизменной, таким образом, чтобы получать вариант В2-15-b- $(G_4S)_4$ В2-15-b. Последовательность легкой цепи данного варианта показана в Таблице 20.

Таблица 20. Последовательность полноразмерной легкой цепи антитела в слитом белке

| Слитый белок № | Аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи | | № последовательности |
|------------------------|--|--|----------------------|
| В2-15-b- $(G_4S)_4$ | LC | APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGA DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSPLTFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 181 |

25 После того, как вариант В2-15-b, описанный выше, экспрессировали и очищали согласно способу Примера 2, уровень экспрессии все еще мог достигать 47 мг/л, и чистота составляла 99% при определении посредством ГФ-ВЭЖХ,

указывая на то, что при всех разных длинах ручек линкера может достигаться экспрессия слитого белка.

Пример 16. Определение активности слитых белков антитела против IL-2 и разных вариантов IL-2 в отношении фосфорилирования STAT5 в человеческой периферической крови (PBMC)

IL-2 мутировали для введения T3E или T3Q или для удаления первых 3 аминокислот с N-конца IL-2 (B2-15-b-Del3), или для удаления первых 7 аминокислот с N-конца IL-2 (B2-15-b-Del7). В качестве альтернативы, IL-2 дикого типа прямо конъюгировали с антителами против IL-2. Продуцировали следующие слитые белки (последовательность тяжелой цепи каждого антитела поддерживали постоянной), показанные в Таблице 21.

Таблица 21. Последовательности полноразмерной легкой цепи антител в слитых белках

| № слитого белка | Аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи | | № последовательности |
|----------------------------------|--|---|----------------------|
| B2-15-b-T3E | LC | APESSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 182 |
| B2-15-b-WT (IL-2 дикого типа) | LC | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 183 |
| B2-15-b-T3Q | LC | APQSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV | SEQ ID NO: 184 |

| | | | |
|--------------|----|---|-------------------|
| | | THQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| B2-15-b-Del3 | LC | SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 185 |
| B2-15-b-Del7 | LC | KKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSII STLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP GTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 186 |
| A2-22-b-Del3 | LC | SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSNNYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYSCQQYGSSPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 187 |
| D2-60-b-Del3 | LC | SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPG KVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DVATYYCQKYDSAPFTFGGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 188 |
| D2-60-b-T3E | LC | APESSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFAQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPG KVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE EDVATYYCQKYDSAPFTFGGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC | SEQ ID NO: 189 |

Активность слитых белков антитела против IL-2 и вариантов IL-2, описанных выше, в отношении фосфорилирования STAT5 в Treg и Т-клетках CD8⁺ в человеческой периферической крови (PBMC) определяли согласно способу из Примера 7. Как показано на ФИГ. 9А-9F и в Таблице 22, экспериментальные результаты демонстрируют то, что данные варианты IL-2 оказывали незначительное влияние на активность слитых белков антитела в отношении Treg и Т-клеток CD8⁺. Данные слитые белки все еще были более склонны активировать Treg вместо Т-клеток CD8⁺.

Таблица 22. Значения EC₅₀ в отношении слитых белков антитела против IL-2 и разных вариантов IL-2, активирующих pSTAT5 в клетках Treg

| Слитый белок № | EC ₅₀ (нМ) |
|----------------|-----------------------|
| A2-22-b | 0,168 |
| A2-22-b-Del3 | 0,144 |
| B2-15-b | 0,016 |
| B2-15-b-T3E | 0,031 |
| B2-15-b-WT | 0,041 |
| B2-15-b-T3Q | 0,029 |
| B2-15-b-Del3 | 0,038 |
| B2-15-b-Del7 | 0,055 |
| D2-60-b | 0,114 |
| D2-60-b-Del3 | 0,229 |
| D2-60-b-T3E | 0,168 |

Пример 17. Эксперимент по эффективности слитых белков в мышинной модели MRL/lpr спонтанной красной волчанки

Самок мышей BALB/c и самок мышей MRL/lpr приобретали в Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd. Самок мышей BALB/c включали в нормальную контрольную группу, и и самок мышей MRL/lpr случайным образом делили на следующие 3 группы согласно уровню протеинурии и массе тела: контрольная группа MRL/lpr (модельная контрольная группа), группа введения 1 мг/кг и группа введения 3 мг/кг. Каждой мыши в двух группах введения при достижении возраста 8 недель подкожно инъецировали D2-60-b-T3E в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг, соответственно, один раз каждые 3 суток в течение последовательных 8 недель.

Таблица 23. Схема проведения эксперимента и деление на группы

| Мыши | Группа | Доза (мг/кг) | Частота введения | Путь введения | Число животных |
|-------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------|---------------|----------------|
| Нормальные Balb/c | Нормальная контрольная группа | - | Один раз каждые 3 суток | п.к. | 10 |
| MRL/lpr | Модельная | - | Один раз | п.к. | 10 |

| | | | | | |
|--|-----------------------------|---|-------------------------|------|----|
| | контрольная группа | | каждые 3 суток | | |
| | Группа введения D2-60-b-T3E | 1 | Один раз каждые 3 суток | п.к. | 10 |
| | | 3 | Один раз каждые 3 суток | п.к. | 10 |

Во время периода обработки содержание белка в моче мышей в каждой группе определяли каждые две недели; в конце 8 последовательных недель обработки проводили следующие анализы: (1) определение содержания антител IgM и IgG против двухцепочечной ДНК в сыворотке мышей в каждой группе; (2) определение содержания сывороточного креатинина (CRE) и азоты мочевины в крови (BUN) в сыворотке мышей в каждой группе; (3) определение содержания IL-6, IL-10 и IFN- γ в сыворотке мышей в каждой группе; и (4) патологический анализ и бальная оценка ткани почки мышей в каждой группе.

1) Определение содержания белка в моче мышей

В данном эксперименте мочу мышей отбирали посредством способа на основе рефлекса при поднятии хвоста, и концентрацию белка в моче мышей определяли с использованием набора для выявления белка в моче (способ СВВ, NanJing JianCheng Bioengineering Institute, №C035-2-1). Во время патогенеза красной волчанки у мышей MRL/lpr происходило повреждение почки из-за отложения антител против дцДНК (двухцепочечная ДНК), которое, в свою очередь, приводило к пониженной функции клубочковой фильтрации и способности к реабсорбции, и к повышенной концентрации белка в моче. По мере прогрессирования волчаночного нефрита у мышей MRL/lpr уровень белка в моче мышей постепенно увеличивался бы. Определение уровня белка в моче мышей, осуществляемое каждые две недели, показало то, что исходно не было значимого различия в уровне белка в моче среди данных групп, но, по мере продвижения данного эксперимента, уровень белка в моче мышей в контрольной группе MRL/lpr (модельная контрольная группа) постепенно возрастал и был значимо выше, чем уровень в нормальной группе, указывая на то, что мыши MRL/lpr страдают тяжелым спонтанным повреждением почек из-за отложения аутоантител. Среднее содержание белка в моче мышей в группах с введением 1 мг/кг и 3 мг/кг D2-60-b-T3E было ниже, чем содержание в модельной контрольной группе, и демонстрировало дозозависимую связь, но не было статистического различия между группами введения и модельной контрольной группой из-за больших индивидуальных различий в данных. Данные показаны на ФИГ. 10.

2) Определение содержания антител IgM и IgG против двухцепочечной ДНК в сыворотке

Содержание антител IgG и IgM против двухцепочечной ДНК (анти-дцДНК) в сыворотке определяли способом ELISA. Обратитесь к инструкциям набора ELISA (Alpha Diagnostic, №5120 и №5130) относительно конкретных методик. Среднее содержание антител IgG и IgM против дцДНК в сыворотке мышей в группе с введением 3 мг/кг D2-60-b-T3E было значимо ниже, чем содержание в модельной контрольной группе (P меньше 0,01), и не было статистически значимого различия между группой 1 мг/кг и модельной контрольной группой, хотя содержание IgG и IgM в группе 1 мг/кг имело тенденцию к тому, чтобы быть ниже, чем в модельной контрольной группе. Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 11А и 11В.

3) Влияние D2-60-b-T3E на функцию почек мышей MRL/lpr

Содержание сывороточного креатинина и азота мочевины крови в сыворотке мышей в конце эксперимента выявляли с использованием набора для определения креатинина (CRE) (NanJing JianCheng Bioengineering Institute, №C011-2-1) и набора для определения азота мочевины крови (BUN) (NanJing JianCheng Bioengineering Institute, №C013-2-1).

Азот мочевины крови и креатинин представляют собой метаболические продукты человеческих белков и мышц, соответственно, и почка представляет собой конечный выделительный орган. После нарушения почечной функции азот мочевины крови и креатинин в сыворотке не могут эффективно выделяться, и концентрация азота мочевины крови (BUN) и сывороточного креатинина (CRE) постепенно повышается из-за удерживания. Следовательно, клинически уровни BUN и CRE в сыворотке представляют собой главные индикаторы функции почки. Содержание сывороточного креатинина (CRE) и азота мочевины крови (BUN) в сыворотке мышей в контрольной группе MRL/lpr (модельная контрольная группа) значимо возрастало по сравнению с содержанием у нормальных мышей (P меньше 0,0001), свидетельствуя о том, что мыши в модельной группе MRL/lpr имеют функциональное повреждение почки.

Содержание креатинина в сыворотке мышей в группах с введением 1 мг/кг и 3 мг/кг было значимо ниже, чем содержание в модельной контрольной группе (P меньше 0,01 и P меньше 0,0001), указывая на то, что почечная функция мышей MRL/lpr может быть в определенной степени улучшена. Кроме того, содержание креатинина в сыворотке мышей в группе введения 3 мг/кг было значимо ниже, чем содержание в группе введения 1 мг/кг. Содержание азота мочевины крови в сыворотке мышей в группе введения 3 мг/кг также было значимо ниже, чем

содержание в модельной контрольной группе (P меньше 0,05), указывая то, что D2-60-b-T3E в дозировке 3 мг/кг может обращать спонтанное повреждение почек мышей MRL/lpr. Данные результаты показаны на ФИГ. 12A и 12B.

4) Влияние D2-60-b-T3E на содержание IL-6, IL-10 и INF- γ в сыворотке мышей MRL/lpr

Содержание цитокинов INF- γ , IL-6 и IL-10 в сыворотке определяли посредством способа ELISA.

Содержание IL-6 и INF- γ в сыворотке мышей в контрольной группе MRL/lpr (модельная группа) было значимо повышенным по сравнению с содержанием нормальных мышей (P меньше 0,0001). Содержание IL-6 в сыворотке мышей в группе введения 3 мг/кг было значимо ниже, чем содержание в модельной контрольной группе и в группе введения 1 мг/кг (P меньше 0,0001), и демонстрировало дозозависимую связь. Содержание INF- γ в сыворотке мышей в группе введения 3 мг/кг было значимо ниже, чем содержание в модельной контрольной группе (P меньше 0,01). Данные результаты показаны на ФИГ. 13A и 13B.

Содержание IL-10 в сыворотке мышей в контрольной группе MRL/lpr (модельная контрольная группа) было значимо пониженным по сравнению с содержанием нормальных мышей (P меньше 0,0001). Содержание IL-10 в сыворотке мышей в группе введения 3 мг/кг D2-60-b-T3E было значимо выше, чем содержание в модельной контрольной группе (P меньше 0,001). Результаты показаны на ФИГ. 14.

5) Влияние D2-60-b-T3E на поражения почек мышей MRL/lpr

В конце эксперимента левую почку мыши фиксировали в 4% параформальдегиде, заливали в парафин, получали срезы и затем окрашивали H&E (гематоксилин и эозин). Указанный срез наблюдали под микроскопом и подвергали патологической бальной оценке для градации и бальной оценки патологических повреждений клубочков, интерстициальной ткани почки, кровеносного сосуда и тому подобного. Критерии бальной оценки показаны в Таблице 24.

