



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61P 37/06 (2022.02); A61K 38/20 (2022.02); C07K 14/54 (2022.02); C07K 14/55 (2022.02); C07K 16/2866 (2022.02); C07K 19/00 (2022.02); C07K 2317/52 (2022.02); C07K 2317/55 (2022.02); C07K 2317/71 (2022.02); C07K 2317/92 (2022.02); C07K 2319/30 (2022.02); C07K 2319/74 (2022.02); C07K 2319/75 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2019121902, 13.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.12.2017

Дата регистрации:
07.04.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.12.2016 US 62/433,533

(43) Дата публикации заявки: 18.01.2021 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 07.04.2022 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.07.2019

(86) Заявка РСТ:
US 2017/066163 (13.12.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/112069 (21.06.2018)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ГРИВ, Джеффри (US),
КИМ, Чонмин (US),
НАГАРАДЖАН, Ниранджана (US),
ЧО, Джон (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЕЛИНИЯ, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2016304574 A1, 20.10.2016.

ZHENG X. X. ET AL., IL-2 receptor-targeted
cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks
diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic
mice, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,
1999, v. 163, n. 7, p. 4041 - 4048. LI-HEE HA ET
AL., Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform
Technology: From Design to Applications in
(см. прод.)

(54) ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к слитым белкам, которые содержат IL-2 рецептор-связывающий фрагмент и ST2-связывающий фрагмент, и может быть использовано в медицине для лечения воспалительной миопатии, воспалительного состояния жировой ткани, воспалительного состояния кишечника, воспалительного состояния легких и аутоиммунного заболевания. Слитый белок содержит белок IL-2 человека, белок Fc

иммуноглобулина и белок, который связывается с интерлейкин-1 рецептор-подобным белком 1 (ST2), выбранный из белка IL-33 человека, антитела, специфичного к ST2, или его антигенсвязывающего фрагмента. Также предложен димер указанного слитого белка. Изобретение обеспечивает селективную активацию ST2⁺ регуляторной Т-клетки по сравнению с ST2⁻ регуляторной Т-клеткой у индивида. 7 н. и 39 з.п. ф-лы, 11 ил., 7 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

Therapeutic Antibodies and Proteins, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 2016, v.7, p.1 - 16. WO 2014082179 A1, 05.06.2014. THOMAS SPRETER VON KREUDENSTEIN ET AL., Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability : Quality by molecular design, MABS, 2013, v. 5, n. 5, p. 646 - 654. RU 2235729 C2, 10.09.2004. KONTERMANN R. E. et al., Bispecific antibodies, Drug Discovery Today, 2015, V. 7, N. 20, p.838-847. SHEN J. et al., Single variable domain-IgG fusion: a novel recombinant approach to Fc domain-containing bispecific antibodies, Journal of Biological Chemistry, 2006, V. 281, N. 16, p.10706-10714. SUZUKI T. et al., Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR, The journal of immunology, 2010, V. 184, N. 4, p.1968-1976. BENJAMIN W. U. et al., Pharmacokinetics of peptide-Fc fusion proteins, Journal of pharmaceutical sciences, 2014, V. 103, N. 1, p.53-64. CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Advanced drug delivery reviews, 2013, v. 65, n. 10, p.1357-1369. MAEDA Y. et al., Engineering of functional chimeric protein G-Vargula Luciferase, Analytical biochemistry, 1997, v. 249, n. 2, p.147-152. MULLER S. et al., Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial, Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2008, V. 58, N. 12, p.3873-3883.

R U 2 7 6 9 8 7 1 C 2

R U 2 7 6 9 8 7 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/54 (2006.01)*C07K 14/55* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*A61K 38/20* (2006.01)*A61P 37/06* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61P 37/06 (2022.02); *A61K 38/20* (2022.02); *C07K 14/54* (2022.02); *C07K 14/55* (2022.02); *C07K 16/2866* (2022.02); *C07K 19/00* (2022.02); *C07K 2317/52* (2022.02); *C07K 2317/55* (2022.02); *C07K 2317/71* (2022.02); *C07K 2317/92* (2022.02); *C07K 2319/30* (2022.02); *C07K 2319/74* (2022.02); *C07K 2319/75* (2022.02)

(21)(22) Application: **2019121902**, 13.12.2017(24) Effective date for property rights:
13.12.2017Registration date:
07.04.2022

Priority:

(30) Convention priority:
13.12.2016 US 62/433,533(43) Application published: **18.01.2021** Bull. № 2(45) Date of publication: **07.04.2022** Bull. № 10(85) Commencement of national phase: **15.07.2019**(86) PCT application:
US 2017/066163 (13.12.2017)(87) PCT publication:
WO 2018/112069 (21.06.2018)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**GREVE, Jeffrey (US),
KIM, Jungmin (US),
NAGARAJAN, Niranjana (US),
CHO, John (US)**

(73) Proprietor(s):

DELINIA, INC. (US)(54) **POLYVALENT MODULATORS OF REGULATORY T-CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to fused proteins that contain IL-2 receptor-binding fragment and ST2-binding fragment; it can be used in medicine for the treatment of inflammatory myopathy, inflammatory condition of adipose tissue, inflammatory condition of the intestine, inflammatory condition of the lungs and autoimmune disease. Fused protein contains human IL-2 protein,

immunoglobulin Fc protein, and protein that binds to interleukin-1 receptor-like protein 1 (ST2), selected from human IL-33 protein, an antibody specific to ST2, or its antigen-binding fragment. Dimer of the specified fused protein is also proposed.

EFFECT: invention provides for the selective activation of ST2⁺ regulatory T-cell compared to ST2⁻ regulatory T-cell in an individual.

46 cl, 11 dwg, 7 tbl, 8 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США 62/433,533, поданной 13 декабря 2016 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ.

ПОДАЧА СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Список последовательностей, прилагаемый к настоящей заявке, подан в электронном формате через EFS-сеть и включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Название текстового файла, содержащего Список последовательностей - 127754_00502_Sequence_Listing. Размер текстового файла - 91 КБ, текстовый файл был создан 13 декабря 2017 года.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Воспалительные миопатии представляют собой заболевания, которые характеризуются хроническим мышечным воспалением и мышечной слабостью. Мышечные дистрофии представляют собой дегенеративные заболевания мышц, вызванные мутацией гена дистрофина, но основной причиной прогрессирующей дегенерации является воспаление мышц. Воспаление, связанное с этими заболеваниями, может повреждать мышечные волокна, вызывая усталость, боль и прогрессирующую мышечную дегенерацию. Регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой особую субпопуляцию Т-клеток. Treg подавляют активацию иммунной системы и, таким образом, регулируют аутоотолерантность иммунной системы. Субпопуляции Treg, экспрессирующих определенные молекулярные маркеры, такие как рецептор ST2, присутствуют в воспаленных тканях, таких как поврежденные скелетные мышцы и воспаленные легкие. Размножение и активация ST2-экспрессирующих Treg вовлечены в разрешение острого повреждения мышц и мышечного воспаления, ассоциированного с мышечной дистрофией. Кроме того, ST2⁺ Treg обнаруживаются в тканях, таких как висцеральный жировой слой, толстая кишка и легкие, и обладают иммунорегуляторными и восстановительными функциями в этих тканях.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен слитый белок, содержащий: белковый домен IL-2 человека; белковый домен Fc иммуноглобулина; и белковый домен, который связывается с интерлейкин-1 рецептор-подобным белком 1 (ST2). В некоторых вариантах осуществления белковый домен, который связывается с ST2, является белковым доменом IL-33 человека. В некоторых вариантах осуществления белковый домен, который связывается с ST2, является антителом, специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит по меньшей мере один пептидный линкерный домен. В некоторых вариантах осуществления белковый домен IL-2 человека содержит IL-2 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L и Q126F, по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления белковый домен Fc иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из варианта Fc IgG1 человека SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления белковый домен IL-33 человека содержит IL-33 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из C208S, C227S, C232S и C259S, по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкерный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит первый

пептидный линкерный домен и второй пептидный линкерный домен.

[0005] В некоторых вариантах осуществления слитых белков, описанных в настоящем документе, каждый домен имеет amino-конец (N-конец) и карбокси-конец (C-конец); и где слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой C-конец белкового домена IL-2 человека слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкерного домена; N-конец белкового домена Fc IgG слит через пептидную связь с C-концом первого пептидного линкерного домена; N-конец второго пептидного линкерного домена слит через пептидную связь с C-концом белкового домена Fc IgG; и N-конец белкового домена, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с C-концом второго пептидного линкерного домена.

[0006] В некоторых вариантах осуществления слитых белков, описанных в настоящем документе, каждый домен имеет amino-конец (N-конец) и карбокси-конец (C-конец); и где слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой C-конец белкового домена, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкерного домена; N-конец белкового домена Fc IgG слит через пептидную связь с C-концом первого пептидного линкерного домена; N-конец второго пептидного линкерного домена слит через пептидную связь с C-концом белкового домена Fc IgG; и N-конец белкового домена IL-2 человека слит через пептидную связь с C-концом второго пептидного линкерного домена. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25.

[0007] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен димерный белок, содержащий слитый белок, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен димерный белок, содержащий первый слитый белок и второй слитый белок, где каждый слитый белок включает белковый домен Fc иммуноглобулина (IgG) и по меньшей мере один дополнительный белковый домен, выбранный из группы, состоящей из белкового домена IL-2 человека; и белковый домен, который связывается с интерлейкин-1 рецептор-подобным белком 1 (ST2); и димерный белок включает по меньшей мере один белковый домен IL-2 человека и по меньшей мере один белковый домен, который связывается с ST2.

[0008] В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает белковый домен IL-2 человека, первый белковый домен Fc иммуноглобулина и первый пептидный линкер; и второй слитый белок включает белковый домен, который связывается с ST2, второй белковый домен Fc иммуноглобулина и второй пептидный линкерный домен. В некоторых вариантах осуществления каждый домен имеет amino-конец (N-конец) и карбокси-конец (C-конец); первый слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой C-конец белкового домена IL-2 человека слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкерного домена; и N-конец первого белкового домена Fc IgG слит через пептидную связь с C-концом первого пептидного линкерного домена; и второй слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой C-конец второго белкового домена Fc IgG слит через пептидную связь с N-концом второго пептидного линкерного домена; и N-конец белкового домена, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с C-концом второго пептидного линкерного домена. В некоторых вариантах осуществления белковый домен, который связывается с ST2, является

белковым доменом IL-33 человека. В некоторых вариантах осуществления белковый домен, который связывается с ST2, является антителом, специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из слитых белков димерного белка дополнительно включает по меньшей мере один пептидный линкерный домен. В некоторых вариантах осуществления белковый домен IL-2 человека включает IL-2 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L и Q126F, по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. в некоторых вариантах осуществления белковый домен Fc иммуноглобулина включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из варианта Fc IgG1 человека SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления белковый домен IL-33 человека включает IL-33 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из C208S, C227S, C232S и C259S, по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкерный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

[0009] В некоторых вариантах осуществления димерных белков, описанных в настоящем документе, первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и второй слитый белок включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; каждый первый слитый белок и второй слитый белок включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; каждый первый слитый белок и второй слитый белок включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; каждый первый слитый белок и второй слитый белок включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; или первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и димерный белок дополнительно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[00010] В некоторых вариантах осуществления димерных белков, описанных в настоящем документе, белок Fc IgG включает остатки цистеина, и первый слитый белок и второй слитый белок соединены друг с другом через остатки цистеина белкового домена Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления димерный белок селективно взаимодействует с ST2⁺ регуляторными Т-клетками по сравнению с ST2⁻ регуляторными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая слитый белок, описанный в настоящем документе, или димерный белок, описанный в настоящем документе.

[00011] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения патологического состояния, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по пункту 28. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большему увеличению уровней ST2⁺ регуляторных Т-клеток у индивида по сравнению с уровнями ST2⁻ регуляторных Т-клеток у индивида. В некоторых вариантах осуществления введение селективно активирует ST2⁺ регуляторные Т-клетки у индивида по сравнению с ST2⁻ регуляторными Т-клетками у индивида. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг.

[00012] В некоторых вариантах осуществления патологическим состоянием является воспалительная миопатия. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия выбрана из группы, состоящей из мышечной дистрофии, полимиозита, дерматомиозита. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания жировой ткани, воспалительного заболевания толстой кишки и воспалительного заболевания легкого. В некоторых вариантах осуществления жировая ткань является висцеральной жировой тканью. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние является аутоиммунным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции трансплантат против хозяина, вульгарной пузырчатки, системной красной волчанки, склеродермии, язвенного колита, болезни Крона, псориаза, диабета 1-го типа, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза, очаговой алопеции, увеита, оптиконевромиелита и миодистрофии Дюшенна. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение является подкожным. В некоторых вариантах осуществления индивид является человеком.

[00013] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ селективной активации ST2⁺ регуляторной Т-клетки по сравнению с ST2⁻ регуляторной Т-клеткой у индивида, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по пункту 28. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение является подкожным. В некоторых вариантах осуществления индивид является человеком.

[00014] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено соединение, включающее: а) первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, ковалентно связанный с Fc-доменом иммуноглобулина; и б) второй фрагмент, который связывается с ST2, ковалентно связанный с Fc-доменом иммуноглобулина.

[00015] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено соединение, включающее: а) первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2; и б) второй фрагмент, который связывается с ST2; где первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, включает мутацию по сравнению с IL-2 дикого типа, которая увеличивает стабильность по сравнению с фрагментом IL-2 дикого типа, который связывает рецептор IL-2 у индивида.

[00016] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено соединение, включающее: а) первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2; и б) второй фрагмент, который связывается с ST2; где первый фрагмент, который селективно связывается с рецептором IL-2, связывается с рецептором IL2R $\alpha\beta\gamma$ по сравнению с рецептором IL2R $\beta\gamma$.

[00017] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено соединение, включающее: а) первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2; и б) второй фрагмент, который связывается с ST2; где первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, отличается от IL-2 дикого типа заменой, а именно N88R, по сравнению с IL-2 дикого типа.

[00018] В некоторых вариантах осуществления соединений, описанных в настоящем документе, первый фрагмент включает полипептид. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, включает пептидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутация, которая увеличивает стабильность по сравнению с IL-2 дикого типа фрагмента, который связывает рецептор IL-2 у индивида, является заменой, а именно C125S, по сравнению с IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, отличается от IL-2 дикого типа заменой, а именно T3A, по сравнению с IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, включает SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, является SEQ ID NO: 1.

[00019] В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, включает полипептид. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, включает пептидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с IL-33 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, обладает по меньшей

мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, является антителом, направленным против ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, включает SEQ ID NO: 10.

5 В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент, который связывается с ST2, является SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, ковалентно связаны. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с

10 ST2, ковалентно связаны дисульфидной связью.

[00020] В некоторых вариантах осуществления соединений, описанных в настоящем документе, соединение дополнительно включает два мультимеризационных фрагмента. В некоторых вариантах осуществления первый мультимеризационный фрагмент ковалентно связан с первым фрагментом, который связывается с рецептором IL-2, и

15 второй мультимеризационный фрагмент ковалентно связан со вторым фрагментом, который связывается с ST2. В некоторых вариантах осуществления два мультимеризационных фрагмента ковалентно связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два мультимеризационных фрагмента представляют собой полипептидные последовательности. В некоторых вариантах осуществления два

20 мультимеризационных фрагмента являются Fc-доменами иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены иммуноглобулина обладают ослабленными эффекторными функциями по сравнению с соответствующими Fc-доменами иммуноглобулина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены иммуноглобулина являются Fc-доменами иммуноглобулина IgG1. В некоторых

25 вариантах осуществления Fc-домены иммуноглобулина IgG1 отличаются от Fc-доменов иммуноглобулина IgG1 дикого типа заменой, а именно N297A по сравнению с Fc-доменами иммуноглобулина IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления каждый Fc-домен иммуноглобулина включает SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления каждый Fc-домен иммуноглобулина является SEQ ID NO: 7.

30 [00021] В некоторых вариантах осуществления соединений, описанных в настоящем документе, соединение включает линкерный пептид, ковалентно связанный с первым фрагментом, который связывается с рецептором IL-2, и ковалентно связанный с первым мультимеризационным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления соединение включает линкерный пептид, ковалентно связанный со вторым фрагментом, который

35 связывается с ST2, и ковалентно связанный со вторым мультимеризационным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления соединение включает первый линкерный пептид, ковалентно связанный с первым фрагментом, который связывается с рецептором IL-2, и ковалентно связанный с первым мультимеризационным фрагментом, и второй линкерный пептид, ковалентно связанный со вторым фрагментом,

40 который связывается с ST2, и ковалентно связанный со вторым мультимеризационным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, расположен на N-конце по отношению к первому линкерному пептиду, и первый мультимеризационный фрагмент расположен на C-конце по отношению к первому линкерному пептиду, и второй фрагмент, который связывается

45 с ST2, расположен на N-конце по отношению ко второму линкерному пептиду, и второй мультимеризационный фрагмент расположен на C-конце по отношению ко второму линкерному пептиду. В некоторых вариантах осуществления каждый первый линкерный пептид и второй линкерный пептид содержат от 6 до 20 аминокислотных остатков. В

некоторых вариантах осуществления каждый первый линкерный пептид и второй линкерный пептид содержат от 12 до 17 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждый первый линкерный пептид и второй линкерный пептид представляют собой последовательности аминокислотных остатков, каждый из которых независимо является серином или глицином. В некоторых вариантах осуществления каждый первый линкерный пептид и второй линкерный пептид содержат по 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждый первый линкерный пептид и второй линкерный пептид является GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления соединение селективно воздействует на ST2⁺ регуляторные Т-клетки по сравнению с ST2⁻ регуляторными Т-клетками.