Таблица 24. Критерии оценки патологии почек в баллах

| Балл | Гломерулонефрит | Интерстициальный нефрит | Воспаление кровеносных сосудов |
|------|---|-----------------------------------|--|
| 1+ | Очаговая, легкая или ранняя гиперплазия | 1-3 очага (5-10 клеток) моноцитов | Моноциты вокруг почечной лоханки/кровеносных сосудов |
| 2+ | Многоочаговая | Легкая инфильтрация | Инфильтрация моноцитов |

| | | | |
|----|---|---|---|
| | гиперплазия с увеличенным количеством стромальных и воспалительных клеток | моноцитов вокруг одиночной трубочки; выделенные атрофические трубочки | вокруг больших артерий; очаги моноцитов из 10-20 клеток вокруг междольковых артерий |
| 3+ | Диффузная гиперплазия | Более обширная инфильтрация с большими трубчатыми атрофическими поражениями | Более обширные моноцитарные поражения вокруг маленьких артериальных ветвей |
| 4+ | Обширный склероз/серповидная форма; протеинурия | Обширная инфильтрация моноцитов между трубочками; обширный атрофический некроз трубочек | Инфильтрация моноцитов в окружающую паренхиму/участие большинства кровеносных сосудов/ васкулит |

Мыши в контрольной группе MRL/lpr (модельная контрольная группа) демонстрировали тяжелые патологические повреждения клубочков, почечной интерстициальной ткани и кровеносного сосуда в почке со склерозом клубочка и частичной впадиной внутрь, массивной инфильтрацией клеток в околососудистые и интерстициальные области и тяжелой опухолью и гиперплазией клубочков. Баллы почечной патологии мышей в контрольной группе MRL/lpr (модельная контрольная группа) были значимо повышены по сравнению с баллами нормальных мышей (P меньше 0,001), свидетельствуя о том, что мыши в модельной контрольной группе имеют значимые почечные поражения.

Патологические повреждения клубочка, интерстициальной ткани почки и кровеносного сосуда мышей в группах введения в определенной степени облегчались. Баллы почечной патологии мышей в группах введения 1 мг/кг и 3 мг/кг были значимо ниже, чем баллы модельной контрольной группы (P меньше 0,05 и P меньше 0,0001), указывая то, что D2-60-b-T3E может значимо снижать спонтанные почечные поражения у мышей MRL/lpr. Результаты показаны на ФИГ. 15.

Примеры-препараты

20 ГФ – гель-фильтрация:

Это способ осуществления анализа разделения раствора по относительной связи между размером пор геля и размером молекулярного клубка образца полимера. ГФ% (процентная доля содержания мономера ГФ) = A мономера / A общая $\times 100\%$ (A мономера представляет площадь пика главного пика мономера в

образце, и A общая представляет сумму площадей всех пиков). $\Delta\text{ГФ}\% = \text{ГФ}\%$ препарата перед принудительной деградацией - $\text{ГФ}\%$ препарата после принудительной деградации.

5 Прибор для измерения ГФ: Agilent 1260; колонка: Waters, XBrige ВЕН200Å SEC (300 × 7,8 мм 3,5 мкм).

NR-CE капиллярный гель-электрофорез:

Это способ помещения геля в капилляр в качестве поддерживающей среды для электрофореза и осуществления разделения согласно молекулярной массе образца при определенном напряжении.

10 $\text{NR-CE}\% = A \text{ главного пика} / A \text{ общая} \times 100\%$ (A главного пика представляет площадь главного пика легкой цепи + площадь главного пика тяжелой цепи, и A общая представляет сумму площадей всех пиков). $\Delta\text{NR-CE}\% = \text{NR-CE}\%$ препарата перед принудительной деградацией - $\text{NR-CE}\%$ препарата после принудительной деградации.

15 Прибор для определения CE: Beckman модель plus800

iCIEF капиллярная изоэлектрофокусировка с визуализацией:

Это методика разделения согласно различиям изоэлектрических точек (pI) белков.

20 $\text{iCIEF}\% = \text{площадь нейтрального пика} / \text{общая площадь} \times 100\%$ (общая площадь представляет сумму площадей кислотных, нейтральных и основных пиков). $\Delta\text{iCIEF}\% = \text{iCIEF}\%$ препарата перед принудительной деградацией - $\text{iCIEF}\%$ препарата после принудительной деградации.

Изготовитель прибора для определения iCIEF: simple protein, модель: muarice.

25 Определение осмотического давления:

Для определения осмотического давления используется способ точки заморзания. Точка заморзания раствора определяется посредством применения высокочувствительного температурочувствительного элемента на основе пропорциональной связи между значением впадины точки заморзания и молярной концентрацией раствора и затем превращения в осмотическое давление через количество электричества. Изготовитель прибора: Loser, модель: OM815.

Слитый белок

35 Слитым белком, используемым в следующих примерах, был D2-60-b-T3E. Концентрацию данного слитого белка рассчитывали на основе концентрации белка. Прибор для измерения концентрации белка: спектрофотометр, работающий

в ультрафиолетовой-видимой области; модель: Nano Drop oneC; длина оптического пути: 1 мм.

Пример препарата 1. Скрининг pH и буферной системы

5 Готовили препараты, содержащие буферные системы, показанные в Таблице 25, 30 мг/мл слитого белка, 80 мг/мл сахарозы и 0,2 мг/мл полисорбата 80 (PS80). Исследование принудительной деградации (стояние при 40°C в течение 1 месяца и встряхивание при 25°C при 300 об./мин в течение 6 суток) проводили на образцах, и влияние разных буферных систем на стабильность слитого белка
10 оценивали с использованием ГФ и iCIEF.

Результаты показаны в Таблице 25. Данные ГФ показывают то, что после 6 суток встряхивания чистоты мономеров препаратов, содержащих His-HCl, были лучше, чем чистоты препаратов, содержащих AA или SA. Данные iCIEF не демонстрируют значимого различия между данными группами после встряхивания.
15 После одного месяца стояния при 40°C препарат, содержащий AA (pH 5,5), и препараты, содержащие His-HCl (pH 6,0-6,5), превосходили другие группы. В заключение, буферная система предпочтительно представляет собой AA и His-HCl, и интервал pH предпочтительно составляет 5,5-6,5.

Таблица 25. Результаты по скринингу pH и буферной системы

| Группа | Буферная система | Условия | Δ ГФ% | Δ iCIEF% |
|--------|-----------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 1 | 10 mM AA, pH 5,0 | Встряхивание D6 | 2,3 | 1,6 |
| | | 40°C M1 | 8,9 | 19,6 |
| 2 | 10 mM AA, pH 5,5 | Встряхивание D6 | 3,7 | -0,5 |
| | | 40°C M1 | 7,3 | 15,4 |
| 3 | 10 mM SA, pH 5,5 | Встряхивание D6 | 5,6 | 0,9 |
| | | 40°C M1 | 8,8 | 21,1 |
| 4 | 10 mM His-HCl, pH 5,5 | Встряхивание D6 | 1,8 | 1,0 |
| | | 40°C M1 | 8,8 | 17,3 |
| 5 | 10 mM His-HCl, pH 6,0 | Встряхивание D6 | 1,3 | 0,4 |
| | | 40°C M1 | 7,6 | 14,7 |
| 6 | 10 mM His-HCl, pH 6,5 | Встряхивание D6 | 1,6 | 0,4 |
| | | 40°C M1 | 6,6 | 15,7 |

AA обозначает уксусную кислоту-ацетат натрия; SA обозначает янтарную кислоту-сукцинат натрия; His-HCl обозначает гистидин-гистидина гидрохлорид;

Встряхивание D6: встряхивание при 25°C при 300 об./мин в течение 6 суток; 40°C M1: стояние при 40°C в течение 1 месяца. То же самое применяли позднее.

5

Пример препарата 2. Скрининг концентрации белка

Получали препараты, содержащие 10 мМ буфер AA (pH 5,5), слитый белок при концентрациях белка, показанных в Таблице 26, 80 мг/мл сахарозы и 0,2 мг/мл PS80. Проводили исследование принудительной деградации (стояние при 40°C в течение 1 месяца) на образцах, и влияние разных концентраций концентраций белка на стабильность слитого белка оценивали с использованием ГФ, NR-CE и iCIEF.

Результаты показаны в Таблице 26. При концентрации белка 10-30 мг/мл не было значимого различия во внешнем виде и чистоте во время стояния при высокой температуре, и все изменения чистоты находились в пределах приемлемого интервала. Это указывает на то, что в пределах данного концентрационного интервала образцы слитого белка имеют хорошую стабильность.

15

Таблица 26. Результаты скрининга концентрации белка

| Группа | Концентрация (мг/мл) | Условия | Δ ГФ% | Δ NR-CE% | Δ iCIEF% |
|--------|----------------------|---------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 30 | 40°C M1 | 7,3 | 3,2 | 15,4 |
| 2 | 10 | 40°C M1 | 6,7 | 3,5 | 14,9 |

20

Пример препарата 3. Препараты, содержащие разные сахара

Препараты белка против IL-2, содержащие разные виды сахаров, 10 мг/мл белка и 0,2 мг/мл PS80, готовили в 10 мМ буфере AA, pH 5,5. Конкретные виды сахаров и их концентрации были следующими:

25

- 1) 80 мг/мл сахарозы
- 2) 80 мг/мл трегалозы

30

Каждый из препаратов фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Образцы встряхивали при 25°C при 300 об./мин, и их стабильность оценивали с использованием ГФ. Результаты показаны в Таблице 27: препараты, содержащие сахарозу, были более стабильными, чем препарат, содержащий трегалозу.

Таблица 27. Результаты скрининга сахаров

| Сахар | Условия | Δ ГФ% |
|--------------------|-----------------|--------------|
| | | Мономер |
| 80 мг/мл сахарозы | Встряхивание D9 | 2,1 |
| 80 мг/мл трегалозы | Встряхивание D9 | 4,1 |

Пример препарата 4. Скрининг концентрации поверхностно-активного вещества

Получали препараты, содержащие 30 мг/мл слитого белка, 80 мг/мл сахарозы, поверхностно-активные вещества, показанные в Таблице 28, и 10 мМ буфер АА (рН 5,5). Образцы подвергали эксперименту по принудительной деградации (стояние при 40°C в течение 1 месяца), и стабильность образцов оценивали с использованием ГФ и iCIEF. Результаты показаны в Таблице 28. Данные результаты демонстрируют то, что не было значимого изменения чистоты мономера белка препаратов, содержащих полоксамер 188 (PF68).

Таблица 28. Результаты скрининга вида и концентрации поверхностно-активного вещества для слитого белка

| Группа | Поверхностно-активное вещество | Условия | Δ ГФ% | Δ iCIEF% |
|--------|--------------------------------|---------|--------------|-----------------|
| 1 | 0,1 мг/мл PF68 | 40°C M1 | 7,0 | 17,1 |
| 2 | 0,2 мг/мл PF68 | 40°C M1 | 7,4 | 20,9 |
| 3 | 0,4 мг/мл PF68 | 40°C M1 | 6,9 | 19,9 |
| 4 | 0,6 мг/мл PF68 | 40°C M1 | 7,0 | 18,9 |

Пример препарата 5. Скрининг поверхностно-активного вещества

Получали препараты белка против IL-2, содержащие 80 мг/мл сахарозы, разные виды поверхностно-активных веществ и 30 мг/мл белка с 10 мМ His-HCl, рН 6,0, в качестве буферной системы. Каждый из данных препаратов фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Образцы отбирали и подвергали долговременному исследованию при 4°C, и стабильность образцов оценивали согласно их внешнему виду и с использованием ГФ. Результаты данного исследования показаны в Таблице 29. Конкретные использованные поверхностно-активные вещества были следующими:

- 1) 0,6 мг/мл PS80
- 2) 0,6 мг/мл PF68

Экспериментальные результаты демонстрируют то, что после хранения при 4°C в течение 13 месяцев с той же самой концентрацией поверхностно-активного вещества не было значимо различия в чистоте мономера ГФ между группой PF68 и группой PS80. С той же самой концентрацией поверхностно-активного вещества группа PS80 была лучше, чем группа PF68 по внешнему виду. Согласно приведенным выше данным PS80 является предпочтительным в качестве поверхностно-активного вещества для препаратов белка против IL-2.

Таблица 29. Результаты скрининга видов поверхностно-активных веществ для белка против IL-2

| Группа | Условия | Внешний вид | ГФ% | ΔГФ% |
|--------|---------|---------------------|---------|------|
| | | | Мономер | |
| 1 | D0 | Чистый и прозрачный | 97,1 | N/A |
| | 4°C M13 | Чистый и прозрачный | 96,3 | -0,9 |
| 2 | D0 | Чистый и прозрачный | 97,2 | N/A |
| | 4°C M13 | Мелкие частицы | 96,2 | -1,0 |

Пример препарата 6. Скрининг концентрации поверхностно-активного вещества

Препараты белка против IL-2, содержащие 87 мг/мл сахарозы, PS80 в разных концентрациях и 30 мг/мл белка, получали с 10 мМ His, pH 6,0, в качестве буферной системы. Конкретные использованные концентрации PS80 были следующими:

- 1) 0,4 мг/мл PS80
- 2) 0,8 мг/мл PS80
- 3) 1,5 мг/мл PS80

Каждый из препаратов фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Проводили анализ замораживанием-оттаиванием, и оценивали стабильность образцов согласно их внешнему виду с использованием ГФ. Результаты данного анализа показаны в Таблице 30. Результаты MFI анализа замораживанием-оттаиванием демонстрируют то, что по мере того, как концентрация PS80 возрастает, число частиц, больших или равных 2 мкм, уменьшается.