[00022] В некоторых аспектах настоящее описание относится к способу лечения патологического состояния, включающему введение индивиду терапевтически эффективного количества соединения по любому из пунктов 1-40. В некоторых вариантах осуществления введение повышает количество ST2⁺ регуляторных Т-клеток у индивида по сравнению с количеством ST2⁻ регуляторных Т-клеток у индивида. В некоторых вариантах осуществления введение селективно активирует ST2⁺ регуляторные Т-клетки у индивида по сравнению с ST2⁻ регуляторными Т-клетками у индивида. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние является воспалительной миопатией. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия является мышечной дистрофией. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия является полимиозитом. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия является дерматомиозитом. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние является воспалительным заболеванием жировой ткани. В некоторых вариантах осуществления жировая ткань является висцеральной жировой тканью. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние является воспалительным заболеванием толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние является воспалительным заболеванием легкого. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение является подкожным. В некоторых вариантах осуществления индивид является человеком.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ОТСЫЛКИ

[00023] Все публикации, патенты и заявки на патент, указанные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством отсылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была прямо и индивидуально указана как включенная посредством отсылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00024] На ФИГ. 1 показана диаграмма, иллюстрирующая наложение клеток, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и ST2.

[00025] На ФИГ. 2 показано схематическое изображение примерного соединения согласно настоящему описанию.

[00026] На ФИГ. 3А показана схематическая диаграмма соединения, имеющего IL2R-связывающий фрагмент, ST2-связывающий фрагмент и линкер между ними.

[00027] На ФИГ. 3В показана схематическая диаграмма примерного соединения, имеющего IL2R-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с мультимеризационным фрагментом, ST2-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с

мультимеризационным фрагментом, и ковалентные связи между мультимеризационными фрагментами.

[00028] На ФИГ. 3С показана схематическая диаграмма примерного соединения, имеющего IL2R-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с мультимеризационным фрагментом, ST2-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с линкером, ковалентно связанным с мультимеризационным фрагментом, и ковалентные связи между мультимеризационными фрагментами.

[00029] На ФИГ. 3D показана схематическая диаграмма примерного соединения, имеющего IL2R-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с линкером, ковалентно связанным с мультимеризационным фрагментом, ST2-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с мультимеризационным фрагментом, и ковалентные связи между мультимеризационными фрагментами.

[00030] На ФИГ. 3Е показана схематическая диаграмма примерного соединения, имеющего IL2R-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с линкером, ковалентно связанным с мультимеризационным фрагментом, ST2-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с линкером, ковалентно связанным с мультимеризационным фрагментом, и ковалентные связи между мультимеризационными фрагментами.

[00031] На ФИГ. 3F показана схематическая диаграмма примерного соединения, имеющего: а) IL2R-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с мультимеризационным фрагментом, ковалентно связанным с ST2-связывающим фрагментом, б) ST2-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с мультимеризационным фрагментом, ковалентно связанным с IL2R-связывающим фрагментом, и в) ковалентные связи между мультимеризационными фрагментами.

[00032] На ФИГ. 4А-4J показаны схематические диаграммы димерных белков, включающих Fc-области IgG1. Димерные белки включают вариант IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) или различные комбинации варианта IL-33 и варианта IL-2 (N88R, C125S). В названиях белков "N" обозначает N-концевой, "C" обозначает C-концевой, "v" обозначает вариант, "B" обозначает бивалентный, и "M" обозначает моновалентный.

[00033] На ФИГ. 5А-5Е показаны схематические диаграммы димерных белков, включающих Fc-области IgG1. Димерные белки включают вариант IL-2 (N88R, C125S) и антигенсвязывающий фрагмент (Fab), который связывается с ST2 (Ab2 или Ab4). На каждой диаграмме представлены два различных димерных белка, один из которых содержит Ab2 в качестве Fab-области, а другой содержит Ab4 в качестве Fab-области. В названиях белков "N" обозначает N-концевой, "C" обозначает C-концевой, "v" обозначает вариант, "B" обозначает бивалентный, и "M" обозначает моновалентный.

[00034] На ФИГ. 6А показаны сенсограммы BiaCore, показывающие связывание между человеческим ST2 и IL-2v/IL-33v биспецифичными и моновалентными IL-33 молекулами.

[00035] На ФИГ. 6В показаны сенсограммы BiaCore, показывающие связывание между мышинным ST2 и IL-2v/IL-33v биспецифичными и моновалентным IL-33 молекулами.

[00036] На ФИГ. 7 показаны сенсограммы BiaCore, показывающие связывание между человеческим IL2R-альфа и IL-2v/IL-33v биспецифичными и моновалентными IL-33 молекулами.

[00037] На ФИГ. 8А показаны сенсограммы BiaCore, показывающие связывание между человеческим ST2 и Ab2/IL-2v биспецифичными молекулами.

[00038] На ФИГ. 8В показаны сенсограммы BiaCore, показывающие связывание между человеческим ST2 и Ab4/IL-2v биспецифичными молекулами.

[00039] На ФИГ. 9А показаны сенсограммы ViaCore, показывающие связывание между человеческим IL2R-альфа и Ab2/IL-2v биспецифичными молекулами.

[00040] На ФИГ. 9В показаны сенсограммы ViaCore, показывающие связывание между человеческим IL2R-альфа и Ab4/IL-2v биспецифичными молекулами.

[00041] На ФИГ. 10А показана pSTAT5 активность в ST2⁺ регуляторных Т-клетках в суспензиях мышечных клеток селезенки, стимулируемых различными концентрациями моновалентного N88R-Fc или моновалентного IL-33-Fc, или биспецифичного IL2vNM-IL33vCM.

[00042] ФИГ. 10В показана pSTAT5 активность в ST2⁻ регуляторных Т-клетках в суспензиях мышечных клеток селезенки, стимулируемых различными концентрациями моновалентного N88R-Fc или моновалентного IL-33-Fc, или биспецифичного IL2vNM-IL33vCM.

[00043] На ФИГ. 11А и 11В показана биоактивность фрагмента IL-33 в IL33-IL2 биспецифичных белках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00044] Регуляторные Т-клетки (Treg) являются классом CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, которые подавляют активность других иммунных клеток, таких как обычные CD4⁺ Т-клетки (Tconv) и CD8⁺ клетки. Treg играют главную роль в гомеостазе иммунной системы, поддерживают толерантность к аутоантигенам и модулируют иммунный ответ против чужеродных антигенов. Treg могут сильно активироваться интерлейкином-2 (IL-2), но IL-2 также активирует многие другие типы клеток, что может привести к серьезным токсическим явлениям. Было установлено, что существуют субпопуляции Treg, которые могут быть определены экспрессией специфических молекулярных маркеров и своей ролью в различных иммунологических ответах. Одной из субпопуляций Treg является ST2⁺ субпопуляция Treg. Определяющим маркером клеточной поверхности ST2⁺ Treg является ST2, компонент цитокинового рецептора, также известный как интерлейкин-1 рецептор-подобный белок 1 (IL1RL1), и который является субъединицей рецептора IL-33. IL-33 относится к классу "аларминов", воспалительных цитокинов, связанных с острыми воспалительными реакциями. ST2⁺ Treg присутствуют в тканях, таких как мышца, висцеральный жир, толстая кишка и легкое, и обладают иммуnoreгуляторными и восстановительными функциями.

[00045] В скелетной мышце обычно нет Т-клеток, но после острой мышечной травмы ST2⁺ Treg быстро мигрируют в мышечную ткань в больших количествах. Рекрутинг таких Treg в мышечную ткань и продукция фактора роста амфирегулина (AREG) связывали с активацией сателлитных клеток мышц и с восстановлением ткани. Недостаточность Treg ухудшает восстановление мышц после повреждения, и размножение Treg в мышце при использовании комплексов IL-2-IL-2R приводит к улучшенным результатам в модели дистрофин-дефицитной миодистрофии на животных. Значительная доля Treg, которые вырабатывают AREG, является ST2⁺. ST2⁺ Treg также связывали с воспаленной тканью легкого после гриппа и связывали с восстановлением ткани легкого после инфекции. Обработка ST2⁺ Treg лигандом рецептора ST2, IL-33, увеличивает продукцию AREG и восстановление ткани. Таким образом, при увеличении количества ST2⁺ Treg или активности ST2⁺ Treg можно лечить или предотвращать аутоиммунные заболевания и воспалительные заболевания, такие как воспалительные миопатии, воспалительные мышечные патологии, и улучшать заживление тканей после повреждения или нагрузки.

[00046] Например, роль ST2⁺ Treg была установлена в моделях воспаления мышц на животных. Одной из таких моделей на животных является острая мышечная травма

(Burzyn et al., 2013, Cell 155(6): 1282-1295) у мышей дикого типа, и второй моделью является модель миодистрофии на мышцах mdx, модель хронического воспаления мышц, вызванного генетически обусловленной недостаточностью дистрофина (мышцы mdx; Villalta et al., 2014, Sci Transl Med 5(258): 258ra142). Роль ST2+ Treg также была

5 установлена в модели воспалительного заболевания кишечника на мышцах (Schiering et al., 2014, Nature 513(7519):564-568).

[00047] В результате предоставления соединений и способов, которые позволяют селективно увеличивать количество ST2+ Treg и/или повышать активность ST2+ Treg, настоящее изобретение делает возможными новые способы лечения воспалительных

10 и дегенеративных заболеваний. Например, настоящее изобретение относится к соединению с первым фрагментом, который связывается с рецептором IL-2 (IL-2R или IL2R), и вторым фрагментом, который связывается с ST2. IL-2R представляет собой гетеротримерный белок, экспрессируемый в различных типах иммунных клеток, включая Т-клетки, NK-клетки, эозинофилы и моноциты. Такой широкий профиль экспрессии

15 обеспечивает плеiotропный эффект в отношении иммунной системы и высокую системную токсичность терапии IL-2, а также может затруднить адресное воздействие на IL-2R+ клетки.

[00048] IL2-R имеет три формы, образуемые различными комбинациями трех разных белков IL-2R: α (альфа), β (бета) и γ (гамма). Эти цепи рецептора собираются с

20 образованием трех разных формы рецептора: (1) рецептор низкой аффинности, IL2R α , который не передает сигнал; (2) рецептор промежуточной аффинности (IL2R $\beta\gamma$), состоящий из IL2R β и IL2R γ , который широко экспрессируется на обычных CD4+ Т-клетках (Tconv), NK-клетках, эозинофилах и моноцитах; и (3) рецептор высокой аффинности (IL2R $\alpha\beta\gamma$), состоящий из IL2R α , IL2R β и IL2R γ , который транзистентно

25 экспрессируется на активированных Т-клетках и конститутивно на Treg-клетках. Обычные Т-клетки (Tconv) являются клетками, которые активируются антигенами и участвуют в иммунном ответе. Обычные Т-клетки включают Т-хелперы, цитотоксические Т-клетки и Т-клетки памяти. Мутации в IL-2 могут изменять аффинность связывания IL-2 к различным формам рецептора IL-2R. Таким образом, в настоящем изобретении

30 предложены соединения, которые селективно активируют и вызывают размножение Treg, например ST2+ Treg, благодаря тому, что они включают фрагмент, который селективно связывается с рецептором высокой аффинности (IL2R $\alpha\beta\gamma$). Пример фрагмента включает, без ограничения перечисленным, вариант IL-2, включающий одну или более мутаций, которые изменяют связывание по сравнению с IL-2 дикого типа, в результате

35 чего вариант IL-2 селективно связывается с рецептором высокой аффинности (IL2R $\alpha\beta\gamma$) по сравнению с рецептором промежуточной аффинности и рецептора низкой аффинности.

[00049] Способы и композиции настоящего изобретения относятся к соединению, включающему первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй

40 фрагмент, который связывается с ST2, что делает соединение намного более селективным и активным в его способности активировать и вызывать размножение ST2+ Treg. В некоторых вариантах осуществления эти соединения направленно воздействуют на клетки, которые экспрессируют как рецептор IL-2, или его определенную изоформу, так и ST2. Например, соединение, которое специфично связывается с изоформой IL2R $\alpha\beta\gamma$,

45 может связываться с Treg-клетками, экспрессирующими ST2. На ФИГ. 1 показаны домены экспрессии IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и ST2 в смешанной популяции Treg, а также пример области наложения, в которой может связываться соединение согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления первый и второй фрагменты ковалентно связаны,

например, Fc-доменом иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления соединение также включает линкер, соединяющий IL-2 рецептор-связывающий фрагмент и Fc-домен иммуноглобулина, и/или линкер, соединяющий ST2-связывающий фрагмент и Fc-домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления соединение может

5 регулировать активность белых кровяных клеток, например, лейкоцитов или лимфоцитов, которые отвечают за иммунитет. Fc-домен иммуноглобулина может увеличивать стабильность молекулы *in vivo*, а линкер ковалентно соединяет фрагмент и Fc-домен. При включении фрагментов, которые связываются с рецептором IL2 и с ST2, соединения, описанные в настоящем документе, могут направленно воздействовать

10 на клетки (например, Т-регуляторные клетки), которые экспрессируют как рецептор IL2, так и ST2. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен обладает ослабленными эффекторными функциями. Примерное соединение включает первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, где первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, ковалентно связан с первым

15 эффекторно-дефицитным Fc-доменом через линкер, и второй фрагмент, который связывается с ST2, ковалентно связан со вторым эффекторно-дефицитным Fc-доменом через линкер, и где первый эффекторно-дефицитный Fc-домен и второй эффекторно-дефицитный Fc-домен ковалентно связаны через дисульфидную связь. Пример такого соединения показан на ФИГ. 2. Другие примерные соединения показаны на ФИГ. 3A-

20 3E, на которой представлены соединения, включающие ST2-связывающий и IL2R-связывающий фрагменты, в различных комбинациях с линкерами и мультимеризационными доменами (которые могут быть, например, Fc-доменами). Другой пример такого соединения показан на ФИГ. 3F, где фрагмент IL2 и ST2-связывающий фрагмент присутствуют на N-конце и C-конце, соответственно, IgG Fc

25 белка. Такой белок может находиться в обратной ориентации, где ST2-связывающий фрагмент расположен на N-конце, а фрагмент IL2 - на C-конце, и может включать пептидные линкеры между одним или обоими ST2-связывающими фрагментами и их соответствующими Fc-доменами, или между одним или обоими IL2R-связывающими фрагментами и их соответствующими Fc-доменами. Примерный способ лечения

30 патологического состояния, например воспалительного заболевания, такого как воспалительная миопатия, включает введение индивиду терапевтически эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. Примеры патологического состояния включают, без ограничения перечисленными, мышечную дистрофию и дерматомиозит.

35 Фрагменты, которые связывают рецептор IL-2

[00050] Как описано выше, в настоящем изобретении предложено соединение, включающее первый фрагмент, который связывает рецептор IL-2, и второй фрагмент, который связывает ST2. Фрагмент, который связывает рецептор IL-2, может быть

40 полипептидом, включающим полноразмерный IL-2 дикого типа, более коротким или более длинным. IL-2 рецептор-связывающий фрагмент может быть последовательностью IL-2 дикого типа, которая показана в SEQ ID NO: 2: (APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQM ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQS IISTLT) или вариантом IL-2. Варианты IL-2 могут содержать одну или более замен, делеций или вставок, которые

45 отличаются от аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа. Остатки обозначены в настоящем документе однобуквенным аминокислотным кодом, после которого указано положение аминокислоты в IL-2, например, K35 является остатком лизина в положении 35 последовательности IL-2 дикого типа. Замены обозначены в

настоящем документе однобуквенным аминокислотным кодом, после которого указано положением аминокислоты в IL-2, а затем следует однобуквенный код заменяющей аминокислоты, например, K35A является заменой остатка лизина в положении 35 в SEQ ID NO: 2 остатком аланина.