Таблица 30. Результаты скрининга концентрации поверхностно-активного вещества

| Группа | Условия | Внешний вид | MFI (≥ 2 мкм) |
|--------|---------|-------------|---------------------|
|--------|---------|-------------|---------------------|

| | | | |
|---|------|---------------------|-----|
| 1 | FT5C | Чистый и прозрачный | 180 |
| 2 | FT5C | Чистый и прозрачный | 129 |
| 3 | FT5C | Чистый и прозрачный | 100 |

FT5C: 5 циклов замораживания-оттаивания и так далее.

Пример препарата 7. Скрининг вспомогательного вещества

5 Готовили препараты белка против IL-2, содержащие разные вспомогательные вещества, 10 мг/мл белка и 0,8 мг/мл PS80 в 10 мМ His-HCl буфере, pH 6,0. Конкретные вспомогательные вещества были следующими:

- 1) 36 мг/мл сахарозы
- 2) 36 мг/мл сахарозы и 12 мг/мл глицина

10 Каждый из препаратов фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Образцы подвергали анализу замораживанием-оттаиванием, и проводили оценку согласно их внешнему виду и с использованием DLS (динамическое светорассеяние) и MFI. Результаты показаны в Таблице 31. Данные по внешнему виду, DLS и MFI не демонстрируют значимого различия между данными группами. Давая подкожные препараты, лучше всего 15 контролировать осмотическое давление для того, чтобы делать данные препараты изотоничными таким образом, что они являются менее раздражающими во время инъекции. Следовательно, концентрации вспомогательного вещества подвергали скринингу для определения изотоничной концентрации. Только с 36 мг/мл сахарозы осмотическое давление было относительно низким. 36 мг/мл сахарозы 20 плюс 12 мг/мл глицина или 40 мг/мл сахарозы плюс 10 мг/мл глицина, или 45 мг/мл сахарозы плюс 10 мг/мл глицина, или 50 мг/мл сахарозы плюс 9 мг/мл глицина могут поддерживать осмотическое давление в пределах изотонического интервала.

Таблица 31. Результаты скрининга вспомогательного вещества

| Группа | Условия | Внешний вид | DLS (нм) | MFI (≥ 2 мкм) |
|--------|---------|---------------------|----------|---------------------|
| 1 | D0 | Чистый и прозрачный | 13,2 | 124 |
| | FT1C | Чистый и прозрачный | 14,8 | 301 |
| 2 | D0 | Чистый и прозрачный | 13,0 | 126 |
| | FT1C | Чистый и прозрачный | 13,1 | 369 |

25

Пример препарата 8. Скрининг разной ионной силы

Готовили препараты белка против IL-2, содержащие 36 мг/мл сахарозы, 12 мг/мл глицина, 0,8 мг/мл PS80 и 10 мг/мл белка с His-HCl, pH 6,0 в качестве буферной системы. Используемые конкретные разные ионные силы были следующими:

- 5 1) 10 мМ
 2) 5 мМ

Каждый из препаратов фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Проводили анализ замораживанием-оттаиванием, и стабильность образцов оценивали согласно их внешнему виду и с использованием ГФ. Результаты данного анализа показаны в Таблице 32. Данные результаты показывают отсутствие значимого различия во внешнем виде и на уровне ГФ между данными группами.

Таблица 32. Результаты скрининга разных ионных сил

| Группа | Условия | Внешний вид | ΔГФ% |
|--------|---------|---------------------|------|
| 1 | D0 | Чистый и прозрачный | 96,4 |
| | FT1C | Чистый и прозрачный | 96,5 |
| 2 | D0 | Чистый и прозрачный | 96,4 |
| | FT1C | Чистый и прозрачный | 96,5 |

15 **Пример препарата 9. Лиофилизированный препарат**

Готовили препараты белка против IL-2, содержащие 50 мг/мл сахарозы плюс 9 мг/мл глицина (группа 1) или 40 мг/мл сахарозы плюс 10 мг/мл глицина (группа 2), 0,8 мг/мл PS80 и 10 мг/мл белка с 10 мМ His-HCl, pH 6,0 в качестве буферной системы.

20 Указанный препарат фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Образец препарата лиофилизировали посредством программы лиофилизации, включающей предварительное замораживание, первичную сушку и вторичную сушку (данные параметры показаны в Таблице 33). После завершения программы лиофилизации закрытие крышкой

25 проводили под вакуумом. Затем указанный лиофилизированный препарат разводили водой для инъекции с образованием восстановленного раствора антитела против IL-2 с концентрацией белка 10 мг/мл. Проверяли различия во внешнем виде, чистоте NR-CE, чистоте ГФ и т.д. между препаратом до лиофилизации и разведенным лиофилизированным препаратом.

30 Экспериментальные результаты показаны в Таблице 34, и данные результаты показывают то, что препарат антитела против IL-2 сохранял хорошую стабильность как до, так и после лиофилизации.

Таблица 33. Программа лиофилизации для препарата антитела против IL-2

| Параметры процесса лиофилизации | Установленная температура (°C) | Установленное время (мин) | Время выдержки (мин) | Степень вакуума (Па) |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Предварительное замораживание | 5 | 10 | 60 | N/A |
| Предварительное замораживание | -45 | 50 | 60 | N/A |
| Первичная сушка | -25 | 120 | 3000 | 10 |
| Вторичная сушка | 25 | 60 | 1 | 10 |
| | 25 | 1 | 480 | 10 |

Таблица 34. Сравнение экспериментальных результатов для препаратов антитела против IL-2 до и после лиофилизации

| Группа | Условия стояния | Внешний вид | ГФ% | NR-CE% |
|--------|--|---------------------|---------|---------|
| | | | Мономер | Мономер |
| 1 | Препарат перед лиофилизацией | Чистый и прозрачный | 96,8 | 97,2 |
| | Разведенный лиофилизированный препарат | Чистый и прозрачный | 96,7 | 97,2 |
| 2 | Препарат перед лиофилизацией | Чистый и прозрачный | N/A | N/A |
| | Разведенный лиофилизированный препарат | Чистый и прозрачный | N/A | N/A |

5

Пример препарата 10. Лиофилизированный препарат

Готовили препарат белка против IL-2, содержащий 45 мг/мл сахарозы, 10 мг/мл глицина, 0,8 мг/мл PS80 и 10 мг/мл белка с 10 mM His-HCl, pH 6,0 или 5 mM His-HCl, pH 6,0 в качестве буферной системы.

10

Указанный препарат фильтровали и разливали по бутылкам, бутылки закрывали крышками и колпачками. Образец препарата лиофилизировали посредством программы лиофилизации, включающей предварительное замораживание, первичную сушку и вторичную сушку (данные параметры показаны в Таблице 35). После завершения программы лиофилизации осуществляли

закрытие крышкой под вакуумом. Затем лиофилизированный препарат разводили водой для инъекции с образованием восстановленного раствора антитела против IL-2 с концентрацией белка 10 мг/мл. Проверяли различия во внешнем виде, чистоте ГФ и т.д. между препаратом до лиофилизации и разведенным лиофилизированным препаратом. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 36, и данные результаты показывают то, что препарат антитела против IL-2 сохранял хорошую стабильность как до, так и после лиофилизации.

Таблица 35. Программа лиофилизации для препарата антитела против IL-2

| Параметры процесса лиофилизации | Установленная температура (°C) | Установленное время (мин) | Время выдержки (мин) | Степень вакуума (Па) |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Предварительное замораживание | 5 | 10 | 60 | N/A |
| Предварительное замораживание | -45 | 50 | 60 | N/A |
| Первичная сушка | -25 | 120 | 3000 | 10 |
| Вторичная сушка | 25 | 60 | 1 | 10 |
| | 25 | 1 | 480 | 10 |

Таблица 36. Сравнение экспериментальных результатов для препаратов антитела против IL-2 до и после лиофилизации

| Группа | Условия стояния | Внешний вид | ГФ% |
|-------------------|--|---------------------|---------|
| | | | Мономер |
| 1 (10 мМ, рН 6,0) | Препарат до лиофилизации | Чистый и прозрачный | 96,7 |
| | Разведенный лиофилизированный препарат | Чистый и прозрачный | 96,6 |
| 2 (5 мМ, рН 6,0) | Препарат до лиофилизации | Чистый и прозрачный | 96,4 |
| | Разведенный лиофилизированный препарат | Чистый и прозрачный | 96,5 |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок и буфер, где указанный слитый белок содержит IL-2 и антитело против IL-2, которые связаны ковалентно; при этом указанный буфер представляет собой гистидиновый буфер, ацетатный буфер или сукцинатный буфер;

предпочтительно указанный буфер представляет собой гистидиновый буфер или ацетатный буфер;

более предпочтительно указанный буфер представляет собой буфер на основе гистидина-гистидина гидрохлорида или буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой концентрация слитого белка составляет от 5 мг/мл до 50 мг/мл;

предпочтительно концентрация слитого белка составляет от 10 мг/мл до 30 мг/мл.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где указанная фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество;

предпочтительно указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер;

более предпочтительно указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, полисорбат 20 или полоксамер 188.

4. Фармацевтическая композиция по п. 3, в которой концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 мг/мл до 2 мг/мл;

предпочтительно концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где указанная фармацевтическая композиция содержит сахар;

предпочтительно указанный сахар представляет собой один или более чем один из сахарозы, маннита и трегалозы;

более предпочтительно указанный сахар представляет собой сахарозу.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, в которой концентрация сахара составляет от 20 мг/мл до 100 мг/мл;

предпочтительно концентрация сахара составляет от 30 мг/мл до 80 мг/мл;

более предпочтительно концентрация сахара составляет от 30 мг/мл до 50 мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит вспомогательное вещество; предпочтительно указанное вспомогательное вещество представляет собой глицин, метионин, пролин, гистидин, фенилаланин, гидрохлорид аргинина, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту или эдетат натрия; более предпочтительно указанное вспомогательное вещество представляет собой глицин.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой концентрация вспомогательного вещества составляет от 1 мг/мл до 30 мг/мл; предпочтительно концентрация вспомогательного вещества составляет от 5 мг/мл до 15 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, в которой концентрация буфера составляет от 5 мМ до 100 мМ;

предпочтительно концентрация буфера составляет от 5 мМ до 30 мМ;

более предпочтительно концентрация буфера составляет от 5 мМ до 10 мМ.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, в которой буфер имеет рН от 5,0 до 6,5;

предпочтительно буфер имеет рН от 5,5 до 6,0;

более предпочтительно буфер имеет рН 6,0.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, в которой антитело против IL-2 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи; причем переменная область тяжелой цепи имеет: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; переменная область легкой цепи имеет: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42;

предпочтительно переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

более предпочтительно антитело против IL-2 содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 166.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, в которой IL-2 слит, прямо или посредством линкера, с N-концом легкой цепи антитела против IL-2;

предпочтительно аминокислотный остаток в положении 3 IL-2 представляет собой E;

5 более предпочтительно указанный слитый белок содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 189.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, содержащая следующие компоненты:

- а) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка,
- б) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата или полоксамера,
- 10 в) от 30 мг/мл до 80 мг/мл сахарозы,
- д) от 1 мг/мл до 30 мг/мл глицина и
- е) от 5 мМ до 10 мМ буфера на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющего pH 6,0;

15 предпочтительно указанная фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

- а) от 10 мг/мл до 30 мг/мл указанного слитого белка,
- б) от 0,1 мг/мл до 0,8 мг/мл полисорбата 80,
- в) от 30 мг/мл до 50 мг/мл сахарозы,
- д) от 5 мг/мл до 15 мг/мл глицина и
- 20 е) от 5 мМ до 10 мМ буфера на основе гистидина-гистидина гидрохлорида, имеющего pH 6,0.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-13, где указанная композиция представляет собой жидкий препарат;

25 предпочтительно путь введения указанной композиции представляет собой подкожную, внутрикожную, внутривенную или внутримышечную инъекцию;

более предпочтительно путь введения указанной композиции представляет собой подкожную инъекцию.

30 15. Лиофилизированный препарат, где указанный лиофилизированный препарат может быть разведен с образованием фармацевтической композиции по любому из пп. 1-14.

16. Способ получения лиофилизированного препарата, включающий стадию осуществления лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-14.

35 17. Лиофилизированный препарат, где указанный препарат получен путем лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-14.

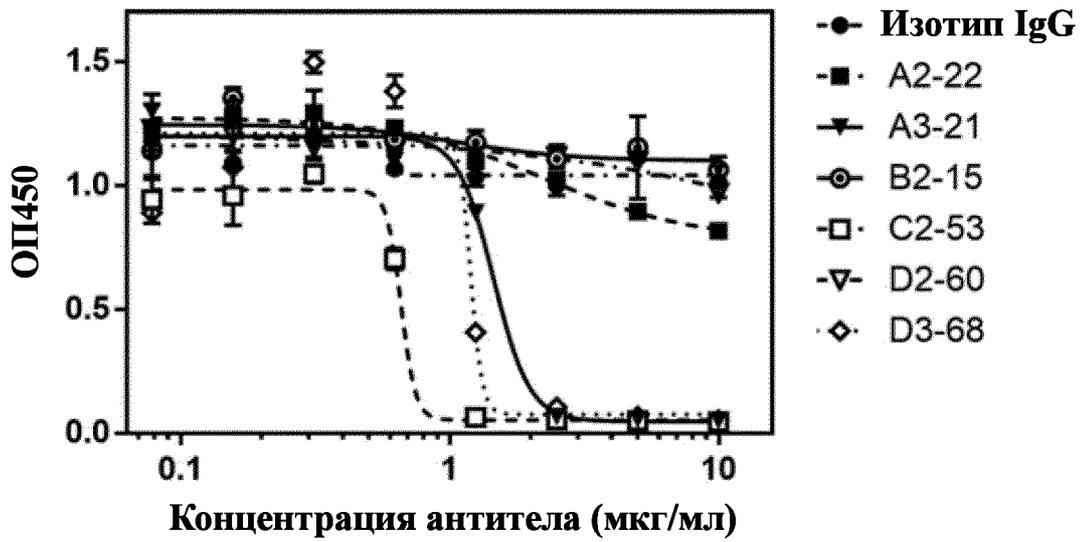
18. Восстановленный раствор, где указанный восстановленный раствор получают разведением лиофилизированного препарата по п. 15 или 17.

19. Продукт, содержащий контейнер, где указанный контейнер содержит фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-14, лиофилизированный препарат по любому из пп. 15 или 17, или восстановленный раствор по п. 18.

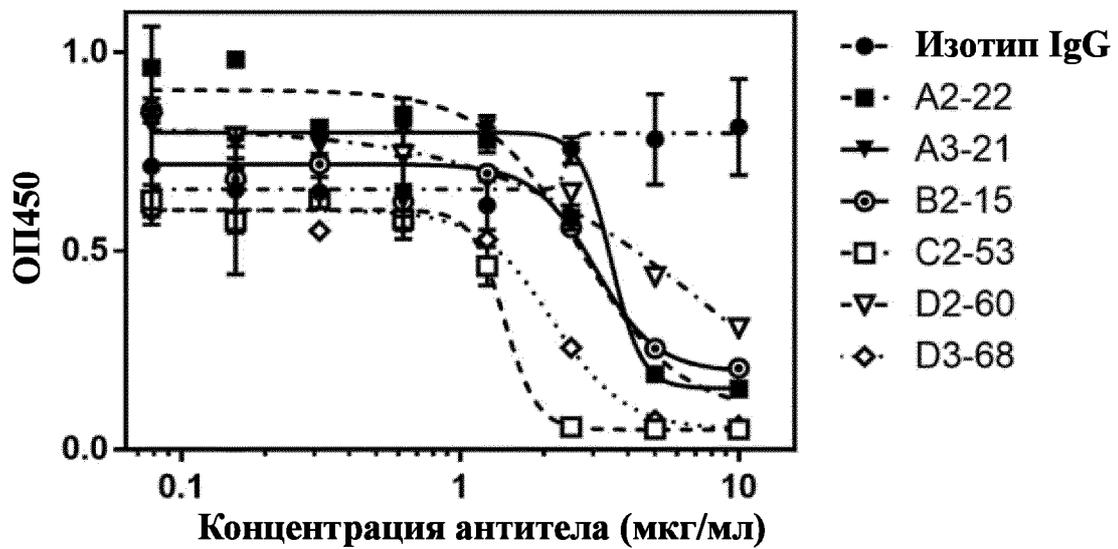
20. Способ лечения аутоиммунного заболевания или задержки прогрессирования аутоиммунного заболевания, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-14, лиофилизированного препарата по п. 15 или 17, восстановленного раствора по п. 18 или продукта по п. 19;

предпочтительно указанное аутоиммунное заболевание выбрано из любого одного или комбинации следующих: волчанка, заболевание «трансплантат против хозяина», васкулит, индуцированный вирусом гепатита С, диабет I типа, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, хроническое заболевание «трансплантат против хозяина» (GvHD), астма, дерматит, круговая алопеция, острое поражение легкого, сепсис, реактивный артрит и ревматоидный артрит.