- 5 [00051] Соединения в настоящем документе могут демонстрировать специфичность в отношении разных классов рецепторов IL-2, которая является такой же или отличается от специфичности IL-2 дикого типа. Соединения в настоящем документе могут демонстрировать увеличенную стабильность или биологическое действие по сравнению с IL-2 дикого типа. Например, мутация может придавать соединению увеличенную
- 10 специфичность в отношении некоторых рецепторов IL-2 по сравнению с IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления соединение селективно связывается с рецептором IL2R $\alpha\beta\gamma$ по сравнению с рецептором IL2R $\beta\gamma$, например, через его IL-2 связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления такое селективное связывание является результатом одной или более мутаций в последовательности IL-2
- 15 по сравнению с последовательностью IL-2 дикого типа. Например, IL-2 N88R является селективным в отношении связывания с рецептором IL2R $\alpha\beta\gamma$ по сравнению с рецептором IL2R $\beta\gamma$. IL-2 может стимулировать пролиферацию IL2R $\alpha\beta\gamma$ -экспрессирующих РНА-активированных Т-клеток так же эффективно как IL-2 дикого типа, демонстрируя 3000-кратно сниженную стимуляцию пролиферации IL2R $\beta\gamma$ -экспрессирующих НК-клеток.
- 20 Другие мутации, которые демонстрируют увеличенную селективность в отношении IL2R $\alpha\beta\gamma$, включают замены D20H, N88I, N88G, Q126L и Q126F.

- [00052] В некоторых вариантах осуществления IL-2 рецептор-связывающий фрагмент включает мутацию, которая увеличивает стабильность соединения согласно настоящему изобретению. Например, мутация IL-2 C125S способствует стабильности в результате
- 25 удаления неспаренного остатка цистеина, препятствуя, таким образом, неправильному сворачиванию полипептида IL-2. Неправильное сворачивание может привести к агрегации белка и увеличивает клиренс полипептида *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2 включает мутацию, которая вводит или удаляет сайт гликозилирования. Например, мутация IL-2 T3A удаляет сайт О-гликозилирования. В
- 30 некоторых вариантах осуществления вариант IL-2 с мутацией T3A также включает мутацию N88R и/или мутацию C125S. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-2 включает мутации T3A, N88R и C125S, как в SEQ ID NO: 3.

- [00053] В некоторых вариантах осуществления замены присутствуют в одном или более из положений 3, 20, 88, 125 и 126. В некоторых вариантах осуществления замены
- 35 присутствуют в одном, двух, трех, четырех или пяти положениях. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-2 включает мутации в положениях 88 и 125, например, N88R и C125S. В некоторых вариантах осуществления IL-2 рецептор-связывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1: APT
- 40 SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-2 включает мутации в положениях 3, 88 и 125, например, T3A, N88R и C125S, как в SEQ ID NO: 3: APASSSTK
- 45 KTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSII STLT. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-2 включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мутаций (например, замен) по сравнению с последовательностью IL-2 дикого типа.

[00054] Соединения в настоящем документе включают варианты IL-2, включающие

[illegible]

[00055] Варианты осуществления также включают варианты IL-2, которые селективно стимулируют Treg-клетки и включают аминокислотную последовательность, содержащую мутации N88R и C125S, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 61%, по меньшей мере на 62%, по меньшей мере на 63%, по меньшей мере на 64%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 66%, по меньшей мере на 67%, по меньшей мере на 68%, по меньшей мере на 69%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 72%, по меньшей мере на 73%, по меньшей мере на 74%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 76%, по меньшей мере на 77%, по меньшей мере на 78%, по меньшей мере на 79%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2). Соединения в настоящем документе включают варианты IL-2, включающие аминокислотную последовательность, содержащую мутации N88R и C125S, которая на 60%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), например, аминокислотную последовательность, которая на 80%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), аминокислотную последовательность, которая на 85%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), аминокислотную последовательность, которая на 90%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), или аминокислотную последовательность, которая на 95%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2).

[00056] Соединения также включают варианты IL-2, которые селективно стимулируют Treg-клетки и включают аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2). Соединения также включают варианты IL-2, которые селективно стимулируют Treg-клетки и включают аминокислотную последовательность, которая на 60%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), например, аминокислотную последовательность, которая на 80%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), аминокислотную последовательность, которая на 85%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), аминокислотную

последовательность, которая на 90%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2), или аминокислотную последовательность, которая на 95%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2).

5 [00057] Различные методы и программы могут использоваться для определения гомологии между двумя или более пептидами или нуклеиновыми кислотами, такие как NCBI BLAST, Clustal W, MAFFT, Clustal Omega, AlignMe, Praline, или другой подходящий метод или алгоритм. В некоторых вариантах осуществления идентичность процента вычислена с помощью FastDB на основе следующих параметров: штраф за несовпадение
10 1; штраф за пропуск 1; штраф за размер пропуска 0,33; и штраф за присоединение 30.

[00058] Примером подходящего алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы подобных последовательностей при использовании последовательных парных выравниваний. Алгоритм также может строить дерево, которое показывает кластеризационные
15 отношения, используемые для создания выравнивания. Неограничивающий пример параметров PILEUP включает вес пропуска по умолчанию 3,00, вес длины пропуска по умолчанию 0,10 и взвешенные концевые пропуски.

[00059] Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST. Неограничивающим примером программы BLAST является программа WU-BLAST-2.
20 В WU-BLAST-2 используются несколько параметров поиска, большинство которых установлено, например, со значениями по умолчанию. Корректируемые параметры устанавливают, например, со следующими значениями: длина перекрытия = 1, доля перекрытия = 0.125, пороговая длина слова (T)=11. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и задаются самой программой в зависимости от
25 состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой проводят поиск представляющей интерес последовательности. Значения можно корректировать для повышения чувствительности.

[00060] Дополнительным подходящим алгоритмом является gapped BLAST. В gapped BLAST используется оценочная матрица замен BLOSUM-62; параметр порогового
30 значения T установлен на 9; метод двойного совпадения для подбора удлинений без пропусков, штраф за длину пропуска k со значением 10+k; X_u установлен на 16, и X_g установлен на 40 для стадии поиска по базе данных и 67 для стадии вывода результата алгоритмов. Выравнивания с пропусками инициируют при оценке, например, приблизительно 22 бита.

35 [00061] Дополнительным подходящим инструментом является Clustal, серия часто используемых компьютерных программ для множественного выравнивания последовательностей. Последние версии Clustal включают ClustalW, ClustalX и Clustal Omega. Параметры по умолчанию для парных выравниваний и вычисления процента идентичности белковых последовательностей при использовании метода Clustal являются
40 следующими: KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 и DIAGONALS SAVED=5. Для нуклеиновых кислот эти параметры являются следующими: KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 и DIAGONALS SAVED=4.

[00062] Мутации могут быть введены в выбранные сайты или случайным образом. Например, неспецифический мутагенез в целевом кодоне или области может давать
45 мутанты, подлежащие скринингу на активность. Методики введения мутаций с заменами в определенные сайты в ДНК, имеющей известную последовательность, включают, например, олигонуклеотид-направленный мутагенез на основе ДНК фага M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов может быть выполнен, например, при использовании

анализов, описанных в настоящем документе.

[00063] Аминокислотные замены могут затрагивать один или множество остатков. Вставки могут составлять, например, от приблизительно 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков или больше. Делеции могут составлять, например, от
 5 приблизительно 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков или больше. Замены, делеции, вставки или их любая комбинация могут присутствовать в тестируемом соединении.

Фрагменты, которые связывают ST2

[00064] ST2 (интерлейкин 1 рецептор-подобный белок 1) является мембраносвязанным
 10 цитокиновым рецептором и представителем семейства рецепторов IL-1. Человеческий ST2 состоит из внеклеточного домена (ECD) длиной 310 аминокислот (ак) с тремя Ig-подобными доменами, 21 ак трансмембранным сегментом и 207 ак эндоплазматическими доменами с внутриклеточным доменом TIR (Tominaga, S. et al., 1992, Biochim. Biophys. Acta 1171:215; и Li, H. et al., 2000, Genomics 67:284). ST2 связывает IL-33 и

15 гетеродимеризуется с аксессуарным белком рецептора IL-1 (1RAcP). В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению включает связывающий фрагмент, который связывает ST2. Фрагмент, который связывает ST2, может быть полипептидом, включающим полноразмерный IL-33 дикого типа, более коротким или более длинным. ST2-связывающий фрагмент может иметь
 20 последовательность IL-33 дикого типа, как показано в SEQ ID NO: 10 (SITGISPITEYL ASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGDG VDGKM LMVTLSPKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPG VFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET) или он может быть вариантом IL-33. Варианты IL-33 могут содержать одну или более замен, делеций или вставок, которые
 25 отличаются от аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа. Остатки обозначены в настоящем документе при использовании однобуквенного аминокислотного кода, после которого указано аминокислотное положение IL-33. Замены обозначены в настоящем документе при использовании однобуквенного аминокислотного кода, после которого указано аминокислотное положение IL-33, а
 30 затем указан однобуквенный код заменяющей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL-33 является последовательностью IL-33 человека, например, из остатков 112-170 последовательности дикого типа.

[00065] Соединения в настоящем документе могут обладать увеличенной или уменьшенной аффинностью к ST2 или к комплексу рецептора ST2-1RAcP. Некоторые
 35 соединения могут обладать увеличенной аффинностью к ST2. Другие соединения могут обладать уменьшенной аффинностью к 1RAcP, что может приводить к снижению способности активировать рецептор IL-33. Соединения в настоящем документе могут демонстрировать повышенную стабильность или биологический эффект по сравнению с IL-33 дикого типа.

40 [00066] Могут быть получены варианты IL-33 с измененной аффинностью к субъединицам рецептора IL-33 ST2 или IL1RAcP. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность IL-33 может быть подвергнута мутации в одном или больше следующих положениях по сравнению с последовательностью IL-33 дикого типа: E119, Y122, D131, E144, Y146, D149, Y163, H246, N222 и N226. В некоторых
 45 вариантах осуществления аминокислотные замены в одном или более из этих положений могут модулировать аффинность IL-33 к ST2. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность IL-33 может быть подвергнута мутации с целью изменения контактов с IL1RAcP: H168, N171, E200, H201, H224, D244, K251 и E261 (все

положения в сравнении с последовательностью IL-33 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены в одном или более из этих положений могут модулировать аффинность IL-33 к IL1RAcP и, таким образом, модулировать способность активировать рецептор.

- 5 [00067] В некоторых вариантах осуществления ST2-связывающий фрагмент включает вариант IL-33, включающий, например, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 61%, по меньшей мере на 62%, по меньшей мере на 63%, по меньшей мере на 64%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 66%, по меньшей мере на 67%, по меньшей мере на 68%, по меньшей мере на 69%, по
10 меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 72%, по меньшей мере на 73%, по меньшей мере на 74%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 76%, по меньшей мере на 77%, по меньшей мере на 78%, по меньшей мере на 79%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по
15 меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10).
- 20 Соединения в настоящем документе включают варианты IL-33, включающие аминокислотную последовательность, которая на 60%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10), например, аминокислотную последовательность, которая на 80%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10), аминокислотную
25 последовательность, которая на 85%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10), аминокислотную последовательность, которая на 90%-99% идентична аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10), или аминокислотную последовательность, которая на 95%-99% идентична аминокислотной
30 последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления ST2-связывающий фрагмент на 100% идентичен аминокислотной последовательности IL-33 дикого типа (SEQ ID NO: 10).

- [00068] ST2-связывающие лиганды могут включать антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител с аффинностью связывания к ST2. При использовании в настоящем
35 документе "антитело" представляет собой белок, который включает по меньшей мере одну определяющую комплементарность область, которая связывается с определенным антигеном-мишенью, например, ST2. Антитело часто содержит по меньшей мере одну переменную область иммуноглобулина, например, аминокислотную последовательность, которая обеспечивает переменный домен иммуноглобулина,
40 или последовательность переменного домена иммуноглобулина. Например, антитело может включать переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно именуемую в настоящем документе как VH), и переменную область легкой (L) цепи (сокращенно именуемую в настоящем документе как VL). В другом примере антитело включает две переменных области тяжелой (H) цепи и две переменных области легкой (L) цепи.
- 45 Легкие цепи иммуноглобулина могут относиться к типам каппа или лямбда. Например, антитело может быть моноклональным антителом, модифицированным антителом, химерным антителом, реконструированным антителом или гуманизированным антителом. Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем

документе относится к популяции молекул антитела, которые содержат только один вид антигенсвязывающего участка, способного к иммунореакции с конкретным эпитопом. Антитела могут быть получены из коммерческих источников или получены при использовании известных методов. Антитело может быть любым типом иммуноглобулина, например, IgG, IgM, IgY, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В варианте осуществления антитело может быть человеческим антителом.

[00069] Антигенсвязывающие фрагменты антитела, подходящие для применения в изобретении, включают, без ограничения перечисленными, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, одноцепочечный Fv, димеризованный фрагмент варибельной области (V-области) (диатело), стабилизированный дисульфидной связью фрагмент V-области (dsFv), аффитела, миметики антител и одну или более выделенных определяющих комплементарность областей (CDR), которые сохраняют специфичное связывание с полезной нагрузкой, например, ST2. При использовании в настоящем документе "выделенная" CDR представляет собой CDR, не находящуюся в природном антителе.

[00070] Поликлональные антитела могут быть получены путем иммунизации подходящего субъекта белком согласно изобретению в качестве иммуногена. Титр антител у иммунизированного субъекта можно отслеживать в динамике с помощью стандартных методов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием иммобилизованного полипептида. В подходящее время после иммунизации, например, когда титры специфического антитела являются наиболее высокими, антитело-продуцирующие клетки могут быть получены у индивида и могут использоваться для получения моноклональных антител (мАт) стандартными методами, такими как метод гибридом, первоначально описанный Колером и Милстейном (Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497), метод гибридом человеческих В-клеток (см. Kozbor et al., 1983, Immunol. Today 4:72), метод EBV-гибридом (см. Cole et al., pp. 77-96 In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985) или методы триом. Технология получения гибридом известна (см. в общем Current Protocols in Immunology, Coligan et al. ed., John Wiley & Sons, New York, 1994). Клетки гибридом, продуцирующие моноклональное антитело согласно изобретению, обнаруживают при скрининге супернатантов культур гибридом на антитела, которые связывают целевой полипептид (т.е. ST2), например, при использовании стандартного анализа ИФА.

[00071] Альтернативно получению гибридом, секретирующих моноклональные антитела, моноклональное антитело, направленное против ST2, может быть идентифицировано и выделено путем скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки иммуноглобулинов (например, библиотеки фагового дисплея антител) с представляющим интерес полипептидом. В продаже доступны наборы для создания и скрининга библиотек фагового дисплея (например, система получения антител Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, номер по каталогу 27-9400-01; и набор для фагового дисплея Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, номер по каталогу 240612). Кроме того, примеры способов и реагентов, особенно подходящих для применения при создании и скрининге библиотеки дисплея антител, можно найти, например, в патенте США 5,223,409; публикации PCT WO 92/18619; публикации PCT WO 91/17271; публикации PCT WO 92/20791; публикации PCT WO 92/15679; публикации PCT WO 93/01288; публикации PCT WO 92/01047; публикации PCT WO 92/09690; публикации PCT WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734.

[00072] Также могут быть получены рекомбинантные антитела, которые специфично связывают ST2. Рекомбинантные антитела включают, без ограничения перечисленными, химерные и гуманизированные моноклональные антитела, включающие как человеческие, так и нечеловеческие фрагменты, одноцепочечные антитела и мультиспецифичные антитела. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части получены из разных видов животных, таких как антитела, имеющие вариабельную область, полученную из мышиногo МАt, и константную область человеческого иммуноглобулина (см., например, Cabilly et al., патент США 4,816,567; и Boss et al., патент США 4,816,397, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.) Одноцепочечные антитела имеют сайт связывания антигена и состоят из одного полипептида. Они могут быть получены с помощью способов, известных в уровне техники, например, при использовании способов, описанных в Ladner et al., патент США 4,946,778 (который полностью включен в настоящий документ посредством отсылки); Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Whitlow et al., (1991) Methods in Enzymology 2:1-9; Whitlow et al., (1991) Methods in Enzymology 2:97-105; и Huston et al. (1991) Methods in Enzymology Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications 203:46-88.

[00073] Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из не относящихся к человеку видов, содержащие одну или более определяющих комплементарность областей (CDR-областей) из не относящихся к человеку видов и каркасную область из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, Queen, патент США 5,585,089, который полностью включен в настоящий документ посредством отсылки). Гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, известных в уровне техники, например, при использовании способов, описанных в публикации PCT WO 87/02671; европейской заявке на патент 184,187; европейской заявке на патент 171,496; европейской заявке на патент 173,494; публикации PCT WO 86/01533; патенте США 4,816,567; европейской заявке на патент 125,023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; и Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214; патенте США 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534; и Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

[00074] В частности, гуманизированные антитела могут быть получены, например, при использовании трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать эндогенные гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, но которые могут экспрессировать гены тяжелых и легких цепей человека. Трансгенных мышей иммунизируют выбранным антигеном, например ST2, стандартным способом. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены при использовании стандартной технологии гибридом. Трансгены иммуноглобулинов человека, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются при дифференцировке В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматической мутации. Таким образом, при использовании такой методики можно получать антитела IgG, IgA и IgE. По поводу обзора этой технологии получения человеческих антител см. Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Для ознакомления с подробным описанием этой технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител, а также методиками получения таких антител см., например, патент США

5,625,126; патент США 5,633,425; патент США 5,569,825; патент США 5,661,016; и патент США 5,545,806. Кроме того, компании могут быть привлечены для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена (например, ST2), при использовании технологии, аналогичной описанной выше.