1

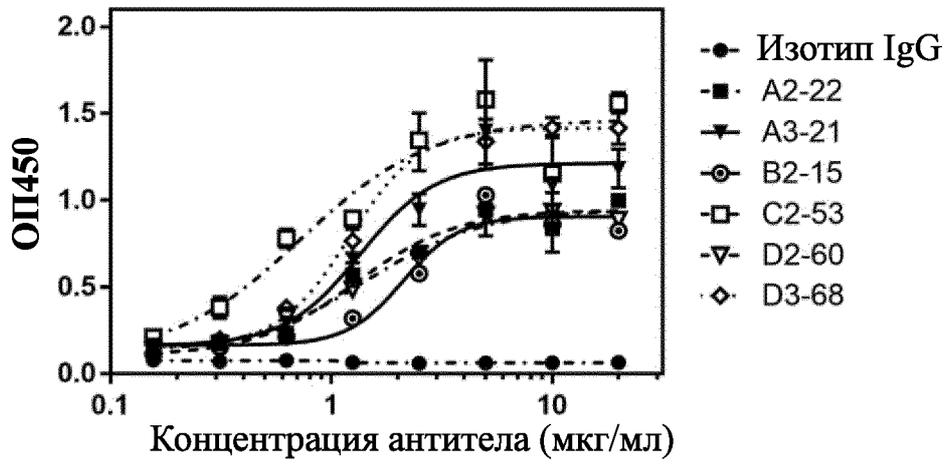


ФИГ. 1А



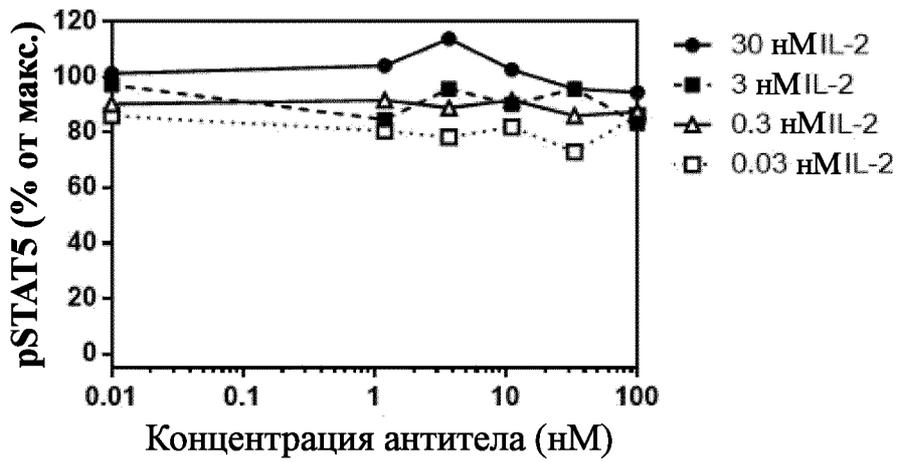
ФИГ. 1В

2



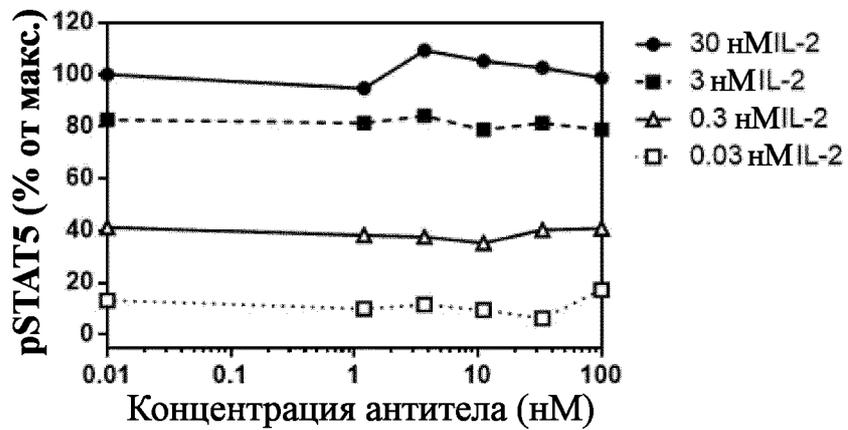
ФИГ. 2

Treg: изотип IgG1



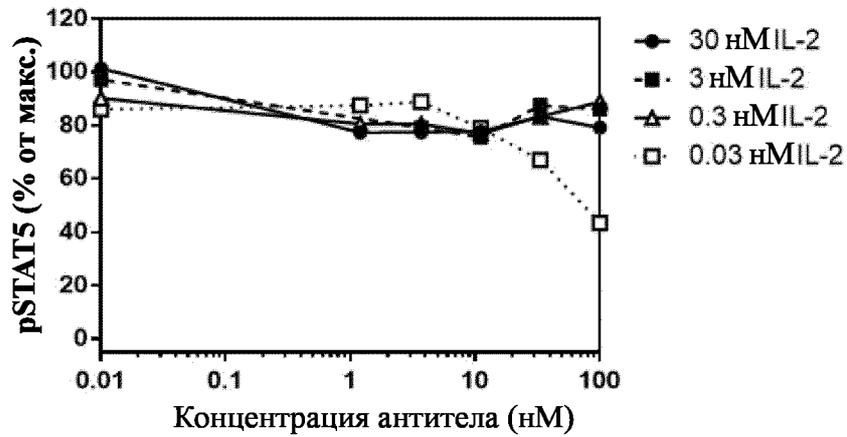
ФИГ. 3А

CD8: изотип IgG1



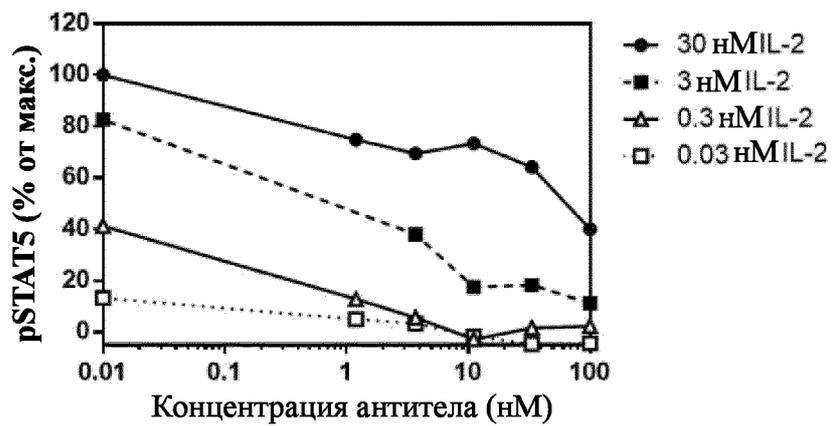
ФИГ. 3В

Treg: A3-21



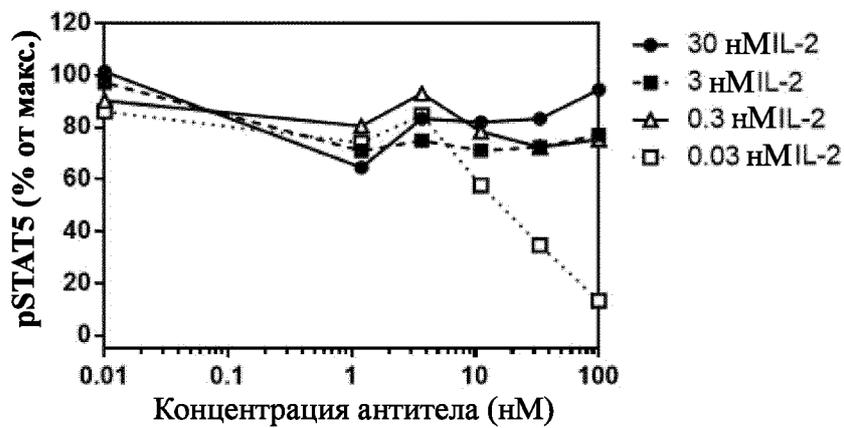
ФИГ. 3С

CD8: A3-21



ФИГ. 3D

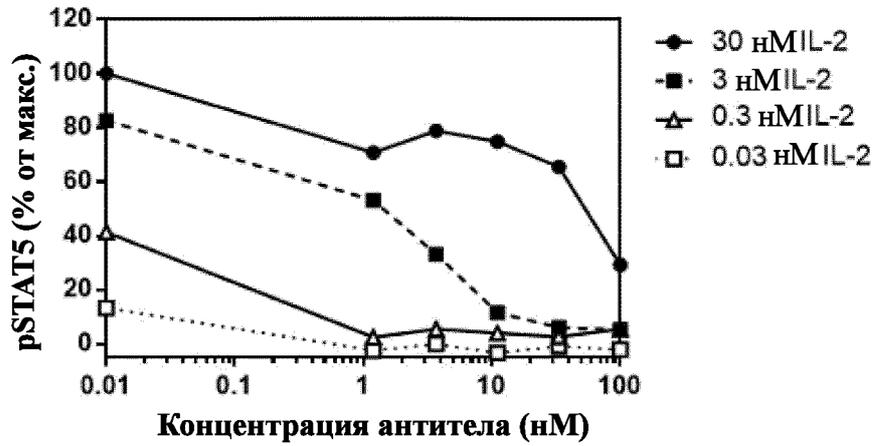
Treg: C2-53



ФИГ. 3Е

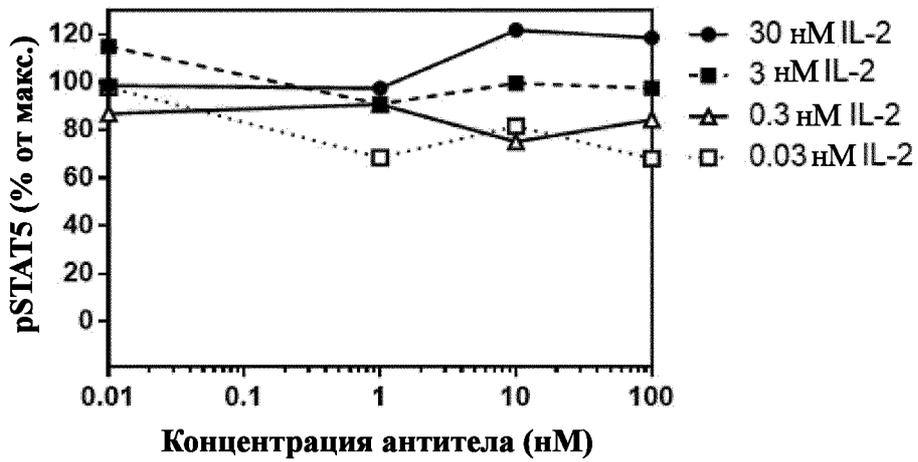
4

CD8: C2-53