5 [00075] Полностью человеческие антитела, которые распознают ST2, могут быть получены при использовании методики, называемой "управляемым отбором". В этом методе отобранное нечеловеческое моноклональное антитело, например мышинное антитело, используют для направления отбора полностью человеческого антитела, распознающего такой же эпитоп (Jespers et al., 1994, Bio/technology 12:899-903).

10 [00076] Антитела к ST2 могут быть выделены после продукции (например, из крови или сыворотки субъекта) или синтеза и затем очищены известными способами. Например, IgG антитела могут быть очищены с помощью хроматографии с белком А. Антитела, специфичные к ST2, могут быть отобраны (например, частично очищены) или очищены, например, с помощью аффинной хроматографии. Например,
15 рекомбинантно экспрессированный и очищенный (или частично очищенный) белок ST2 получают и ковалентно или нековалентно связывают с твердым носителем, таким как, например, хроматографическая колонка. Затем колонка может использоваться для аффинной очистки антител, специфичных к ST2, из образца, содержащего антитела, направленные против большого количества разных эпитопов, с получением в результате
20 по существу очищенной композиции антитела, т.е. такой, которая по существу не содержит контаминирующих антител.

[00077] Антитела, которые связывают ST2, известны в уровне техники. Например, в US 2017/0002079 описан ряд ST2-связывающих антител (например, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4 и Ab12-Ab36), направленных против человеческого ST2, которые были получены с
25 применением технологии XENOMOUSE® (патенты США 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15: 146-156; Green and Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495, Kellermann and Green, 2002, Current Opinion in Biotechnology, 13:593-597). См., в частности Пример 2 в US 2017/0002079, который полностью включен в настоящий документ посредством отсылки. Антитела
30 против ST2, направленные против человеческого ST2, также описаны в WO 2012/113813 (например, моноклональное антитело ral70) и патент США 7087396 (например, моноклональные антитела 2A5, FB9 и HB12), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством отсылки. Например, в Примере 1 патента США
35 7087396 описано получение моноклональных антител, направленных против человеческого ST2. Также ST2-связывающие антитела доступны в продаже (например, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, номера по кат. MAB523 и AF523). MAB523 является моноклональным мышинным IgG1 антителом, которое детектирует человеческий ST2. AF523 является аффинно очищенным на антигене поликлональным IgG1 козы, который
40 детектирует человеческий ST2.

Связь между IL-2R-связывающим фрагментом и ST2-связывающим фрагментом

[00078] IL-2R и ST2-связывающие фрагменты связаны. Первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, связаны ковалентно или нековалентно. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент,
45 который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, связаны ковалентно. Например, первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, могут быть ковалентно связаны сульфидной связью или дисульфидной связью. В некоторых вариантах

осуществления соединения, включающее первый фрагмент, который связывается с рецептором IL-2, и второй фрагмент, который связывается с ST2, включает мультимеризационный фрагмент или два мультимеризационных фрагмента, например, Fc-домены. Например, первый мультимеризационный фрагмент может быть ковалентно связан с первым фрагментом, который связывается с рецептором IL-2, и второй мультимеризационный фрагмент может быть ковалентно связан со вторым фрагментом, который связывается с ST2. Два мультимеризационных фрагмента также могут быть ковалентно связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два мультимеризационных фрагмента являются полипептидными последовательностями. Например, в некоторых вариантах осуществления дисульфидная связь ковалентно связывает первый Fc-домен, который ковалентно связан с IL-2R-связывающим фрагментом, и второй Fc-домен, который ковалентно связан с ST2-связывающим фрагментом.

Fc-домены иммуноглобулинов

[00079] В некоторых вариантах осуществления мультимеризационный фрагмент является Fc-доменом иммуноглобулина, например, Fc-доменом иммуноглобулина с ослабленной эффекторной функцией по сравнению с соответствующим Fc-доменом иммуноглобулина дикого типа. Неограничивающими примерами Fc-доменов иммуноглобулинов являются Fc-домены иммуноглобулина IgG, IgA, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления Fc-доменом иммуноглобулина является Fc-домен IgG1 иммуноглобулина.

[00080] Fc-домены иммуноглобулинов обладают многими терапевтическими преимуществами при включении в слитые белки. Например, Fc-домены иммуноглобулина могут увеличивать полупериод существования белка-партнера по слиянию в системном кровотоке. В некоторых вариантах осуществления увеличенный полупериод существования в системном кровотоке обусловлен присутствием Fc-домена, препятствующего агрегации слитого белка, в результате чего повышается его стабильность и замедляется клиренс.

[00081] Четыре субкласса IgG человека различаются по эффекторным функциям (CDC, ADCC), полупериоду существования и стабильности. IgG1 обладает Fc-эффекторными функциями и является наиболее распространенным субклассом IgG. IgG2 дефицитный по Fc-эффекторным функциям, но подвержен как димеризации с другими молекулами IgG2, так и нестабильности из-за образования перекрестных дисульфидных связей в шарнирной области. IgG3 обладает Fc-эффекторными функциями и имеет длинную жесткую шарнирную область. IgG4 дефицитный по Fc-эффекторным функциям и имеет более короткий полупериод существования в кровотоке, чем другие субклассы. Димер IgG4 является биохимически нестабильным из-за присутствия только одной дисульфидной связи в шарнирной области, что приводит к обмену Н-цепей между разными молекулами IgG4. Модификации последовательности Fc могут быть введены в шарнирную область Fc IgG2 для предотвращения агрегации или в шарнирную область Fc IgG4 для стабилизации димеров.

[00082] Могут быть получены дефицитные по эффекторной функции варианты IgG1. Например, аминокислотная замена может быть сделана в положении N297, положении сайта N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления заменой является N297A. Замена этого остатка аспарагина удаляет сайт гликозилирования и значительно уменьшает активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), предотвращая, таким образом, нежелательный лизис клеток.

[00083] Другие возможные дефицитные по эффекторной функции варианты IgG1 могут быть также оценены специалистом. Одним неограничивающим примером такого варианта является IgG1(L234F/L235E/P331S), который содержит мутации аминокислот в участках связывания C1q и FcγR. Такие (или подобные) варианты Fc могут использоваться для создания эффекторно-дефицитных и стабильных IL-2 селективных агонистических Fc-слитых белков (IL2SA-Fc). Формы белковых фрагментов Fc также могут быть сконструированы с целью создания стабильных мономеров, а не димеров. Такие модифицированные белковые фрагменты Fc также могут быть объединены с IL-2 соединением согласно настоящему изобретению. Кроме того, функционально мономерный гетеродимер, включающий полипептид IL-2-Fc Н-цепи, может быть объединен с полипептидом Fc Н-цепи и подвергнут сборке при использовании технологии биспецифичных антител с селективным агонистом IL-2. IL-2 Fc слитые белки также могут быть получены с интактными молекулами IgG антитела, с или без антигенной специфичности во фрагменте IgG. Кроме того, варианты Fc, которые не содержат часть шарнирной области, могут использоваться с соединениями и способами, описанными в настоящем документе.

[00084] В некоторых вариантах осуществления последовательность фрагмента Fc иммуноглобулина является фрагментом Fc IgG1, включающим мутацию N297A, например, последовательностью, показанной ниже: DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 7; мутация N297A выделена полужирным шрифтом и подчеркнута).

[00085] В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fc IgG1 обладает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

[00086] Соединение согласно настоящему изобретению может быть получено при условиях, которые позволяют двум полипептидам Ig формировать Fc-домен. Два полипептида Ig могут быть конъюгированы с разными фрагментами. В некоторых случаях один полипептид IgG конъюгирован с фрагментом IL-2, а второй полипептид Ig связан с фрагментом, который связывает белок клеточной поверхности, отличный от рецептора IL2. В некоторых вариантах осуществления белком клеточной поверхности, связываемым связывающим фрагментом, является ST2.

Линкер

[00087] Связь в точке соединения между Fc-доменом и IL2 рецептор-связывающим фрагментом или ST2-связывающим фрагментом может быть: (1) прямым слиянием двух белковых последовательностей; (2) слиянием с промежуточным линкерным

пептидом; или (3) слиянием с непептидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления линкер непосредственно связывает IL2R-связывающий фрагмент и ST2-связывающий фрагмент. Линкерные пептиды могут быть включены в качестве спейсеров между двумя белковыми фрагментами. Линкерные пептиды могут способствовать
 5 правильному фолдингу белка, стабильности, экспрессии и биоактивности фрагментов, являющихся компонентами белка. Длинные гибкие линкерные пептиды могут состоять из глицина, серина или треонина, при этом множество остатков глицина обеспечивают получение очень гибкой конформации. Остатки серина или треонина обеспечивают область полярной поверхности, ограничивающей гидрофобное взаимодействие в
 10 молекуле пептида или с фрагментами, которые являются компонентами слитого белка. В некоторых вариантах осуществления пептидные линкеры богаты глицином и серином, например, повторы последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 31), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления n
 15 равно 3; т.е. пептидный линкер имеет последовательность GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления IL-2 рецептор-связывающий фрагмент является N-концевым по отношению к линкерному пептиду, а Fc-домен иммуноглобулина является C-концевым по отношению к линкерному пептиду. В некоторых вариантах осуществления IL-2 рецептор-связывающий фрагмент является
 20 C-концевым по отношению к линкерному пептиду, а Fc-домен иммуноглобулина является N-концевым по отношению к линкерному пептиду.

[00088] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер обладает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере
 25 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере
 30 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6.

35 Фармацевтические композиции

[00089] Фармацевтическая композиция изобретения может включать любое соединение, описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает соединение настоящего изобретения с другими химическими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители,
 40 диспергирующие вещества, суспендирующие вещества, загустители и/или вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения настоящего изобретения в организм. Фармацевтические композиции можно вводить в терапевтически эффективных количествах как фармацевтические композиции различными формами и путями, включая, например, внутривенное, подкожное,
 45 внутримышечное, пероральное, парентеральное, глазное, подкожное, трансдермальное, назальное, вагинальное и местное введение.

[00090] Фармацевтическую композицию можно вводить локально, например, путем инъекции соединения непосредственно в орган, необязательно в форме депо или

композиции с замедленным высвобождением, или имплантата. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в форме композиции с быстрым высвобождением, в форме композиции с пролонгированным высвобождением или в форме композиции с промежуточным высвобождением. Форма с быстрым высвобождением может обеспечить немедленное высвобождение. Композиция с пролонгированным высвобождением может обеспечивать контролируемое высвобождение или замедленное отсроченное высвобождение.

[00091] Для перорального введения фармацевтические композиции могут быть изготовлены путем объединения соединения согласно настоящему изобретению с фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами. Такие носители могут использоваться для приготовления жидкостей, гелей, сиропов, настоек или суспензий для приема внутрь субъектом. Неограничивающие примеры растворителей, используемых в растворимой композиции для перорального применения, могут включать воду, этанол, изопропанол, раствор хлорида натрия, физиологический раствор, ДМСО, диметилформамид, калий-фосфатный буфер, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), натрий-фосфатный буфер, буферный раствор 4-2-гидроксиэтил-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), буферный раствор 3-(N-морфолино) пропансульфоновой кислоты (MOPS), буферный раствор пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновой кислоты) (PIPES) и буферный раствор хлорида и цитрата натрия (SSC). Неограничивающие примеры соразтворителей, используемых в растворимой композиции для перорального применения, могут включать сахарозу, мочевины, кремафор, ДМСО и калий-фосфатный буфер.

[00092] Фармацевтические препараты могут быть изготовлены для внутривенного введения. Фармацевтические композиции могут находиться в форме, подходящей для парентерального введения в виде стерильной суспензии, раствора или эмульсии в масляных или водных растворителях, и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. Фармацевтические препараты для парентерального введения включают водные растворы соединения согласно настоящему изобретению в водорастворимой форме. Суспензии соединения настоящего изобретения могут быть приготовлены в виде масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или среды включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или вещества, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. В альтернативе действующее вещество может находиться в форме порошка для восстановления подходящим растворителем, например стерильной апиrogenной водой, перед применением.

[00093] Соединение согласно настоящему изобретению может применяться наружно и может быть включено в различные композиции для наружного применения, такие как растворы, суспензии, лосьоны, гели, пасты, лекарственные стики, бальзамы, кремы и мази. Такие фармацевтические композиции могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, вещества, повышающие тоничность, буферы и консерванты.

[00094] Соединение согласно настоящему изобретению может быть также включено в композиции для ректального введения, такие как клизмы, ректальные гели, ректальная пена, ректальные аэрозоли, суппозитории, гелевые суппозитории или удерживаемые клизмы, содержащие обычные суппозиторные основы, такие как масло какао или другие глицериды, а также синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидон

и ПЭГ. В суппозиторных формах композиций низкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот, необязательно в комбинации с маслом какао, может быть расплавлен.

5 [00095] При практическом осуществлении способов лечения или применения, предложенных в настоящем документе, терапевтически эффективные количества соединений, описанных в настоящем документе, вводят в фармацевтических композициях индивиду, имеющему заболевание или состояние, подлежащее лечению. В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, такое как человек. Терапевтически эффективное количество может изменяться в широких пределах, в 10 зависимости от тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта, эффективности используемых соединений и других факторов. Соединения могут применяться отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами в качестве компонентов смесей.

15 [00096] Фармацевтические композиции могут быть изготовлены при использовании одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих вспомогательные вещества и добавки, которые облегчают технологическую обработку соединения согласно настоящему изобретению с получением препаратов, которые могут применяться фармацевтически. Состав композиции может быть изменен в зависимости от выбранного пути введения. Фармацевтические композиции, содержащие 20 соединение, описанное в настоящем документе, могут быть изготовлены, например, при использовании процессов смешивания, растворения, эмульгирования, инкапсулирования, заключения или прессования.

[00097] Фармацевтические композиции могут включать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество 25 и соединения, описанные в настоящем документе в форме свободного основания или фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтические композиции могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, повышающие тоничность вещества, буферы и консерванты.

[00098] Способы получения композиций, включающих соединения, описанные в 30 настоящем документе, включают смешивание соединений с одним или более инертными фармацевтически приемлемыми наполнителями или носителями с получением твердой, полутвердой или жидкой композиции. Твердые композиции включают, например, порошки, таблетки, диспергируемые гранулы, капсулы и облатки. Жидкие композиции включают, например, растворы, в которых растворено соединение, эмульсии, 35 содержащие соединение, или раствор, содержащий липосомы, мицеллы или наночастицы, содержащие соединение, раскрытое в настоящем документе. Полутвердые композиции включают, например, гели, суспензии и кремы. Композиции могут быть в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед применением, или в виде эмульсий. Такие композиции 40 также могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, pH-буферные вещества и другие фармацевтически приемлемые добавки.

[00099] Неограничивающие примеры лекарственных форм, подходящих для применения в изобретении, включают жидкость, порошок, гель, наносуспензию, 45 наночастицы, микрогель, водные или масляные суспензии, эмульсию и их любую комбинацию.

[000100] Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, подходящих для применения в изобретении, включают

связующие вещества, разрыхлители, антиадгезивы, антистатические вещества, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, вещества для получения покрытия, красители, пластификаторы, консерванты, суспендирующие вещества, эмульгирующие вещества, противомикробные вещества, сферонизирующие вещества и их любые комбинации.

[000101] Композиция согласно изобретению может быть, например, формой с немедленным высвобождением или лекарственной формой с контролируемым высвобождением. Лекарственная форма с немедленным высвобождением может иметь такой состав, который позволяет соединениям действовать быстро. Неограничивающие примеры лекарственных форм с немедленным высвобождением включают легкорастворимые лекарственные формы. Лекарственная форма с контролируемым высвобождением может быть фармацевтической композицией, которая была адаптирована таким образом, что скорости высвобождения и профили высвобождения действующего вещества могут соответствовать физиологическим и хронотерапевтическим требованиям или, в альтернативе, была изготовлена с таким составом, который обеспечивает высвобождение действующего вещества с заданной скоростью. Неограничивающие примеры лекарственных форм с контролируемым высвобождением включают гранулы, гранулы с отсроченным высвобождением, гидрогели (например, синтетического или природного происхождения), другие желирующие вещества (например, гелеобразующие пищевые волокна), лекарственные формы на основе матрицы (например, лекарственные формы, содержащие полимерный материал, через который диспергировано по меньшей мере одно действующее вещество), гранулы в матрице, полимерные смеси и гранулированные массы.

[000102] В некоторых случаях лекарственная форма с контролируемым высвобождением является лекарственной формой с отсроченным высвобождением. Форма с отсроченным высвобождением может иметь состав для задержки действия соединения на длительный период времени. Форма с отсроченным высвобождением может иметь состав для задержки высвобождения эффективной дозы одного или более соединений, например, на приблизительно 4, приблизительно 8, приблизительно 12, приблизительно 16 или приблизительно 24 часа.

[000103] Лекарственная форма с контролируемым высвобождением может быть формой с замедленным высвобождением. Форма с замедленным высвобождением может иметь состав для замедления, например, действия соединения в течение длительного периода времени. Форма с замедленным высвобождением может иметь состав для обеспечения эффективной дозы любого соединения, описанного в настоящем документе (например, для обеспечения физиологически эффективного профиля в крови), в течение приблизительно 4, 8, 12, 16 или 24 часов.

[000104] Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ можно найти, например, в справочниках Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), каждый из которых полностью включен посредством отсылки.

[000105] Множество лекарственных средств могут вводить в любом порядке или одновременно. В некоторых вариантах осуществления соединение согласно изобретению вводят в комбинации с антибиотиком, до или после антибиотика. При одновременном

введении несколько лекарственных средств могут быть предоставлены в единой стандартной форме или во множестве форм, например, в виде множества отдельных таблеток. Средства могут быть упакованы вместе или по отдельности, в одной упаковке или во множестве упаковок. Одно или все лекарственные средства могут вводить во множестве доз. При раздельном введении интервал времени между несколькими дозами может изменяться вплоть до примерно месяца.

[000106] Лекарственные средства, описанные в настоящем документе, могут вводить до, во время или после возникновения заболевания или состояния, при этом время введения композиции, содержащей лекарственное средство, может изменяться.

Например, композиции могут применять в качестве профилактического средства и могут вводить непрерывно субъектам со склонностью к развитию состояний или заболеваний для уменьшения вероятности возникновения заболевания или состояния. Композиции могут вводить индивиду во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение лекарственных средств могут начинать в течение первых 48 часов после появления симптомов, в течение первых 24 часов после появления симптомов, в течение первых 6 часов после появления симптомов или в течение 3 часов после появления симптомов. Первичное введение могут осуществлять любым практическим путем, таким как любой путь, описанный в настоящем документе, с использованием любой лекарственной формы, описанной в настоящем документе. Лекарственное средство могут вводить настолько быстро, насколько это практически осуществимо, после обнаружения или подозрения наличия заболевания или состояния, и в течение периода времени, необходимого для лечения заболевания, такого как, например, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 3 месяцев. Продолжительность лечения может изменяться для каждого субъекта.

[000107] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в единичных дозированных лекарственных формах, подходящих для однократного введения точных доз. В стандартной лекарственной форме композиция разделена на стандартные дозы, содержащие подходящие количества одного или более соединений. Стандартная доза может быть в форме упаковки, содержащей отдельные количества композиции. Неограничивающими примерами являются упакованные препараты для инъекций, флаконы или ампулы. Водные суспензионные композиции могут быть упакованы в однодозовые контейнеры, не допускающие повторного закрывания. Многодозовые контейнеры с возможностью повторного закрывания могут использоваться, например, в комбинации с консервантом или без него. Композиции для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с консервантом.

[000108] Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут применять вместе с другими терапиями, например, химиотерапией, радиацией, хирургией, противовоспалительными средствами и отдельными витаминами. Другие средства могут вводить до, после или параллельно с фармацевтическими композициями.

[000109] В зависимости от предполагаемого способа введения фармацевтические композиции могут быть в форме твердых, полу твердых или жидких лекарственных форм, таких как, например, таблетки, суппозитории, пилюли, капсулы, порошки, жидкости, суспензии, лосьоны, кремы или гели, например, в единичной лекарственной форме, подходящей для однократного введения точной дозы.

[000110] Для твердых композиций нетоксичные твердые носители включают, например, фармацевтические сорта манита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, талька, целлюлозы, глюкозы, сахарозы и карбоната магния.

[000111] Неограничивающие примеры лекарственных форм, подходящих для применения в настоящем описании, включает жидкость, настойку, наносуспензию, водные или масляные суспензии, капли, сиропы и их любую комбинацию.

Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, подходящих для применения в настоящем описании, включает гранулирующие вещества, связующие вещества, смазывающие вещества, разрыхляющие вещества, подсластители, скользящие вещества, антиадгезивы, антистатические вещества, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, камеди, вещества для получения покрытия, красители, ароматизаторы, пластификаторы, консерванты, суспендирующие вещества, эмульгирующие вещества, растительный целлюлозный материал и сферонизирующие вещества, и их любую комбинацию.

[000112] Композиции согласно изобретению могут быть упакованы в виде набора. В некоторых вариантах осуществления набор включает письменные инструкции по введению/применению композиции. Письменный материал может быть, например, этикеткой. В письменном материале могут быть предложены условия и методы введения. Инструкции предоставляют индивиду и наблюдающему врачу наилучшие рекомендации по достижению оптимального клинического результата от применения терапии. Письменный материал может быть этикеткой. В некоторых вариантах осуществления этикетка может быть одобрена регулирующим органом, например, Управлением по контролю качества продуктов и лекарственных средств США (FDA), Европейским агентством по лекарственным средствам (ЕМА) или другими регулирующими органами.

Заболевания

[000113] Соединения согласно настоящему изобретению могут применяться при различных аутоиммунных или иммуно-ассоциированных заболеваниях или состояниях, например для лечения таких заболеваний или состояний. Например, в настоящем описании предложен способ лечения состояния, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления соединение, вводимое индивиду, включает первый фрагмент, который связывает IL-2R, и второй фрагмент, который связывает ST2, где первый фрагмент ковалентно связан через линкер с первым Fc-доменом, а второй фрагмент ковалентно связан через линкер со вторым Fc-доменом, и при этом первый и второй Fc-домены ковалентно связаны, и, кроме того, где первый и второй Fc-домены обладают ослабленными эффекторными функциями.

[000114] Аутоиммунные заболевания включают заболевания, которые поражают органы, такие как сердце, почку, печень, легкое, репродуктивные органы, пищеварительную систему или кожу. Аутоиммунные заболевания включают заболевания, которые поражают железы, включая эндокринные железы, надпочечники, щитовидную железу, слюнные и экзокринные железы, и поджелудочную железу. Аутоиммунные заболевания могут быть также полигландулярными. Аутоиммунные заболевания могут поражать одну или более тканей, например, соединительную ткань, мышцы или кровь. Аутоиммунные заболевания могут поражать нервную систему или глаза, уши или сосудистую систему. Аутоиммунные заболевания также могут быть системными, поражая множество органов, тканей и/или систем. В некоторых вариантах осуществления иммуно-ассоциированное заболевание или состояние является воспалительным заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или состояние является таким, которое вовлекает воспаленную мышцу, висцеральный жир, толстую кишку и/или ткань легкого.

[000115] В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано

из группы, состоящей из реакции трансплантат против хозяина, вульгарной пузырчатки, системной красной волчанки, склеродермии, язвенного колита, болезни Крона, псориаза, диабета 1-го типа, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза, очаговой алопеции, увеита, оптиконевромиелита и миодистрофии Дюшенна.

5 [000116] В некоторых вариантах осуществления соединения согласно настоящему изобретению лечат заболевания, поражающие мышечную ткань, например, воспалительные миопатии, мышечные дистрофии, мышечные заболевания с участием иммунной системы и мышечные заболевания, включающие воспаление.

10 [000117] Воспалительные миопатии - это заболевания, которые обычно включают воспаление мышц и связанные с ним симптомы, такие как мышечная слабость. Мышечная слабость может быть прогрессирующей. Симптомы, связанные с воспалительными миопатиями (например, дерматомиозит), могут включать, например, мышечную слабость (например, слабость проксимальных мышц), кожную сыпь, усталость после ходьбы или стояния, спотыкание или падение, дисфагию, дисфонию, 15 затрудненное дыхание, мышечную боль, слабые мышцы, потерю веса, субфебрильную температуру, воспаленные легкие, чувствительность к свету, отложения кальция (кальциноз) под кожей или в мышцах и сопутствующие биологические проявления воспалительных миопатий.

[000118] Воспалительные миопатии могут быть вызваны аллергическими реакциями, 20 другими заболеваниями, воздействием лекарственного средства или токсина или воздействием инфекционного агента, или могут быть идиопатическими (с неизвестной причиной). Воспалительная миопатия может быть острой воспалительной миопатией или хронической воспалительной миопатией. Воспалительные миопатии могут поражать как взрослых, так и детей (например, ювенильный дерматомиозит). Воспалительные 25 миопатии могут включать симптомы, которые влияют на другие органы или системы организма, такие как кожу, легкие, сердце, глаза и желудочно-кишечную систему. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия является хронической воспалительной миопатией (например, дерматомиозитом, полимиозитом или миозитом с тельцами включения).

30 [000119] В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия может быть вызвана аллергической реакцией, другим заболеванием (например, раком или коллагенозом), воздействием токсичного вещества, лекарственного средства или возбудителя инфекции (например, вируса). В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия связана с волчанкой, ревматоидным артритом или системным 35 склерозом. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия является идиопатической. В некоторых вариантах осуществления воспалительная миопатия выбрана из полимиозита, дерматомиозита, миозита с тельцами включения и иммуноопосредованной некротической миопатии. В некоторых вариантах осуществления воспалительной миопатией является дерматомиозит.

40 [000120] Сопутствующие биологические проявления воспалительных миопатий (например, дерматомиозита) включают, например, измененные (например, повышенные) уровни цитокинов (например, интерферонов I типа (таких как IFN- α и/или IFN- β), интерлейкинов (таких как IL-6, IL-10, IL-15, IL-17 и IL-18), и TNF- α), TGF- β , активирующего фактора В-клеток (BAFF) и повышенную экспрессию IFN-индуцируемых 45 генов (например, IFN-индуцируемых генов I типа). Другие сопутствующие биологические проявления воспалительных миопатий могут включать, например, увеличенную скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и/или повышенный уровень креатинкиназы. Другие сопутствующие биологические проявления воспалительных миопатий могут включать

аутоантитела, например, аутоантитела против синтетазы (например, антитела против Jo1), антитела против частицы распознавания сигнала (антитела против SRP), антитела против Mi-2, антитела против p155, антитела против PM/Sci и антитела против RNP.

[000121] Мышечные дистрофии являются группой разнообразных наследственных нейромышечных нарушений, которые представляют собой группу тяжелых нейромышечных заболеваний, характеризующихся первичным или вторичным поражением скелетных мышц. Примеры мышечных дистрофий включают, без ограничения перечисленными, миодистрофию Дюшенна, миодистрофию Беккера, тазово-плечевую мышечную дистрофию, фациоскапулохумеральную мышечную дистрофию, врожденную мышечную дистрофию Фукуямы и мерозин-дефицитную врожденную мышечную дистрофию. Наиболее распространенной формой мышечной дистрофии является миодистрофия Дюшенна (МДД). МДД - X-сцепленное рецессивное заболевание, характеризующееся мутацией в гене, который кодирует дистрофин. Большинство пациентов умирают до 30 лет из-за дыхательной или сердечной недостаточности. Миодистрофия Беккера (также известная как доброкачественная псевдогипертрофическая мышечная дистрофия) сходна с МДД тем, что оба заболевания являются результатом мутации в гене дистрофина. Организм, страдающий МДД, не продуцирует функциональный дистрофин. При этом МДД гораздо более тяжелое заболевание, чем МДБ.

Индивиды

[000122] Соединения согласно настоящему изобретению вводят индивиду, такому как позвоночное. В некоторых вариантах осуществления субъектом является мышь, крыса, кролик, собака, кошка, лошадь, овца, корова, обезьяна, яванский макак или человек. Субъектами могут быть, например, пожилые люди, взрослые, подростки, дети предпоздкового возраста, дети, дети раннего возраста и младенцы. В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой модель воспалительной миопатии на животных. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек с воспалительной миопатией или человек с риском развития воспалительной миопатии. В некоторых вариантах индивид имеет случай воспалительной миопатии у близких родственников. В некоторых вариантах осуществления индивид является носителем гена, связанного с воспалительной миопатией. В некоторых вариантах осуществления индивид является положительным на биомаркер, связанный с воспалительной миопатией. В некоторых вариантах у индивида была диагностирована воспалительная миопатия. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет один или более признаков или симптомов, связанных с воспалительной миопатией, например, один или более симптомов, описанных в настоящем документе.

[000123] В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой модель мышечной дистрофии на животных. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человеком с мышечной дистрофией или человеком с риском развития мышечной дистрофии. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет случай мышечной дистрофии у близких родственников. В некоторых вариантах осуществления индивид является носителем гена, связанного с мышечной дистрофией. В некоторых вариантах осуществления индивид является положительным на биомаркер, связанный с мышечной дистрофией. В некоторых вариантах осуществления у индивида была диагностирована мышечная дистрофия. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет один или более признаков или симптомов, связанных с мышечной дистрофией, например, один или более симптомов, описанных в настоящем документе.

Введение доз

[000124] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут находиться в единичных лекарственных формах, подходящих для однократного введения точных доз. В единичной лекарственной форме композиция разделена на стандартные дозы, содержащие подходящие количества одного или более соединений. Единичная
 5 доза может быть в форме пакета, содержащего дискретные количества композиции. Неограничивающими примерами являются жидкости во флаконах или ампулах. Водные суспензионные композиции могут быть упакованы в однодозовые контейнеры, не допускающие повторного закрывания. Многодозовые контейнеры с возможностью повторного закрывания могут использоваться, например, в комбинации с консервантом.
 10 Композиции для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с консервантом.

[000125] Соединение, описанное в настоящем документе, может присутствовать в композиции в диапазоне от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 7000 мкг, от
 15 приблизительно 1 мкг до приблизительно 1000 мкг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 250 мкг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 25 мкг, от приблизительно 5 мкг до приблизительно 50 мкг, от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 15 мкг или от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 10 мкг на дозу.

[000126] Соединение, описанное в настоящем документе, может присутствовать в
 20 композиции в количестве приблизительно 0,5 мкг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 2 мкг, приблизительно 3 мкг, приблизительно 4 мкг, приблизительно 5 мкг, приблизительно 6 мкг, приблизительно 7 мкг, приблизительно 8 мкг, приблизительно 9 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 11 мкг, приблизительно 12 мкг, приблизительно 13 мкг, приблизительно 14 мкг, приблизительно 15 мкг, приблизительно
 25 16 мкг, приблизительно 17 мкг, приблизительно 18 мкг, приблизительно 19 мкг, приблизительно 20 мкг, приблизительно 21 мкг, приблизительно 22 мкг, приблизительно 23 мкг, приблизительно 24 мкг, приблизительно 25 мкг, приблизительно 26 мкг, приблизительно 27 мкг, приблизительно 28 мкг, приблизительно 29 мкг, приблизительно 30 мкг, приблизительно 31 мкг, приблизительно 32 мкг, приблизительно 33 мкг,
 30 приблизительно 34 мкг, приблизительно 35 мкг, приблизительно 36 мкг, приблизительно 37 мкг, приблизительно 38 мкг, приблизительно 39 мкг, приблизительно 40 мкг, приблизительно 41 мкг, приблизительно 42 мкг, приблизительно 43 мкг, приблизительно 44 мкг, приблизительно 45 мкг, приблизительно 46 мкг, приблизительно 47 мкг, приблизительно 48 мкг, приблизительно 49 мкг, приблизительно 50 мкг, приблизительно
 35 55 мкг, приблизительно 60 мкг, приблизительно 65 мкг, приблизительно 70 мкг, приблизительно 75 мкг, приблизительно 80 мкг, приблизительно 85 мкг, приблизительно 90 мкг, приблизительно 95 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 125 мкг, приблизительно 150 мкг, приблизительно 175 мкг, приблизительно 200 мкг, приблизительно 250 мкг, приблизительно 300 мкг, приблизительно 350 мкг,
 40 приблизительно 400 мкг, приблизительно 450 мкг, приблизительно 500 мкг, приблизительно 550 мкг, приблизительно 600 мкг, приблизительно 650 мкг, приблизительно 700 мкг, приблизительно 750 мкг, приблизительно 800 мкг, приблизительно 850 мкг, приблизительно 900 мкг, приблизительно 950 мкг, приблизительно 1000 мкг, приблизительно 1050 мкг, приблизительно 1100 мкг,
 45 приблизительно 1150 мкг, приблизительно 1200 мкг, приблизительно 1250 мкг, приблизительно 1300 мкг, приблизительно 1350 мкг, приблизительно 1400 мкг, приблизительно 1450 мкг, приблизительно 1500 мкг, приблизительно 1550 мкг, приблизительно 1600 мкг, приблизительно 1650 мкг, приблизительно 1700 мкг,

приблизительно 1750 мкг, приблизительно 1800 мкг, приблизительно 1850 мкг, приблизительно 1900 мкг, приблизительно 1950 мкг, приблизительно 2000 мкг, приблизительно 2500 мкг, приблизительно 3000 мкг, приблизительно 3500 мкг, приблизительно 4000 мкг, приблизительно 4500 мкг, приблизительно 5000 мкг, 5 приблизительно 5500 мкг, приблизительно 6000 мкг, приблизительно 6500 мкг, приблизительно 7000 мкг, приблизительно 7500 мкг, приблизительно 8000 мкг, приблизительно 9000 мкг, приблизительно 10000 мкг (10 мг), приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, 10 приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 21 мг, приблизительно 22 мг, приблизительно 23 мг, приблизительно 24 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 26 мг, приблизительно 27 мг, приблизительно 28 мг, приблизительно 29 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 31 мг, приблизительно 32 мг, приблизительно 33 мг, приблизительно 34 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 15 36 мг, приблизительно 37 мг, приблизительно 38 мг, приблизительно 39 мг или приблизительно 40 мг. Любое из этих значений может использоваться для определения диапазона для количества соединения в композиции. Например, соединение может присутствовать в композиции в диапазоне от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 40 мг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 10 мг или от приблизительно 50 20 мкг до приблизительно 5 мг.