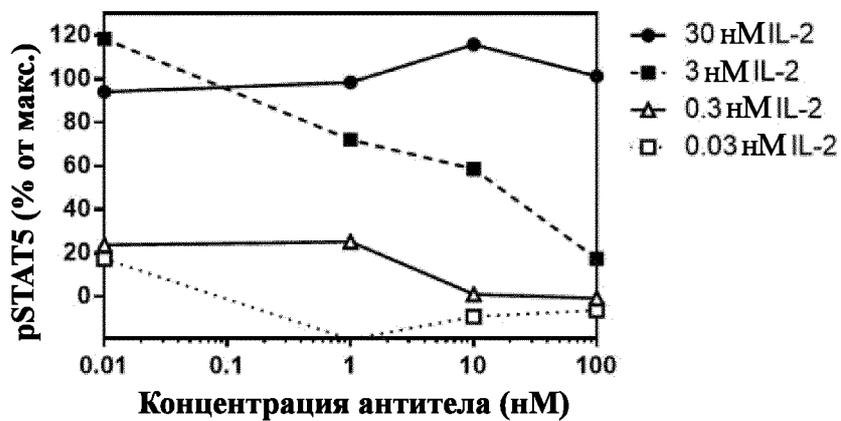
ФИГ. 3F

Treg: D3-68



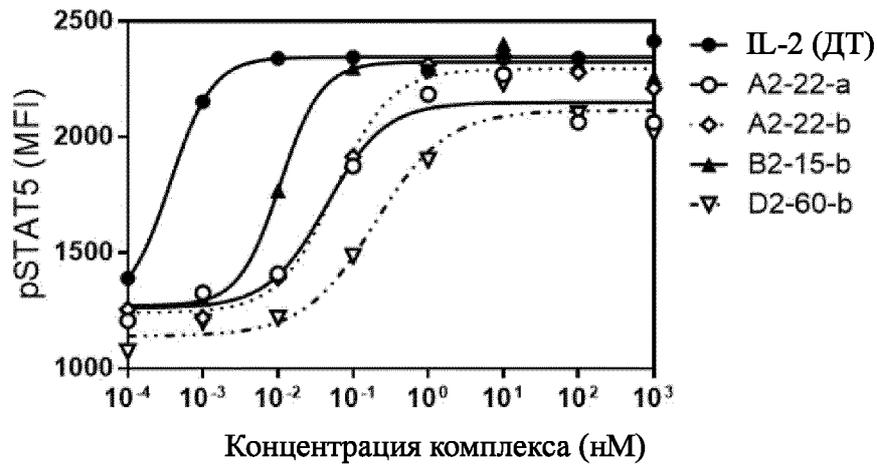
ФИГ. 3G

CD8: D3-68



ФИГ. 3H

Treg



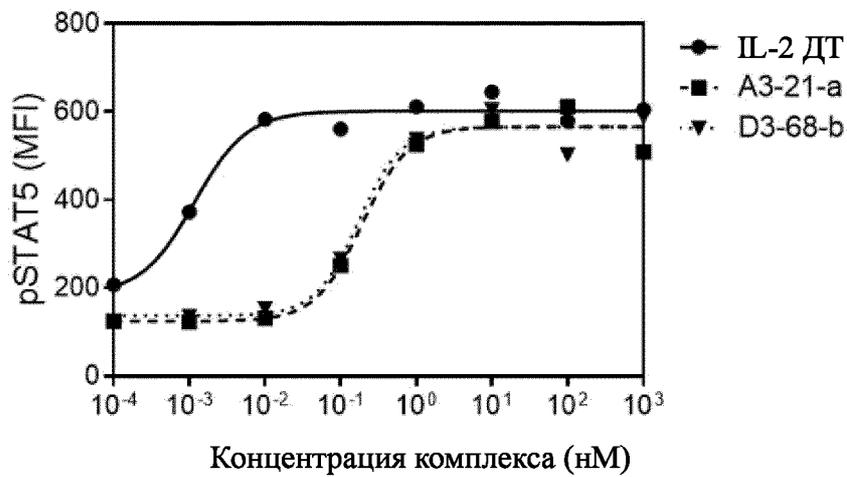
ФИГ. 4А

CD8+



ФИГ. 4В

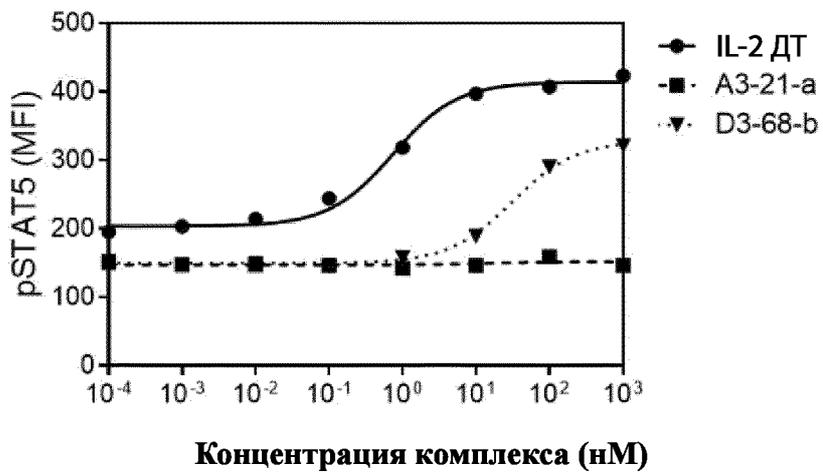
Treg



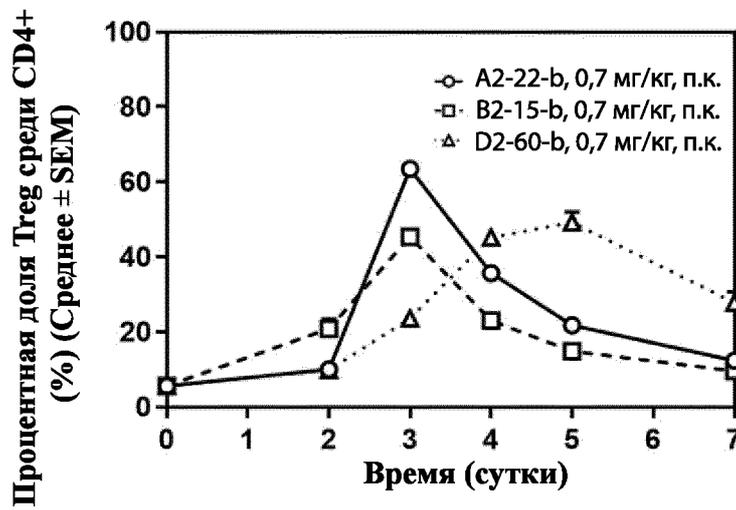
ФИГ. 4С

6

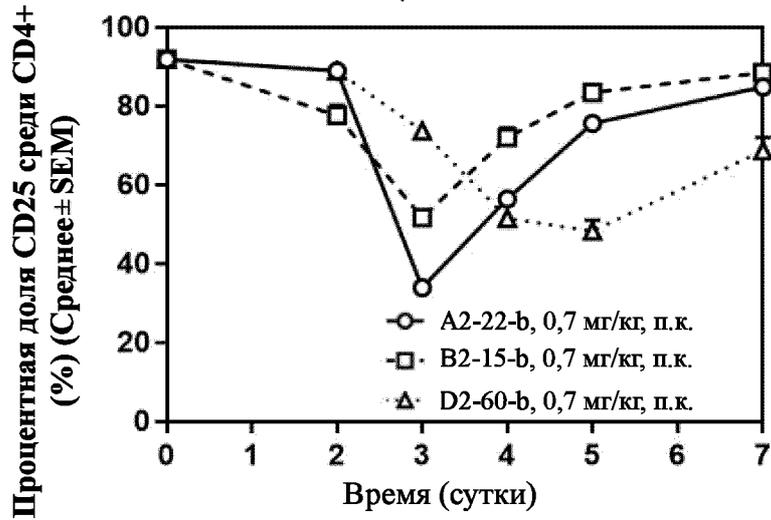
CD8+



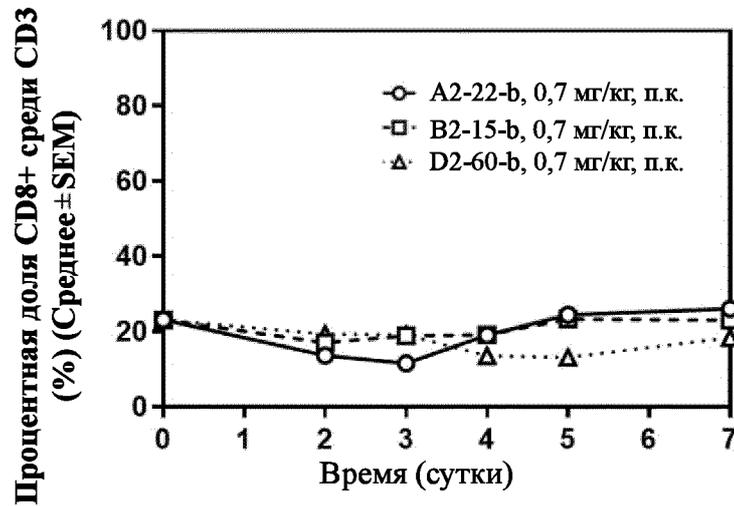
ФИГ. 4D



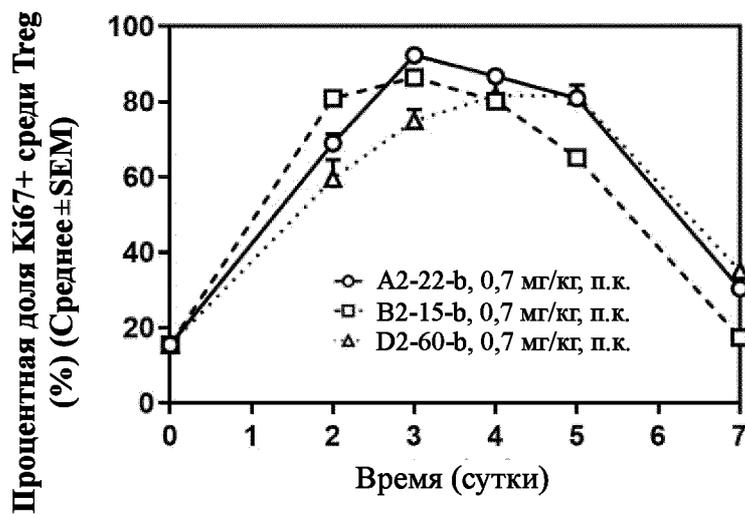
ФИГ. 5A



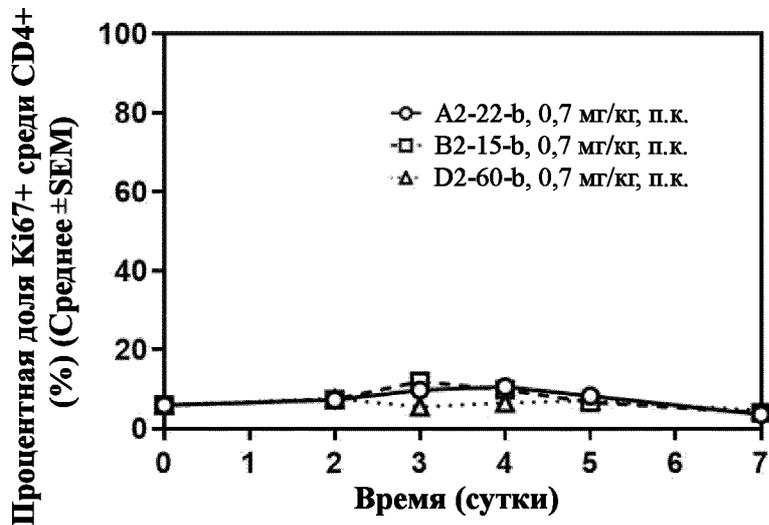
ФИГ. 5B



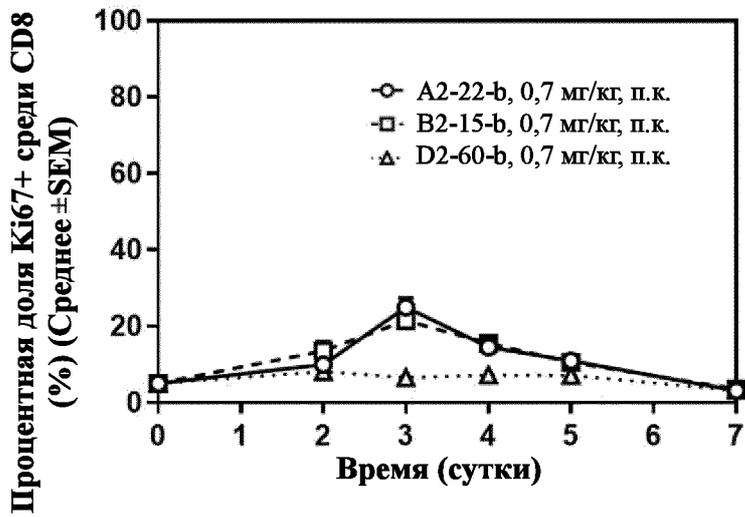