[000127] В некоторых вариантах осуществления доза может быть выражена в количестве лекарственного средства, разделенном на массу индивида, например, в микрограммах или миллиграммах лекарственного средства на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят в дозе 25 приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 2 мкг/кг, приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 4 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 6 мкг/кг, приблизительно 7 мкг/кг, приблизительно 8 мкг/кг, приблизительно 9 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 11 мкг/кг, приблизительно 12 мкг/кг, приблизительно 13 мкг, приблизительно 14 мкг/кг, 30 приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 16 мкг/кг, приблизительно 17 мкг/кг, приблизительно 18 мкг/кг, приблизительно 19 мкг/кг, приблизительно 20 мкг/кг, приблизительно 25 мкг/кг, приблизительно 30 мкг/кг, приблизительно 35 мкг/кг, приблизительно 40 мкг/кг, приблизительно 45 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 55 мкг/кг, приблизительно 60 мкг/кг, приблизительно 65 мкг/кг, 35 приблизительно 70 $\mu\text{g/kg}$, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 80 мкг/кг, приблизительно 85 мкг/кг, приблизительно 90 мкг/кг, приблизительно 95 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, приблизительно 125 мкг/кг, приблизительно 150 мкг/кг, приблизительно 175 мкг/кг, приблизительно 200 мкг/кг, приблизительно 250 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 350 мкг/кг, приблизительно 400 мкг/кг, 40 приблизительно 450 мкг/кг, приблизительно 500 мкг/кг, приблизительно 550 мкг/кг, приблизительно 600 мкг/кг, приблизительно 650 мкг/кг, приблизительно 700 мкг/кг, приблизительно 750 мкг/кг, приблизительно 800 мкг/кг, приблизительно 850 мкг/кг, приблизительно 900 мкг/кг, приблизительно 950 мкг/кг, приблизительно 1000 мкг/кг, приблизительно 1050 мкг/кг, приблизительно 1100 мкг/кг, приблизительно 1150 мкг/ 45 кг, приблизительно 1200 мкг/кг, приблизительно 1250 мкг/кг, приблизительно 1300 мкг/кг, приблизительно 1350 мкг/кг, приблизительно 1400 мкг/кг, приблизительно 1450 мкг/кг, приблизительно 1500 мкг/кг, приблизительно 1550 мкг/кг, приблизительно 1600 мкг/кг, приблизительно 1650 мкг/кг, приблизительно 1700 мкг/кг, приблизительно 1750 мкг/

кг, приблизительно 1800 мкг/кг, приблизительно 1850 мкг/кг, приблизительно 1900 мкг/кг, приблизительно 1950 мкг/кг, приблизительно 2000 мкг/кг, приблизительно 2500 мкг/кг, приблизительно 3000 мкг/кг, приблизительно 3500 мкг/кг, приблизительно 4000 мкг/кг, приблизительно 4500 мкг/кг или приблизительно 5000 мкг/кг. Любое из этих значений может использоваться для определения диапазона дозы соединения. Например, в некоторых вариантах осуществления, соединение вводят в дозе в пределах от приблизительно 0,5 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг, от 1 мкг/кг до приблизительно 200 мкг/кг, от 5 мкг/кг до приблизительно 150 мкг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 50 мкг/кг, от приблизительно 15 мкг/кг до приблизительно 35 мкг/кг или от приблизительно 0,5 мкг/кг до приблизительно 5000 мкг/кг.

[000128] Раскрытые соединения могут вводить с любым требуемым интервалом. Например, соединение могут вводить один раз в неделю, 2 раза в неделю, 3 раза в неделю, 4 раза в неделю, 5 раз в неделю, 6 раз в неделю, 7 раз в неделю, 8 раз в неделю, 9 раз в неделю или 10 раз в неделю. Интервал между ежедневным дозированием может быть любым часовым интервалом, например, каждый час, каждые 2 часа, каждые 3 часа, каждые 4 часа, каждые 5 часов, каждые 6 часов, каждые 7 часов, каждые 8 часов, каждые 9 часов, каждые 10 часов, каждые 11 часов или каждые 12 часов. Соединение могут вводить один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель или один раз в 8 недель. Введение соединения могут производить согласно схемам нерегулярного введения, которые зависят либо от лица, выполняющего введение соединения, либо от субъекта, которому вводят соединение. Фактически, соединение могут вводить, например, один раз в день, два раза в день или три раза в день.

[000129] Вводимое количество может быть одинаковым количеством для каждой дозы, или доза может изменяться. Например, первое количество можно вводить утром, а второе количество можно вводить вечером. Индивид может получить высокую первую дозу и более низкие последующие дозы. Дозу можно повышать или понижать в зависимости от улучшения симптомов или маркеров заболевания, или развития нежелательных реакций.

[000130] Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера и раствор декстрозы. Жидкие носители могут использоваться при приготовлении растворов, суспензий и эмульсий. Описанное в настоящем документе соединение может быть растворено или суспензировано в фармацевтически приемлемом жидком носителе, таком как вода, органический растворитель или их смесь, или в фармацевтически приемлемых маслах или жирах. Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтические добавки, такие как солюбилизаторы, эмульгаторы, буферы, консерванты, подсластители, ароматизаторы, суспендирующие вещества, загустители, красители, регуляторы вязкости, стабилизаторы и осморегуляторы. Примеры жидких носителей для парентерального введения включают воду, спирты (в том числе одноатомные спирты и многоатомные спирты, например, гликоли) и их производные, а также масла (например, фракционированное кокосовое масло и арахисовое масло). В случае парентерального введения носитель может быть сложным эфиром жирной кислоты, таким как этилолеат или изопропилмиристат. Стерильные жидкие носители используются в композициях в форме стерильных жидкостей для парентерального введения. Показатель pH раствора может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 8, например, от приблизительно 7 до приблизительно 7,5.

[000131] В некоторых вариантах осуществления лечение молекулой согласно настоящему изобретению переносится лучше, чем лечение полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления лечение терапевтически эффективной дозой молекулы согласно настоящему изобретению вызывает меньше случаев диареи по сравнению с лечением IL2(C125S). В некоторых вариантах осуществления лечение терапевтически эффективным количеством молекулы согласно настоящему изобретению не вызывает синдром капиллярной утечки. В некоторых вариантах осуществления лечение терапевтически эффективным количеством молекулы согласно настоящему изобретению не приводит к снижению активности нейтрофилов или повышенному риску инфекции.

[000132] Соединения согласно настоящему изобретению имеют высокую, среднюю или низкую аффинность к рецептору IL-2. Соединения согласно настоящему изобретению имеют высокую, среднюю или низкую аффинность к ST2. Соединение, которое обладает средней или низкой аффинностью к IL2R и ST2 по отдельности, может иметь высокую avidность, когда оба рецептора присутствуют на клетке. Соединение согласно настоящему изобретению имеет константу диссоциации (K_d), например, от приблизительно 1 пмоль до приблизительно 1 ммоль, от приблизительно 10 пмоль до приблизительно 1 ммоль, от приблизительно 100 пмоль до приблизительно 1 ммоль, от приблизительно 1 мкмоль до приблизительно 1 ммоль, от приблизительно 10 мкмоль до приблизительно 1 ммоль, от приблизительно 1 мкмоль до приблизительно 100 мкмоль, от приблизительно 1 мкмоль до приблизительно 500 мкмоль, от приблизительно 200 мкмоль до приблизительно 800 мкмоль, от приблизительно 10 мкмоль до приблизительно 100 мкмоль или от приблизительно 500 мкмоль до приблизительно 1 ммоль для связывания с ST2 или с IL2R в отдельности. Соединение согласно настоящему изобретению может иметь более низкую кажущуюся K_d при связывании с ST2 и с IL-2R, например, меньше 95%, меньше 90%, меньше 85%, меньше 80%, меньше 75%, меньше 70%, меньше 65%, меньше 60%, меньше 55%, меньше 50%, меньше 45%, меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 4%, меньше 3%, меньше 2% или меньше 1% от индивидуальной K_d .

30 Фармакокинетика

[000133] Дозу можно модулировать для достижения требуемого фармакокинетического (ФК) или фармакодинамического профиля, такого как требуемый или эффективный профиль в крови, как описано в настоящем документе.

[000134] Фармакокинетические и фармакодинамические данные могут быть получены с помощью различных экспериментальных методик. Соответствующие компоненты фармакокинетического и фармакодинамического профиля, описывающие конкретную композицию, могут варьировать вследствие различий метаболизма лекарственных соединений у людей. Фармакокинетические и фармакодинамические профили могут быть основаны на определении средних показателей в группе субъектов. Группа субъектов включает любое обоснованное количество субъектов, подходящих для определения репрезентативного среднего значения, например, 5 субъектов, 10 субъектов, 15 субъектов, 20 субъектов, 25 субъектов, 30 субъектов, 35 субъектов или больше. Среднее значение определяют, например, путем вычисления среднего значения на основе всех измерений у индивида для каждого измеряемого показателя. Дозу можно модулировать с целью достижения требуемого фармакокинетического или фармакодинамического профиля, такого как требуемый или эффективный профиль в крови, как описано в настоящем документе.

[000135] Фармакодинамические параметры могут быть любыми параметрами,

подходящими для описания композиций изобретения. Например, фармакодинамический профиль может быть получен в определенное время после введения дозы, например, приблизительно ноль минут, приблизительно 1 минуты, приблизительно 2 минут, приблизительно 3 минут, приблизительно 4 минут, приблизительно 5 минут, 5 приблизительно 6 минут, приблизительно 7 минут, приблизительно 8 минут, приблизительно 9 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 11 минут, приблизительно 12 минут, приблизительно 13 минут, приблизительно 14 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 16 минут, приблизительно 17 минут, приблизительно 18 минут, приблизительно 19 минут, приблизительно 20 минут, 10 приблизительно 21 минуты, приблизительно 22 минут, приблизительно 23 минут, приблизительно 24 минут, приблизительно 25 минут, приблизительно 26 минут, приблизительно 27 минут, приблизительно 28 минут, приблизительно 29 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 31 минуты, приблизительно 32 минут, приблизительно 33 минут, приблизительно 34 минут, приблизительно 35 минут, 15 приблизительно 36 минут, приблизительно 37 минут, приблизительно 38 минут, приблизительно 39 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 41 минуты, приблизительно 42 минут, приблизительно 43 минут, приблизительно 44 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 46 минут, приблизительно 47 минут, приблизительно 48 минут, приблизительно 49 минут, приблизительно 50 минут, 20 приблизительно 51 минуты, приблизительно 52 минут, приблизительно 53 минут, приблизительно 54 минут, приблизительно 55 минут, приблизительно 56 минут, приблизительно 57 минут, приблизительно 58 минут, приблизительно 59 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно ноль часов, приблизительно 0,5 часа, приблизительно 1 часа, приблизительно 1,5 часа, приблизительно 2 часов, 25 приблизительно 2,5 часа, приблизительно 3 часов, приблизительно 3,5 часа, приблизительно 4 часов, приблизительно 4,5 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 5,5 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 6,5 часа, приблизительно 7 часов, приблизительно 7,5 часа, приблизительно 8 часов, приблизительно 8,5 часа, приблизительно 9 часов, приблизительно 9,5 часа, 30 приблизительно 10 часов, приблизительно 10,5 часа, приблизительно 11 часов, приблизительно 11,5 часа, приблизительно 12 часов, приблизительно 12,5 часа, приблизительно 13 часов, приблизительно 13,5 часа, приблизительно 14 часов, приблизительно 14,5 часа, приблизительно 15 часов, приблизительно 15,5 часа, приблизительно 16 часов, приблизительно 16,5 часа, приблизительно 17 часов, 35 приблизительно 17,5 часа, приблизительно 18 часов, приблизительно 18,5 часа, приблизительно 19 часов, приблизительно 19,5 часа, приблизительно 20 часов, приблизительно 20,5 часа, приблизительно 21 часа, приблизительно 21,5 часа, приблизительно 22 часов, приблизительно 22,5 часа, приблизительно 23 часов, приблизительно 23,5 часа, приблизительно 24 часов, приблизительно 2 дней, 40 приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней или приблизительно 14 дней.

[000136] Фармакокинетические параметры могут быть любыми параметрами, 45 подходящими для описания соединения. C_{\max} может составлять, например, не меньше чем приблизительно 1 нг/мл; не меньше чем приблизительно 5 нг/мл; не меньше чем приблизительно 10 нг/мл; не меньше чем приблизительно 15 нг/мл; не меньше чем приблизительно 20 нг/мл; не меньше чем приблизительно 25 нг/мл; не меньше чем

приблизительно 50 нг/мл; не меньше чем приблизительно 75 нг/мл; не меньше чем приблизительно 100 нг/мл; не меньше чем приблизительно 200 нг/мл; не меньше чем приблизительно 300 нг/мл; не меньше чем приблизительно 400 нг/мл; не меньше чем приблизительно 500 нг/мл; не меньше чем приблизительно 600 нг/мл; не меньше чем

5 приблизительно 700 нг/мл; не меньше чем приблизительно 800 нг/мл; не меньше чем приблизительно 900 нг/мл; не меньше чем приблизительно 1000 нг/мл; не меньше чем приблизительно 1250 нг/мл; не меньше чем приблизительно 1500 нг/мл; не меньше чем приблизительно 1750 нг/мл; не меньше чем приблизительно 2000 нг/мл; не меньше чем приблизительно 2500 нг/мл; или являться любыми другими C_{\max} , подходящими для

10 описания фармакокинетического профиля соединения, описанного в настоящем документе. C_{\max} может составлять, например, от приблизительно 5 до приблизительно 10000 нг/мл, от приблизительно 50 до приблизительно 10000 нг/мл, от приблизительно 500 до приблизительно 10000 нг/мл, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000 нг/мл, от приблизительно 1000

15 до приблизительно 3000 нг/мл, от приблизительно 5000 до приблизительно 8000 нг/мл или от приблизительно 500 до приблизительно 1000 нг/мл в крови, при введении путем внутривенной инъекции, например, в дозе 50 мкг/кг. C_{\max} может быть, например, приблизительно 5 до приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 50 до приблизительно 500 нг/мл, приблизительно 100 до приблизительно 250 нг/мл, приблизительно 1000 до

20 приблизительно 5000 нг/мл, приблизительно 1000 до приблизительно 2000 нг/мл, приблизительно в 2000 до приблизительно 5000 нг/мл, приблизительно 5000 до приблизительно 10000 нг/мл или приблизительно 5000 до приблизительно 7000 нг/мл в крови при введении путем подкожной инъекции, например, в дозе 50 мкг/кг. C_{\max}

25 может зависеть от вводимой дозы соединения. Вводимая доза может составлять 50 мкг/кг, 100 мкг/кг, 200 мкг/кг, 250 мкг/кг, 300 мкг/кг, 400 мкг/кг, 500 мкг/кг, 600 мкг/кг, 700 мкг/кг, 800 мкг/кг, 900 мкг/кг или 1000 мкг/кг.