ФИГ. 5C



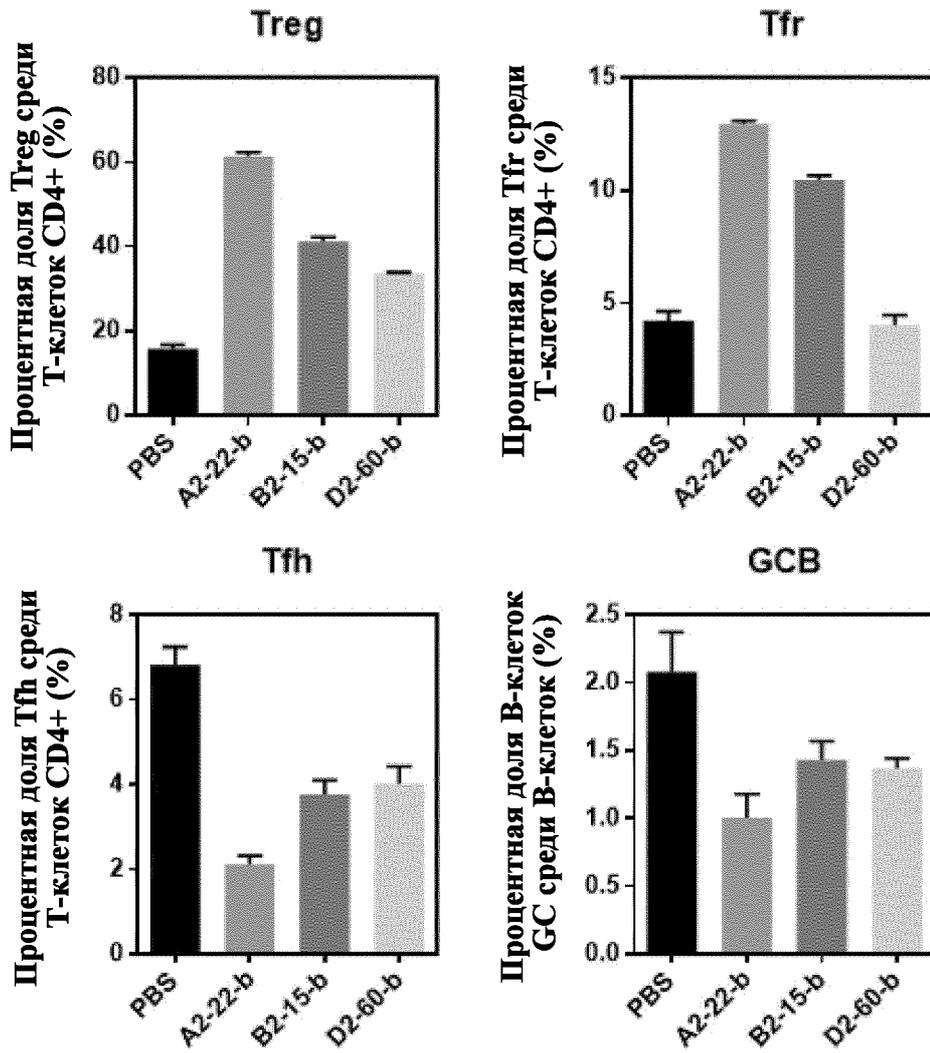
ФИГ. 5D



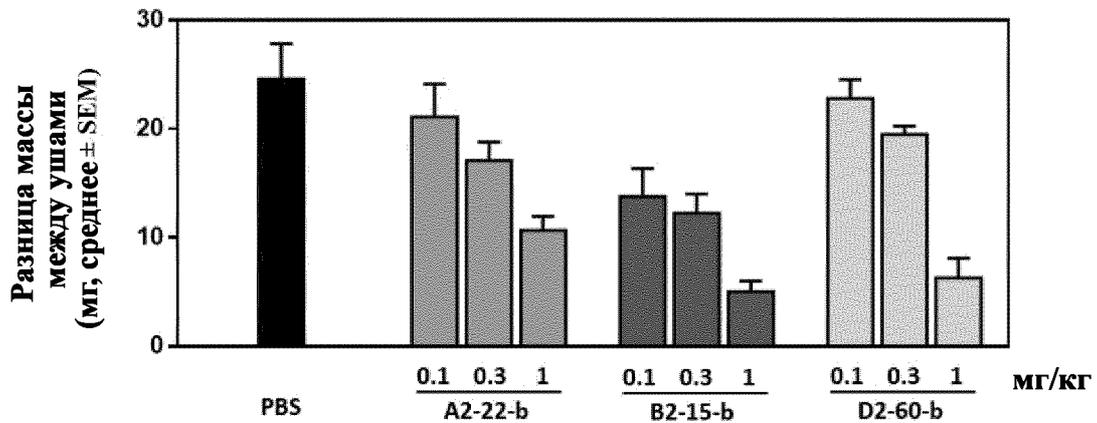
ФИГ. 5E



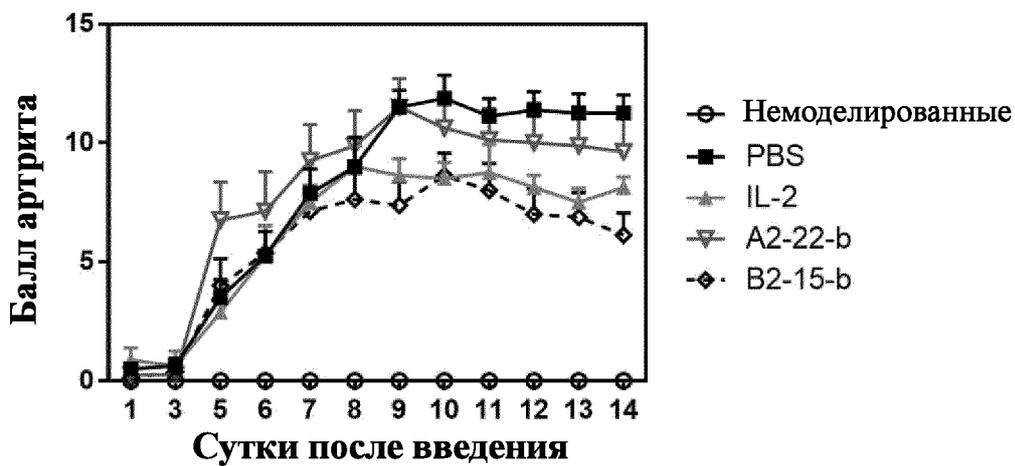
ФИГ. 5F



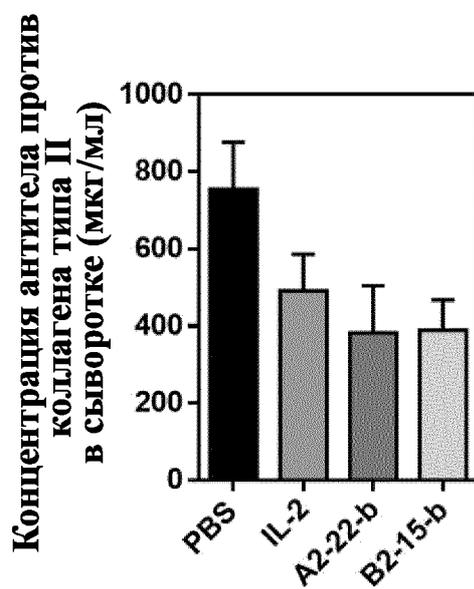
ФИГ. 6



ФИГ. 7

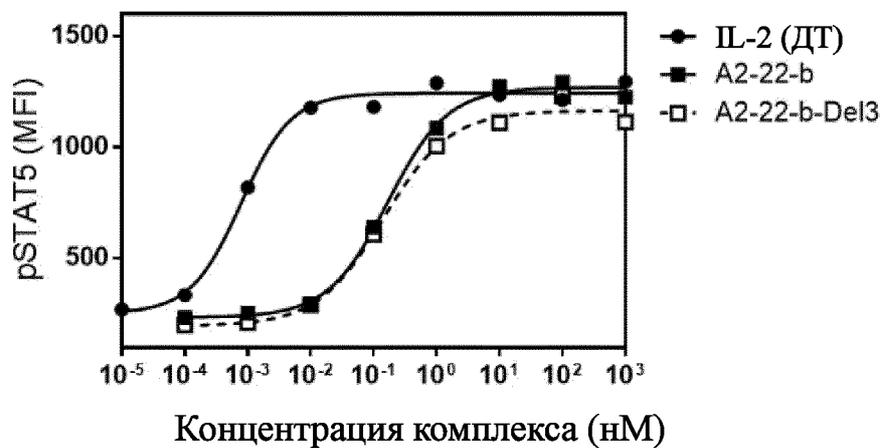


ФИГ. 8А

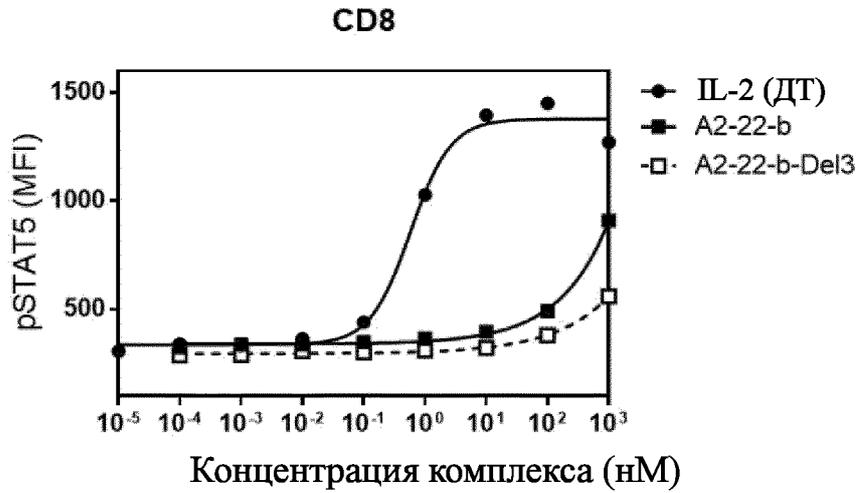


ФИГ. 8В

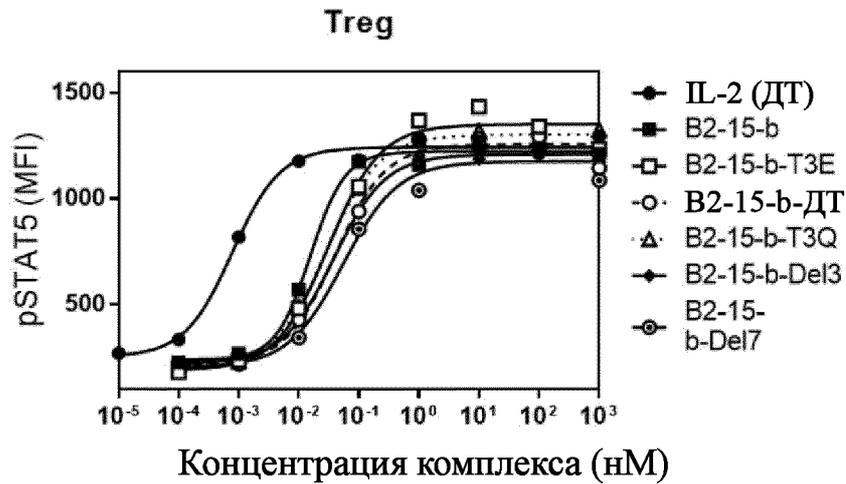
Treg



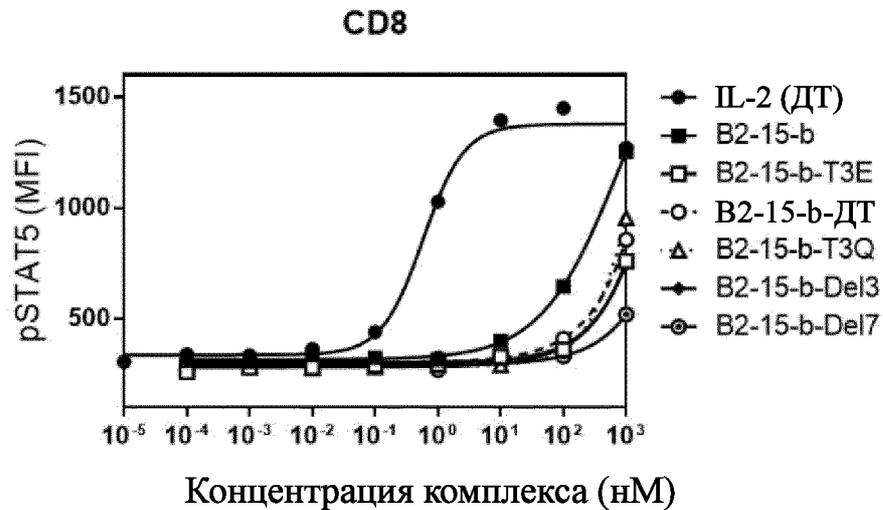
ФИГ. 9А



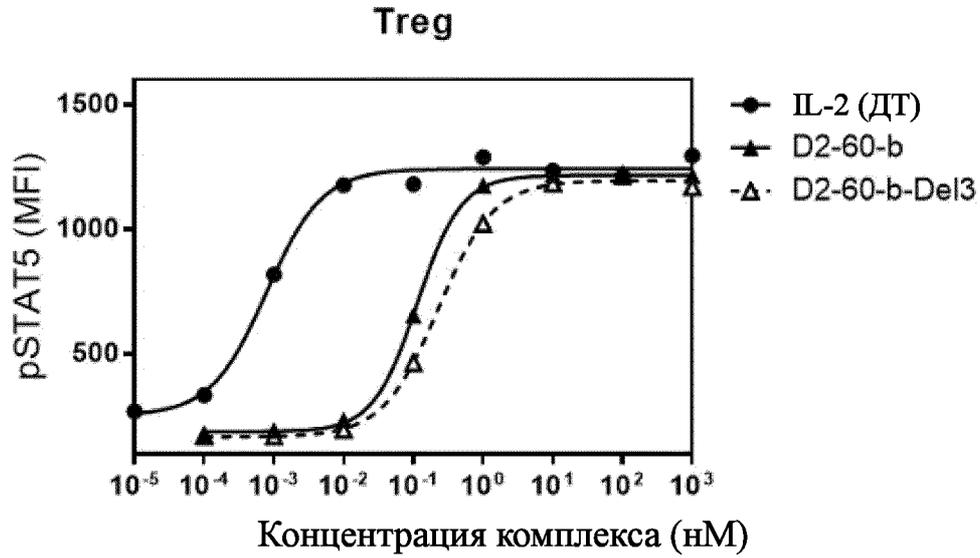
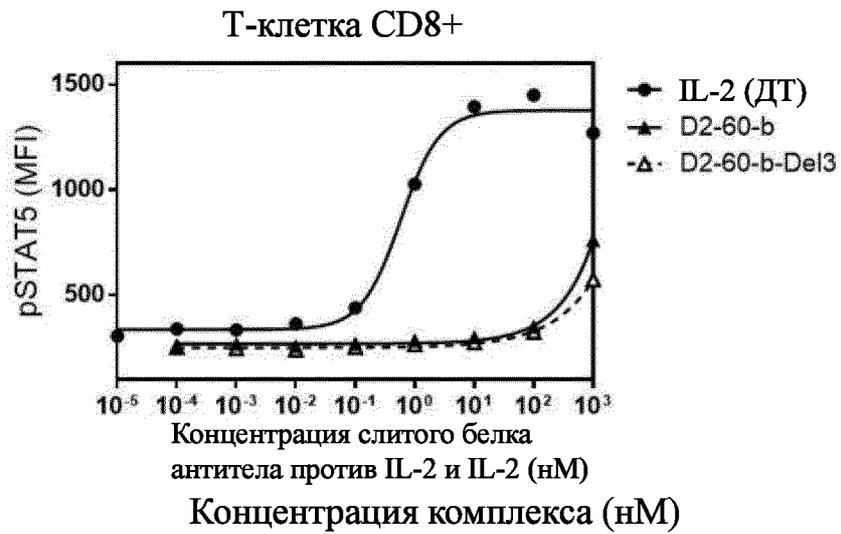
ФИГ. 9B