[000137] T_{\max} соединения, описанного в настоящем документе, может составлять, например, не больше чем приблизительно 0,5 часа, не больше чем приблизительно 1

30 час, не больше чем приблизительно 1,5 часа, не больше чем приблизительно 2 часа, не больше чем приблизительно 2,5 часа, не больше чем приблизительно 3 часа, не больше чем приблизительно 3,5 часа, не больше чем приблизительно 4 часа, не больше чем приблизительно 4,5 часа, не больше чем приблизительно 5 часов, не больше чем

35 приблизительно 5,5 часа, не больше чем приблизительно 6 часов, не больше чем приблизительно 6,5 часа, не больше чем приблизительно 7 часов, не больше чем приблизительно 7,5 часа, не больше чем приблизительно 8 часов, не больше чем приблизительно 8,5 часа, не больше чем приблизительно 9 часов, не больше чем

40 приблизительно 9,5 часа, не больше чем приблизительно 10 часов, не больше чем приблизительно 10,5 часа, не больше чем приблизительно 11 часов, не больше чем приблизительно 11,5 часа, не больше чем приблизительно 12 часов, не больше чем

приблизительно 12,5 часа, не больше чем приблизительно 13 часов, не больше чем приблизительно 13,5 часа, не больше чем приблизительно 14 часов, не больше чем

45 приблизительно 14,5 часа, не больше чем приблизительно 15 часов, не больше чем приблизительно 15,5 часа, не больше чем приблизительно 16 часов, не больше чем приблизительно 16,5 часа, не больше чем приблизительно 17 часов, не больше чем

приблизительно 17,5 часа, не больше чем приблизительно 18 часов, не больше чем приблизительно 18,5 часа, не больше чем приблизительно 19 часов, не больше чем

приблизительно 19,5 часа, не больше чем приблизительно 20 часов или являться любым

[illegible]

[000138] AUC_(0-inf) (также называемая AUC_(0-∞)) или AUC_(last) соединения, описанного в настоящем документе, может составлять, например, не меньше чем приблизительно 1 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 5 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 10 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 20 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 30 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 40 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 50 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 100 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 150 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 200 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 250 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 300 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 350 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 400 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 450 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 500 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 600 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 700 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 800 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно 900 нг·ч/мл, не меньше чем приблизительно

[illegible]

приблизительно 14000 нг·ч/мл; от приблизительно 14000 нг·ч/мл до приблизительно 14500 нг·ч/мл; от приблизительно 14500 нг·ч/мл до приблизительно 15000 нг·ч/мл; от приблизительно 15000 нг·ч/мл до приблизительно 15500 нг·ч/мл; от приблизительно 15500 нг·ч/мл до приблизительно 16000 нг·ч/мл; от приблизительно 16000 нг·ч/мл до приблизительно 16500 нг·ч/мл; от приблизительно 16500 нг·ч/мл до приблизительно 17000 нг·ч/мл; от приблизительно 17000 нг·ч/мл до приблизительно 17500 нг·ч/мл; от приблизительно 17500 нг·ч/мл до приблизительно 18000 нг·ч/мл; от приблизительно 18000 нг·ч/мл до приблизительно 18500 нг·ч/мл; от приблизительно 18500 нг·ч/мл до приблизительно 19000 нг·ч/мл; от приблизительно 19000 нг·ч/мл до приблизительно 19500 нг·ч/мл; или от приблизительно 19500 нг·ч/мл до приблизительно 20000 нг·ч/мл. Например, $AUC_{(0-inf)}$ соединения может составлять приблизительно 8500 нг·ч/мл при внутривенном введении в дозе 50 мкг/кг или приблизительно 4000 нг·ч/мл при подкожном введении в дозе 50 мкг/кг.

[000139] Концентрация в плазме соединения, описанного в настоящем документе, может составлять, например, не меньше чем приблизительно 1 нг/мл, не меньше чем приблизительно 5 нг/мл, не меньше чем приблизительно 10 нг/мл, не меньше чем приблизительно 15 нг/мл, не меньше чем приблизительно 20 нг/мл, не меньше чем приблизительно 25 нг/мл, не меньше чем приблизительно 50 нг/мл, не меньше чем приблизительно 75 нг/мл, не меньше чем приблизительно 100 нг/мл, не меньше чем приблизительно 150 нг/мл, не меньше чем приблизительно 200 нг/мл, не меньше чем приблизительно 300 нг/мл, не меньше чем приблизительно 400 нг/мл, не меньше чем приблизительно 500 нг/мл, не меньше чем приблизительно 600 нг/мл, не меньше чем приблизительно 700 нг/мл, не меньше чем приблизительно 800 нг/мл, не меньше чем приблизительно 900 нг/мл, не меньше чем приблизительно 1000 нг/мл, не меньше чем приблизительно 1200 нг/мл или являться любой другой концентрацией в плазме соединения, описанного в настоящем документе. Концентрация в плазме может составлять, например, от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 2000 нг/мл; от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 5 нг/мл; от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 10 нг/мл; от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 25 нг/мл; от приблизительно 25 нг/мл до приблизительно 50 нг/мл; от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 75 нг/мл; от приблизительно 75 нг/мл до приблизительно 100 нг/мл; от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 150 нг/мл; от приблизительно 150 нг/мл до приблизительно 200 нг/мл; от приблизительно 200 нг/мл до приблизительно 250 нг/мл; от приблизительно 250 нг/мл до приблизительно 300 нг/мл; от приблизительно 300 нг/мл до приблизительно 350 нг/мл; от приблизительно 350 нг/мл до приблизительно 400 нг/мл; от приблизительно 400 нг/мл до приблизительно 450 нг/мл; от приблизительно 450 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл; от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 600 нг/мл; от приблизительно 600 нг/мл до приблизительно 700 нг/мл; от приблизительно 700 нг/мл до приблизительно 800 нг/мл; от приблизительно 800 нг/мл до приблизительно 900 нг/мл; от приблизительно 900 нг/мл до приблизительно 1000 нг/мл; от приблизительно 1000 нг/мл до приблизительно 1100 нг/мл; от приблизительно 1100 нг/мл до приблизительно 1200 нг/мл; от приблизительно 1200 нг/мл до приблизительно 1300 нг/мл; от приблизительно 1300 нг/мл до приблизительно 1400 нг/мл; от приблизительно 1400 нг/мл до приблизительно 1500 нг/мл; от приблизительно 1500 нг/мл до приблизительно 1600 нг/мл; от приблизительно 1600 нг/мл до приблизительно 1700 нг/мл; от приблизительно 1700 нг/мл до приблизительно 1800 нг/мл; от приблизительно 1800 нг/мл до приблизительно 1900 нг/мл; или от приблизительно 1900 нг/мл до приблизительно 2000 нг/мл.

[000140] Фармакодинамические параметры могут быть любыми параметрами, подходящими для описания композиций настоящего изобретения. Например, фармакодинамический профиль может демонстрировать повышенные количества клеток Treg в течение, например, приблизительно 24 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 72 часов или 1 недели.

[000141] Неограничивающие примеры фармакодинамических и фармакокинетических параметров, которые могут быть вычислены для соединения, которое вводят согласно способам настоящего изобретения, включают: а) вводимое количество лекарственного средства, которое может быть представлено как доза D ; б) интервал между введением доз, который может быть представлен как τ ; в) кажущийся объем, в котором распределяется лекарственное средство, который может быть представлен как объем распределения V_d , где $V_d = D/C_0$; д) количество лекарственного средства в данном объеме плазмы, которое может быть представлено как концентрация C_0 или C_{ss} , где C_0 или $C_{ss} = D/V_d$ и может быть представлено как средняя концентрация в плазме во множестве образцов; е) период полувыведения лекарственного средства $t_{1/2}$, где $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$; ф) скорость, с которой лекарственное средство выводится из организма k_e , где $k_e = \ln(2)/t_{1/2} = CL/V_d$; г) скорость инфузии, требуемая для уравнивания уравнения K_{in} , где $K_{in} = C_{ss} \cdot CL$; х) интеграл кривой зависимости концентрации от времени после введения однократной дозы, который может быть представлен как $AUC_{0-\infty}$, где $\int_0^{\infty} C dt$, или в стационарном состоянии, который может быть представлен как $AUC_{\tau,ss}$, где $\int_t^{t+\tau} C dt$; и) объем плазмы, очищаемой от лекарственного средства в единицу времени, который может быть представлен как CL (клиренс), где $CL = V_d \cdot k_e = D/AUC$; j) системно доступную долю лекарственного средства, которая может быть представлена как f , где $f = \frac{AUC_{po.Div}}{AUC_{iv.Dpo}}$; к) пиковую концентрацию лекарственного средства в плазме после введения C_{max} ; л) время, требуемое для достижения лекарственным средством C_{max} , t_{max} ; м) минимальную концентрацию, которую достигает лекарственное средство перед введением следующей дозы, C_{min} ; и н) колебание между пиковой и минимальной концентрацией в одном интервале между введением доз в стационарном состоянии, которое может быть представлено как $\%PTF = 100 \cdot \frac{(C_{max,ss} - C_{min,ss})}{C_{av,ss}}$, где $C_{av,ss} = \frac{AUC_{\tau,ss}}{\tau}$.

[000142] Соединения согласно настоящему описанию могут обладать высокой стабильностью при введении индивиду. Вводимое соединение может иметь физиологический период полувыведения больше чем приблизительно 6 часов, больше чем приблизительно 7 часов, больше чем приблизительно 8 часов, больше чем приблизительно 9 часов, больше чем приблизительно 10 часов, больше чем приблизительно 11 часов, больше чем приблизительно 12 часов, больше чем приблизительно 13 часов, больше чем приблизительно 14 часов, больше чем приблизительно 15 часов, больше чем приблизительно 16 часов, больше чем приблизительно 17 часов, больше чем приблизительно 18 часов, больше чем приблизительно 19 часов, больше чем приблизительно 20 часов, больше чем приблизительно 21 час, больше чем приблизительно 22 часа, больше чем приблизительно 23 часа, больше чем приблизительно 24 часа, больше чем приблизительно 25 часов, больше чем приблизительно 26 часов, больше чем приблизительно 27 часов, больше

чем приблизительно 28 часов, больше чем приблизительно 29 часов, больше чем приблизительно 30 часов, больше чем приблизительно 31 час, больше чем приблизительно 32 часа, больше чем приблизительно 33 часа, больше чем приблизительно 34 часа, больше чем приблизительно 35 часов, больше чем
 5 приблизительно 36 часов, больше чем приблизительно 37 часов, больше чем приблизительно 38 часов, больше чем приблизительно 39 часов, больше чем приблизительно 40 часов, больше чем приблизительно 41 час, больше чем приблизительно 42 часа, больше чем приблизительно 43 часа, больше чем приблизительно 44 часа, больше чем приблизительно 45 часов, больше чем
 10 приблизительно 46 часов, больше чем приблизительно 47 часов, больше чем приблизительно 48 часов, больше чем приблизительно 49 часов, больше чем приблизительно 50 часов, больше чем приблизительно 51 час, больше чем приблизительно 52 часа, больше чем приблизительно 53 часа, больше чем приблизительно 54 часа, больше чем приблизительно 55 часов, больше чем
 15 приблизительно 56 часов, больше чем приблизительно 57 часов, больше чем приблизительно 58 часов, больше чем приблизительно 59 часов, больше чем приблизительно 60 часов, больше чем приблизительно 61 час, больше чем приблизительно 62 часа, больше чем приблизительно 63 часа или больше чем приблизительно 64 часа.

20 [000143] Период полувыведения соединения согласно настоящему изобретению может изменяться в зависимости от введенной дозы. Например, период полувыведения соединения в случае введения в дозе 50 мкг/кг может быть меньше, чем период полувыведения того же соединения при введении в дозе 100 мкг/кг или 250 мкг/кг. Период полувыведения соединения может изменяться в зависимости от используемого
 25 пути введения. Период полувыведения соединения может быть более длительным, если соединение вводят подкожно, а не внутривенно. Например, период полувыведения соединения, доставленного подкожно, может составлять от приблизительно 15 часов до приблизительно 25 часов, тогда как период полувыведения соединения, доставленного внутривенно, может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 15 часов. В
 30 некоторых вариантах осуществления период полувыведения соединения при внутривенном введении в дозе 50 мкг/кг составляет от приблизительно 6 часов до приблизительно 14 часов, от приблизительно 7 часов до приблизительно 13 часов, от приблизительно 8 часов до приблизительно 12 часов или приблизительно 9 часов до приблизительно 11 часов. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения
 35 соединения при внутривенном введении в дозе 50 мкг/кг составляет приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов или приблизительно 15 часов. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения
 40 соединения при подкожном введении в дозе 50 мкг/кг составляет от приблизительно 15 часов до приблизительно 27 часов, от приблизительно 16 часов до приблизительно 26 часов, от приблизительно 17 часов до приблизительно 25 часов, от приблизительно 18 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 19 часов до приблизительно 23 часов или от приблизительно 20 часов до приблизительно 22 часов. В некоторых
 45 вариантах осуществления период полувыведения соединения при подкожном введении в дозе 50 мкг/кг составляет приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов,

приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 25 часов, приблизительно 26 часов, приблизительно 27 часов, приблизительно 28 часов, приблизительно 29 часов или приблизительно 30 часов.

5 Клируенс соединения из крови может быть быстрее для соединения, доставляемого внутривенно, чем для соединения, доставляемого подкожно.

Получение димерных белков: гетеродимеры и гомодимеры

[000144] В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению является гетеродимером, например, гетеродимером, включающим IL2R-
10 связывающий фрагмент (например, IL-2 или вариант IL-2), который является частью первого слитого белка, и ST2-связывающий фрагмент (например, IL-33, вариант IL-33, антитело, которое связывает ST2, или его антигенсвязывающий фрагмент), который является частью второго слитого белка. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго слитых белков включает Fc-домен IgG, например Fc-домен IgG1
15 или его вариант. Гетеродимеры могут быть получены при экспрессии двух входящих в их состав рекомбинантных белков по отдельности, их очистке и объединении *in vitro* с образованием связанных дисульфидной связью гетеродимеров. Гетеродимерные Fc-слитые белки также могут быть получены в одной клетке, трансфицированной двумя входящими в их состав конструкциями кДНК при использовании метода "выступ во
20 впадину". С помощью этой стратегии вводят мутации в область контакта CH2-CH3 между двумя полипептидными цепями Fc, которые препятствуют образованию гомодимеров, но при этом образуют комплементарные области контакта, которые способствуют образованию гетеродимеров. Таким образом, гетеродимерные Fc-слитые белки могут образовываться в клетках-хозяевах, экспрессирующих рекомбинантные
25 белки, и секретироваться в виде гетеродимерных белков. Ниже приведены два примера таких Fc-конструкций в фоне IgG1 человека. Мутантные остатки T366Y и Y407T выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты, и остаток N297A подчеркнут.

[000145] (A) Fc IgG1 (N297A; T366Y): DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH
30 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLYCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 8)

[000146] (B) Fc IgG1 (N297A; Y407T): DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH
35 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSLTKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 9)

[000147] Два различных связывающих фрагмента, например IL-2 и IL-33, могут быть присоединены к Fc последовательностям (A) и (B), соответственно, для конструирования
40 гетеродимерного белка.

[000148] В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает Fc-домен IgG1, включающий мутации T350V, L351Y, F405A и Y407V (например, SEQ ID NO: 4); и второй слитый белок включает мутации T350V, T366L, K392L и T394W (например, SEQ ID NO: 5). Такие мутации, согласно некоторым сообщениям, улучшали
45 правильное спаривание и стабильность (Von Kreudenstein et al., 2013, mAbs 5:646-654; WO 2014082179 A1). Примеры последовательностей Fc-домена IgG1 человека показаны ниже, при этом мутация N297A подчеркнута, а мутации T350V, L351Y, F405A, Y407V, T350V, T366L, K392L и T394W, выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты.

[000149] (A) Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A и Y407V): DKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 4)

[000150] (B) Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L и T394W)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO: 5)

[000151] Примеры гетеродимеров показаны на Фигурах 4A, 4B, 4C, 4D и 4E.

[000152] В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему
изобретению является гомодимером, например, гомодимером, включающим два
идентичных слитых белка, каждый из которых содержит IL2R-связывающий фрагмент
(например, IL-2 или вариант IL-2) и ST2-связывающий фрагмент (например, IL-33,
вариант IL-33, антитело, которое связывает ST2, или его антигенсвязывающий фрагмент).
В некоторых вариантах осуществления каждый из двух идентичных слитых белков
включает Fc-домен IgG, например, Fc-домен IgG1 или его вариант. В конкретном
варианте осуществления Fc-домен IgG1 является Fc-доменом IgG1 человека,
включающим мутацию N297A (например, SEQ ID NO: 7). Примеры гомодимеров
показаны на Фигурах 1F и 1G.

[000153] IL2R-связывающий фрагмент (например, IL-2 или вариант IL-2) и ST2-
связывающий фрагмент (например, IL-33, вариант IL-33, антитело, которое связывает
ST2, или его антигенсвязывающий фрагмент) могут быть присоединены к N-концу или
C-концу Fc-домена IgG напрямую или через пептидный линкер (например, линкер G₄S).

Могут использоваться различные комбинации IL2R-связывающего фрагмента и ST2-
связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления димерный белок
включает первый слитый белок, содержащий IL2R-связывающий фрагмент на N-конце
относительно Fc-домена IgG, и второй слитый белок, содержащий ST2-связывающий
фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG (см., например, Фигуру 4A). В
некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает IL2R-связывающий
фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG, и второй слитый белок включает
ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG (см., например,
Фигуру 4B и 5D). В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает
IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG, и второй слитый
белок включает ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG
(см., например, Фигуру 4C и 5C). В некоторых вариантах осуществления первый слитый
белок включает IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG,
и второй слитый белок включает ST2-связывающий фрагмент на C-конце относительно
Fc-домена IgG. В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает
ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG и IL2R-
связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG, и второй слитый белок
включает ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG (см.,
например, Фигуру 4D и 5B). В некоторых вариантах осуществления первый слитый
белок включает ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG
и IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG, и второй слитый
белок включает IL2R-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG

(см., например, Фигуру 4Е). В некоторых вариантах осуществления и первый слитый белок, и второй слитый белок включают ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG и IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG (см., например, Фигуру 4F и Фигуру 5А). В некоторых вариантах осуществления и первый слитый белок, и второй слитый белок включают IL2R-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG и ST2-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG (см., например, Фигуру 4G). В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок включает IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG, и второй слитый белок включает ST2-связывающий фрагмент на N-конце относительно Fc-домена IgG и IL2R-связывающий фрагмент на C-конце относительно Fc-домена IgG (см., например, Фигуру 5Е).