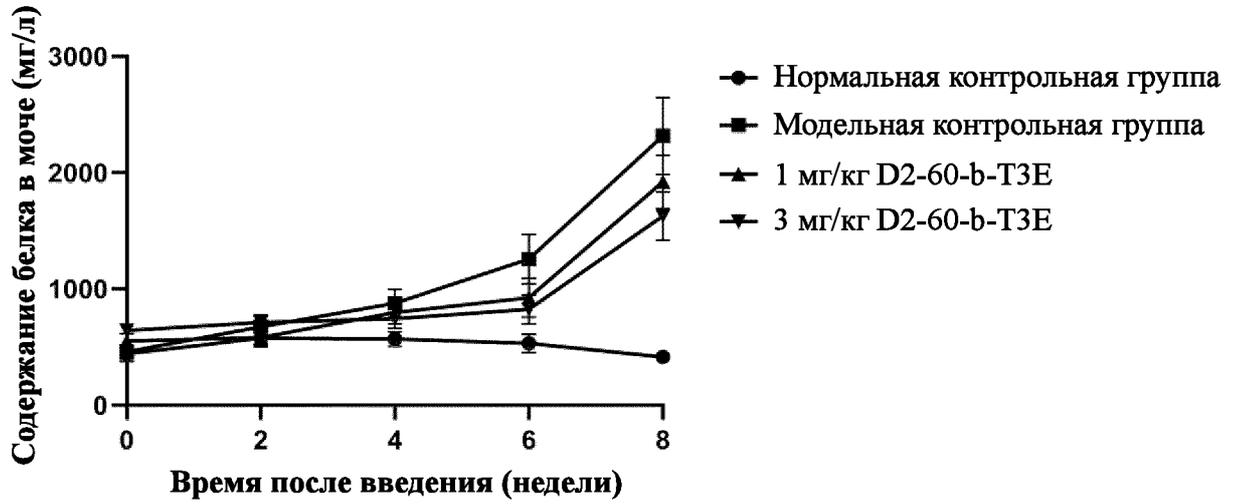


ФИГ. 9C

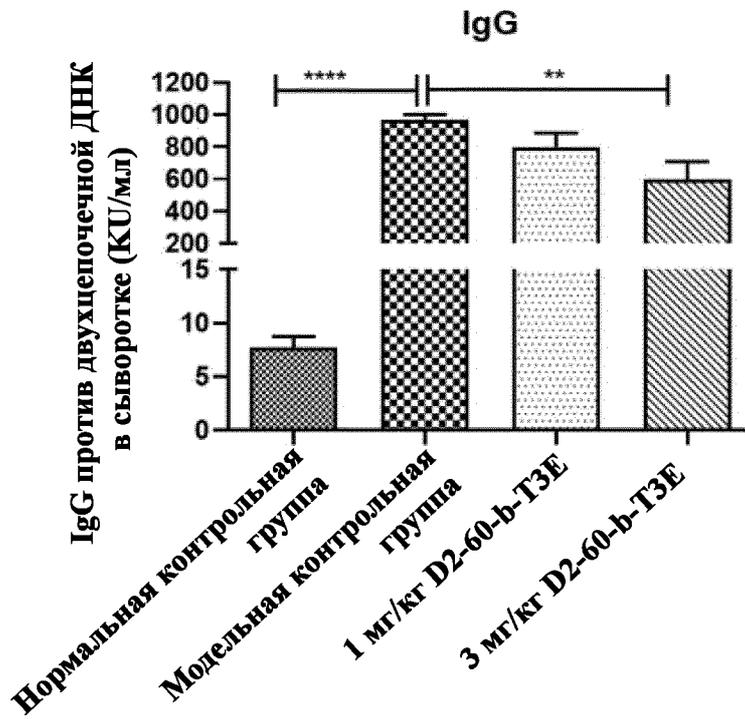


ФИГ. 9D

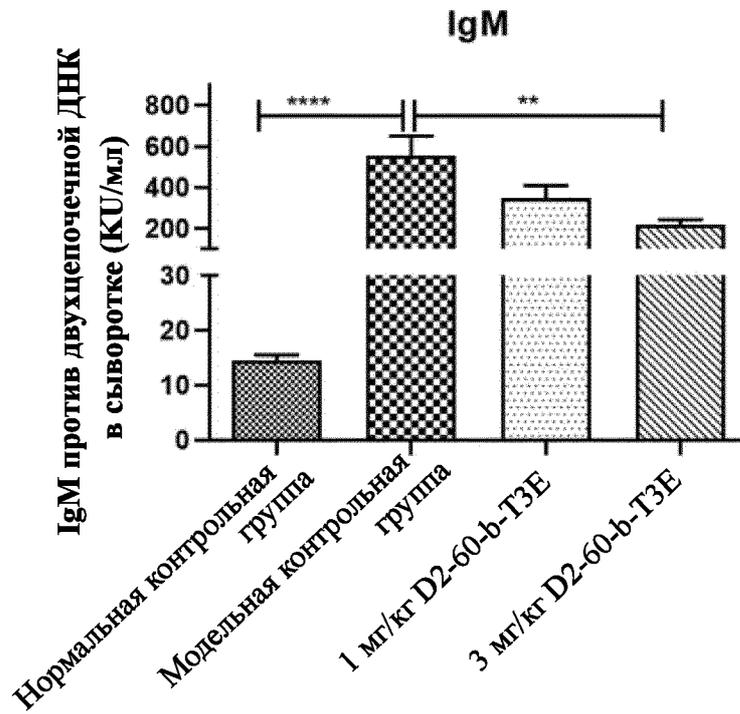
**ФИГ. 9E****ФИГ. 9F**



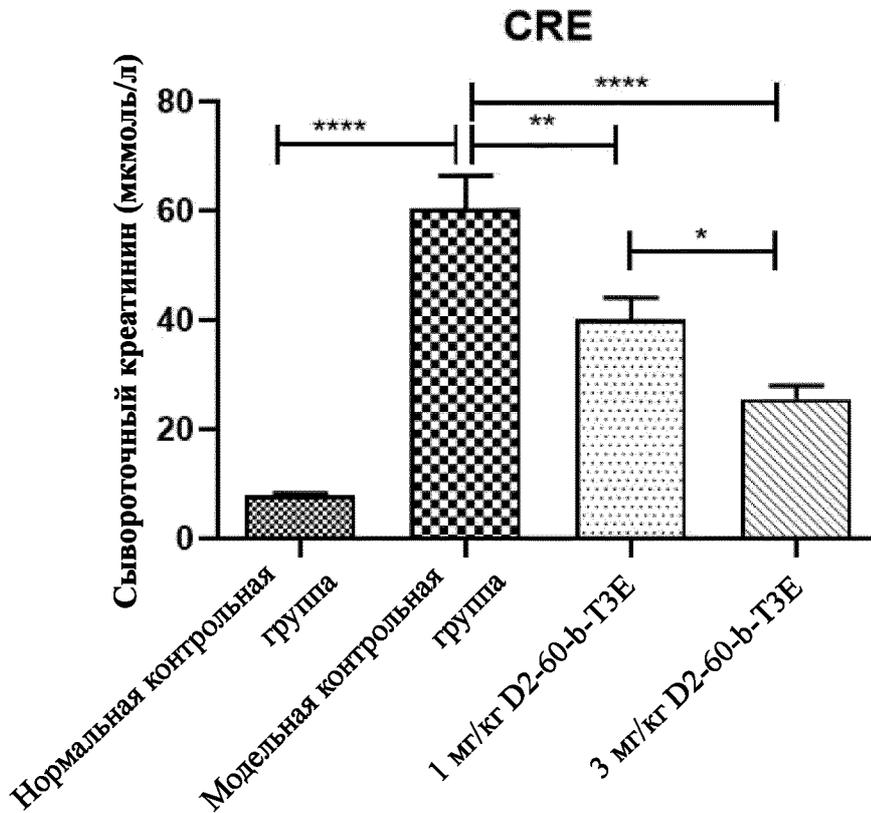
ФИГ. 10



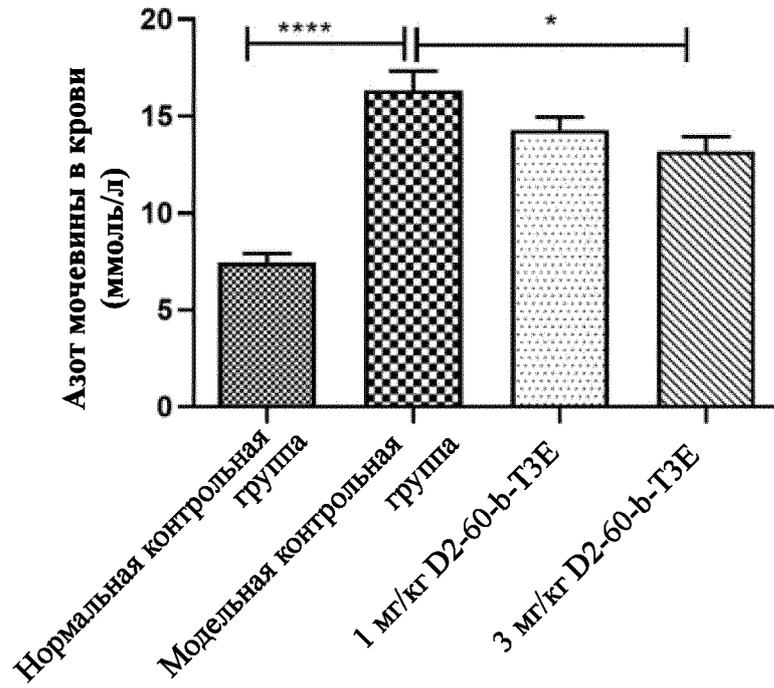
ФИГ. 11А



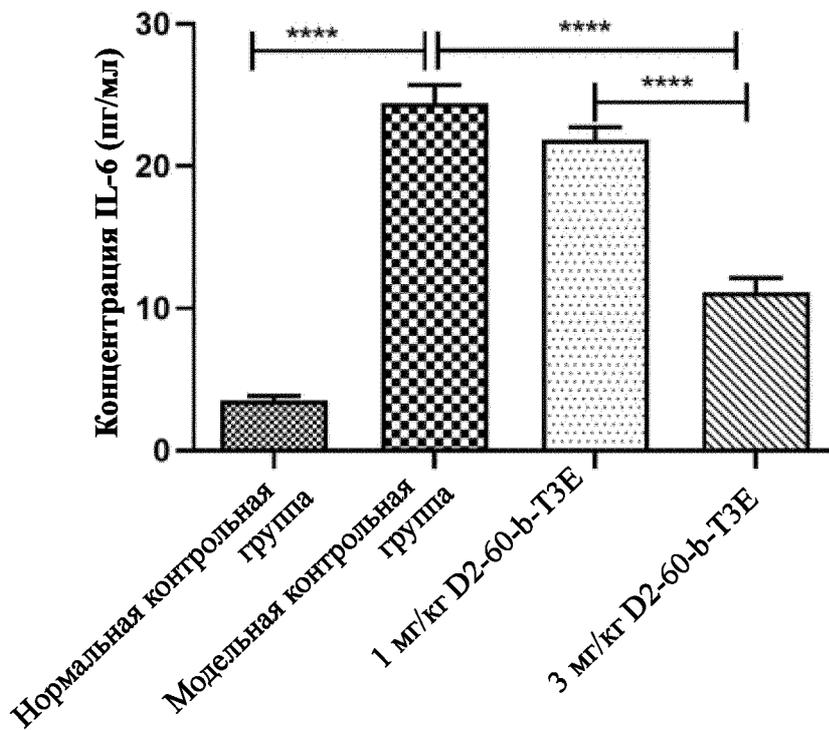
ФИГ. 11В



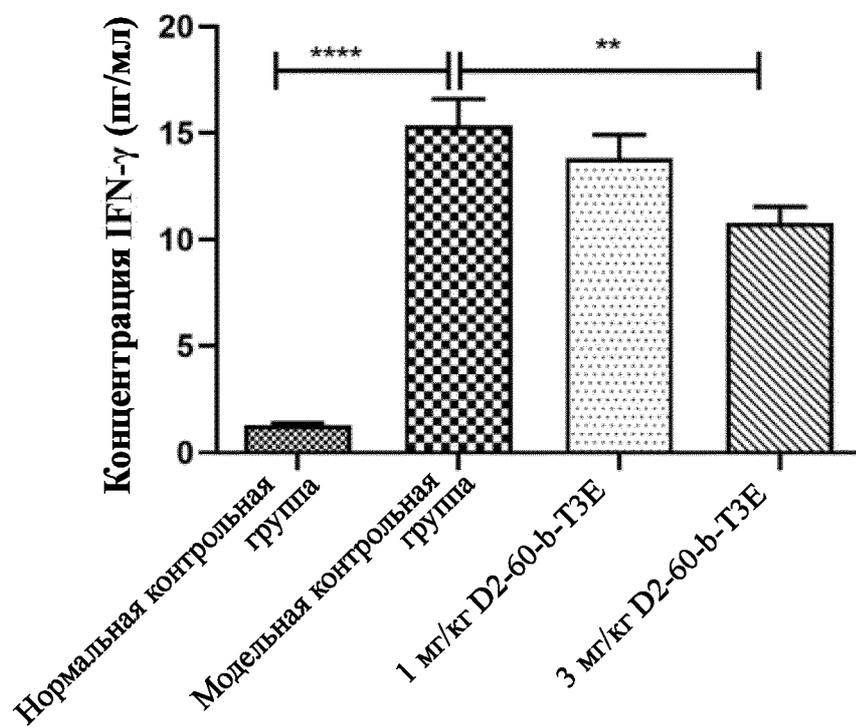
ФИГ. 12А



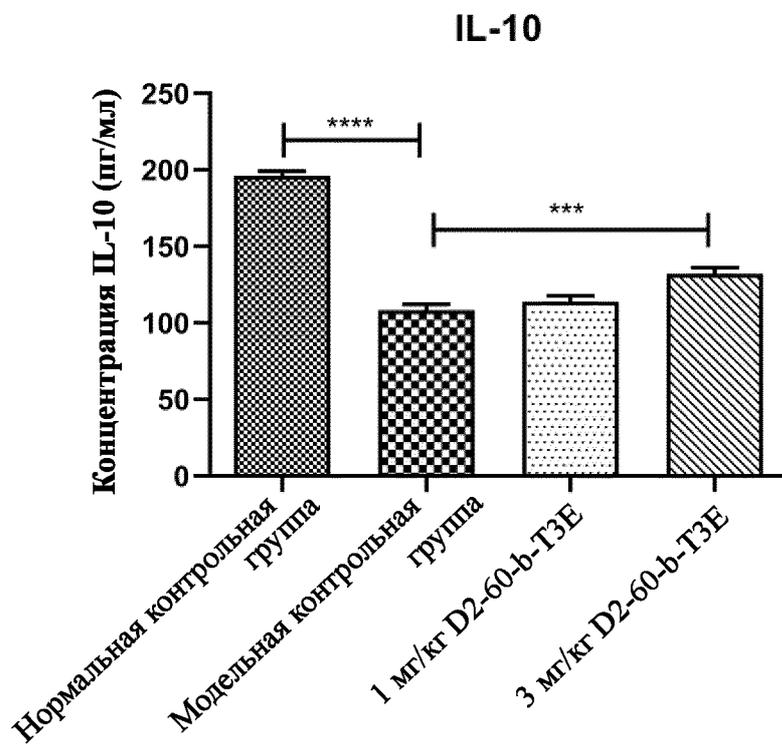
ФИГ. 12В



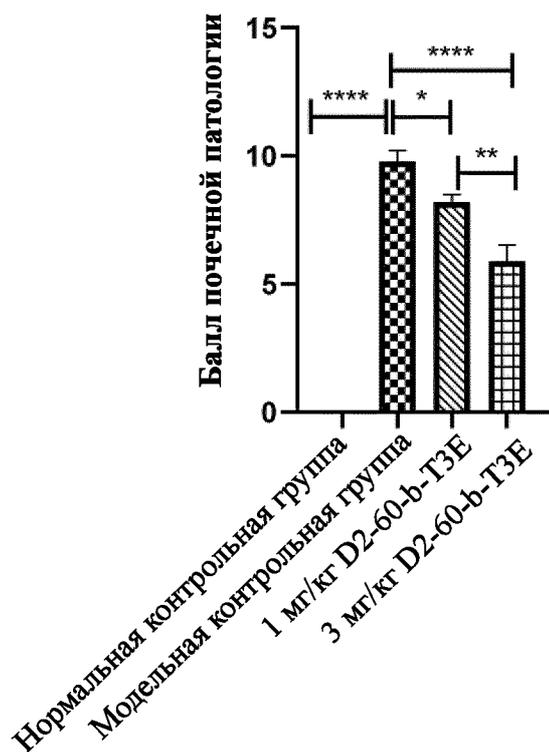
ФИГ. 13А



ФИГ. 13В



ФИГ. 14



ФИГ. 15