[000154] В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает по меньшей мере один IL2R-связывающий фрагмент (например, IL-2 или вариант IL-2) и по меньшей мере один ST2-связывающий фрагмент (например, IL-33, вариант IL-33, антитело, которое связывает ST2, или его антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает только один IL2R-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает только один ST2-связывающий фрагмент.

[000155] В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает по меньшей мере два IL2R-связывающих фрагмента. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый первый и второй слитые белки содержат по меньшей мере один IL2R-связывающий фрагмент. См., например, Фигуры 4Е, 4F и 4G. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает по меньшей мере два ST2-связывающих фрагмента. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый первый и второй слитые белки содержат по меньшей мере один ST2-связывающий фрагмент. См., например, Фигуры 4D, 4F и 4G.

[000156] В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, IL2R-связывающий фрагмент и ST2-связывающий фрагмент могут быть присоединены к Fc-домену IgG через пептидный линкер (например, линкер G₄S). Димерный белок может содержать 1, 2, 3, 4 или больше пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 пептидных линкера.

[000157] В некоторых вариантах осуществления IL2R-связывающий фрагмент и/или ST2-связывающий фрагмент слиты непосредственно с Fc-доменом IgG через пептидную связь, т.е. без добавления пептидного линкера между связывающим фрагментом и Fc-доменом IgG. В некотором варианте осуществления димерный белок не содержит пептидный линкер.

[000158] В некоторых вариантах осуществления первый слитый белок димерного белка имеет такую конфигурацию, что C-конец IL-2 связывающего фрагмента (например, белковый домен IL-2 человека или его вариант) слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкерного домена; и N-конец первого белкового Fc-домена IgG слит через пептидную связь с C-концом первого пептидного линкерного домена. В некоторых вариантах осуществления второй слитый белок димерного белка имеет такую конфигурацию, что C-конец второго белкового Fc-домена IgG слит через пептидную связь с N-концом второго пептидного линкерного домена; и N-конец белкового домена, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с C-концом второго пептидного линкерного домена. См., например, Фигуру 4А. В некоторых

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

5 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

10 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

15 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

20 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

25 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

30 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

35 последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления димерный белок включает слитый белок, обладающий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

Описание последовательностей в Списке последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	IL-2 человека, включающий мутации N88R и C125S
2	IL-2 человека дикого типа
3	IL-2 человека, включающий мутации T3A, N88R и C125S
4	Fc IgG1 человека (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)
5	Fc IgG1 человека (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)
6	пептидный линкер GGGSGGGSGGGGS (G4S) ₃
7	Фрагмент Fc IgG1 человека (N297A)
8	Fc IgG1 человека (T366Y)
9	Fc IgG1 человека (Y407T)
10	Остатки 112-170 человеческого IL-33 дикого типа
11	Остатки 112-170 человеческого IL-33, включающего мутации C208S, C227S, C232S и C259S
12	Слитый белок IL-2 (N88R, C125S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) Фиг. 4А
13	Слитый белок Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) Фиг. 4А

14	Слитый белок IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W) Фиг. 4B
15	Слитый белок IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) Фиг. 4B
16	Слитый белок Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125) Фиг. 4C
17	Слитый белок IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W) /(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125) Фиг. 4D
18	Слитый белок IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/ IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) Фиг. 4E
19	Слитый белок IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125) Фиг. 4F
20	Слитый белок IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) Фиг. 4G
21	Слитый белок IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A) Фиг. 4J
22	Ab2HeavyIL2vC
23	Ab4HeavyIL2vC
24	Ab2HeavyIL2vC(W)
25	Ab4HeavyIL2vC(W)
26	Ab2Heavy(V)
27	Ab4Heavy(V)
28	IL2vCFc(V)
29	Ab2Карра
30	Ab4Карра
31	GGGGGS пептидный линкер

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование ST2 и IL2R-направленных биспецифичных молекул

[000160] Были сконструированы биспецифичные молекулы, направленно взаимодействующие с ST2 (рецептор IL-33) и высокоаффинным рецептором IL-2. Все сконструированные молекулы перечислены в Таблицах 1 и 2 ниже. Их схематические диаграммы показаны на Фигурах 4 и 5.

[000161] Биспецифичные молекулы в Таблице 1 и на Фиг. 4 представляют собой Fc слитые белки, состоящие из направленно взаимодействующих с рецепторами фрагментов, которые являются агонистом высокоаффинного рецептора IL-2 (т.е. вариантом IL-2) и вариантом IL-33. Каждая молекула содержит моновалентные или бивалентные направленно взаимодействующих с рецепторами фрагменты на N или C-конце. Пептидный линкер (G4S)₃ соединяет Fc-домен IgG1 человека и фрагменты, направленно взаимодействующие с рецепторами. Fc-домен содержит замену N297A для снижения связывания FcγR и C1q и, таким образом, снижения Fc эффекторных функций. Фрагмент IL-33 включает фрагмент Ser112-Thr270 IL-33 человека, который является биоактивной формой белка IL-33. Кроме того, фрагмент IL-33 содержит замены C208S, C227S, C232S и C259S. Сообщали, что замены цистеина на серин препятствуют инактивации IL-33 в результате окисления (Cohen et al., 2015, Nature Commun 6:8327; WO2016/156440). Этот вариант был выбран для облегчения продукции белков, содержащих активный вариант IL-33, в клетках НЕК293. Агонист рецептора IL-2 представляет собой вариант IL-2 человека из 133 аминокислот, содержащий замены N88R и C125S по сравнению с последовательностью человеческого IL-2 дикого типа (SEQ ID NO: 2).

[000162] Биспецифичные молекулы в Таблице 2 и на Фигуре 5 состоят из варианта

человеческого IL-2 (N88R, C125S) и антигенсвязывающего фрагмента (Fab) антитела против ST2. Для подтверждения такой концепции, два мАт против ST2, Ab2 и Ab4, были выбраны из опубликованной заявки на патент (US2017/0002079 A1). Каждая биспецифичная молекула является либо моновалентной, либо бивалентной по сравнению с антигенсвязывающим фрагментом против ST2 и ковалентно связана с агонистом рецептора IL-2 на N- или C-конце через пептидный линкер, (G4S)₃.

[000163] Получение гетеродимерных Fc белков может быть сложным из-за возможной контаминации гомодимерами. Все гетеродимерные молекул в данном примере имеют мутации на Fc-домене для уменьшения нежелательного гомодимерного спаривания.

Мутации включают T350V, L351Y, F405A и Y407V на одной цепи; и T350V, T366L, K392L и T394W на другой цепи. Такие мутации, как сообщали, улучшали правильное спаривание и повышали стабильность (Von Kreudenstein et al., 2013, mAbs 5:646-654; WO 2014082179 A1).

Таблица 1. Димерные белки, включающие Fc-области IgG1 человека и вариант IL-33 человека (C208S, C227S, C232S, C259S), или комбинации варианта IL-2 человека (N88R, C125S) и варианта IL-33 человека. Диаграммы белков представлены на Фигуре 4А-4J. В названиях димерных белков "N" означает N-концевое слияние с Fc-доменом, "C" означает C-концевое слияние, "M" означает моновалентный, "B" означает бивалентный, и "v" означает вариант.

Димерный белок (Фигура)	Слитые белки	SEQ ID NO:
IL2vNM-IL33vCM (4A)	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
	Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
IL2vNM-IL33vNM (4B)	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	14
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNM-IL2vCM (4C)	Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125)	16
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNB-IL2vCM (4D)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125)	17
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL2vNB-IL33vCM (4E)	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	18
	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
IL33vNB-IL2vCB (4F)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125)	19
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-2 (N88R, C125)	19
IL2vNB-IL33vCB (4G)	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	20
	IL-2 (N88R, C125)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	20
IL33vNM (4H)	Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	5
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vCM (4I)	Fc IgG1 (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) ₃ линкер/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
	Fc IgG1 (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	4
IL33vNB (4J)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)	21
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) ₃ линкер/Fc IgG1 (N297A)	21

Таблица 2. Димерные белки, включающие Fc-области, антигенсвязывающий фрагмент антитела против ST2 и вариант IL-2 (N88R, C125S). Диаграммы белков предоставлены на Фигуре 5А-5Е.

ФИГ.	Димерный блок	Тяжелая цепь 1 (слитый блок)	Тяжелая цепь 2 (слитый белок)	Легкие цепи
5А	Ab2-IL2vCB	Ab2Heavy-IL2vC (SEQ ID NO: 22)	(такой же, как в Тяжелой цепи 1, гомодимер)	Ab2Кappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4-IL2vCB	Ab4Heavy-IL2vC (SEQ ID NO: 23)	(такой же, как в Тяжелой цепи 1, гомодимер)	Ab4Кappa (SEQ ID NO: 30)
5В	Ab2-IL2vCM	Ab2Heavy(V) (SEQ ID NO: 26)	Ab2HeavyIL2vC(W) (SEQ ID NO: 24)	Ab2Кappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4-IL2vCM	Ab4Heavy(V) (SEQ ID NO: 27)	Ab4HeavyIL2vC(W) (SEQ ID NO: 25)	Ab4Кappa (SEQ ID NO: 30)
5С	Ab2M-IL2vCM	Ab2Heavy(V) (SEQ ID NO: 26)	IL2vCFc(W) (SEQ ID NO: 16)	Ab2Кappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4M-IL2vCM	Ab4Heavy(V) (SEQ ID NO: 27)	IL2vCFc(W) (SEQ ID NO: 16)	Ab4Кappa (SEQ ID NO: 30)
5D	Ab2M-IL2vNM	Ab2Heavy(V) (SEQ ID NO: 26)	IL2vNFc(W) (SEQ ID NO: 14)	Ab2Кappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4M-IL2vNM	Ab4Heavy(V) (SEQ ID NO: 27)	IL2vNFc(W) (SEQ ID NO: 14)	Ab4Кappa (SEQ ID NO: 30)
5Е	Ab2M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (SEQ ID NO: 28)	Ab2HeavyIL2vC(W) (SEQ ID NO: 24)	Ab2Кappa (SEQ ID NO: 29)
	Ab4M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (SEQ ID NO: 28)	Ab4HeavyIL2vC(W) (SEQ ID NO: 25)	Ab4Кappa (SEQ ID NO: 30)

[000164] Все молекулы были получены в транзигентно трансфицированных клетках НЕК293 и очищены с помощью афинной хроматографии с белком А, с последующей эксклюзионной хроматографией. Из-за значительно сниженных уровней экспрессии белков по сравнению с IL2vNM-IL33vCM (ФИГ. 4А), следующие молекулы не были включены в анализ характеристик связывания: IL33vNM-IL2vCM (ФИГ. 4С), IL33vNB-IL2vCM (ФИГ. 4D), IL2vNB-IL33vCM (ФИГ. 4Е), IL33vNB-IL2vCB (ФИГ. 4F) и IL2vNB-IL33vCB (ФИГ. 4G).

Пример 2. Анализ характеристик связывания биспецифичных молекул IL33-IL2v

[000165] Связывание биспецифичных белков с внеклеточными доменами (ECD) ST2 (Sino Biological) и IL2Ra (Lake Pharma, Inc.) оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при использовании системы BiaCore T200 (GE). Антитело против His-метки (GenScript) иммобилизовали на чипах CM4 (GE) путем сшивания NHS-EDC, и реакции связывания проводили в буфере HBS-EP+ (GE) при 25°C. His-меченный белок ST2 ECD захватывали на чипах, покрытых антителом против His-метки.

[000166] Для связывания ST2 гистидин-меченный белок ST2 ECD человека или мыши захватывали на чипе в качестве лигандов. Биспецифичные молекулы пропускали в качестве аналитов при скорости потока 50 мкл/мин в течение 60 сек и позволяли диссоциировать в течение 200 сек для человеческого ST2 и 120 секунд для мышинного ST2. Биспецифичные молекулы были подготовлены в различных концентрациях (0,12 нМ - 10 нМ путем 3-кратного разведения для взаимодействия с ST2 человека; и 2,5 нМ - 200 нМ путем 3-кратного разведения для взаимодействия с ST2 мыши). Поверхность чипа регенерировали 10 мМ глицина, pH 1,7. Сигналы ассоциации и диссоциации аппроксимировали к модели связывания 1:1 при использовании программы BiaCore Evaluation версии 2.0, с получением кинетических констант (k_a и k_d) и для вычисления констант диссоциации (K_d).

[000167] Сенсограммы показаны на ФИГ. 6А и 6В; и кинетические константы и константы диссоциации приведены в Таблице 3. IL2vNM-IL33vCM и IL2vNM-IL33vNM связывались с человеческим ST2 со значениями K_d в пределах 0,17-0,3 нМ, что было немного ниже, чем для описанного ранее взаимодействия IL-33 и ST2 ($K_d=0,4-0,7$ нМ)

(Lingel et al., 2009, Structure 17(10):1398-1410; Liu et al., 2013, PNAS 110(37):14918-14923). Эти белки связывались с мышинным ST2, но с пониженной аффинностью. Все биспецифичные молекулы и моновалентные молекулы IL-33 показали сравнимую аффинность к человеческому ST2. Однако IL2vNM-IL33vCM показал более высокую аффинность (>10 раз) к мышинному ST2, чем IL2vNM-IL33vNM. Кроме того, IL33vCM показал более высокую аффинность к мышинному ST2, чем IL33vNM. Это указывает, что в С-концевой ориентации IL-33 обладает более высокой аффинностью к мышинному ST2, чем N-концевой IL-33.

[000168] Кроме того, образец IL2vNM-IL33vNM содержал контаминирующий гомодимер IL2v, обнаруженный с помощью ДСН-ПААГЭ, тогда как гомодимеры не были обнаружены в образце IL2vNM-IL33vCM. В заключение, биспецифичный белок с С-концевым IL-33, IL2vNM-IL33vCM, показал более высокую аффинность к мышинному ST2 и экспрессировался в виде более гомогенного гетеродимерного белка. Поэтому его выбрали для анализов биоактивности с Т-клетками мыши в Примере 4.

Таблица 3. Анализ связывания с человеческими и мышинными белками ECD ST2

Аналит	ST2	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)
IL2vNM-IL33vCM	Человек	5,15E6	8,69E-4	1,69E-10
	Мышь	3,61E6	0,0492	1,36E-8
IL2vNM-IL33vNM	Человек	3,41E6	0,0010	3,02E-10
	Мышь	1,17E6	0,1395	1,19E-7
IL33vNM	Человек	4,35E6	0,0012	2,74E-10
	Мышь	2,33E6	0,1163	4,99E-8
IL33vCM	Человек	6,11E6	0,0011	1,74E-10
	Мышь	3,85E6	0,0452	1,18E-8

Таблица 4. Одновременное связывание белков с ECD ST2 и с ECD IL2Ra

Иммобилизованный лиганд ST2	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)
IL2vNM-IL33vCM	IL2R альфа	4,72E6	0,1236	2,62E-8
IL2vNM-IL33vNM	IL2R альфа	5,04E6	0,1575	3,25E-8

[000169] Для проверки, связываются ли биспецифичные молекулы одновременно и с ST2, и с IL-2R альфа, биспецифичные молекулы захватывали гистидин-меченным человеческим ST2, который был иммобилизован на чипе. Затем человеческий IL2R альфа вводили в качестве аналита при скорости потока 50 мкл/мин в течение 50 сек и позволяли диссоциировать в течение 60 сек. IL2R альфа приготавливали в различных концентрациях (2,5 нМ - 200 нМ в 3-кратном разведении). Поверхность чипа регенерировали 10 мМ глицином, pH 1,7. Сигналы ассоциации и диссоциации аппроксимировали к модели связывания 1:1 при использовании программы BiaCore Evaluation версии 2.0 для получения кинетических констант (k_a и k_d) и вычисления констант диссоциации (K_d).

[000170] Сенсограммы показаны на ФИГ. 7, а кинетические константы и константы диссоциации приведены в Таблице 4 выше. IL2vNM-IL33vCM и IL2vNM-IL33vNM связывались с человеческим IL2R альфа со значениями K_d (26-32 нМ), сравнимыми со значениями, описанными ранее (Landgraf BE, et al., 1992, J Biol Chem. 267(26):18511-9; Myszk DG, et al., 1996, Protein Sci. 5(12):2468-78; Shanafelt AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. (11):1197-202). Эти данные указывают, что фрагмент IL-2v сохраняет связывание с IL2Ra; и биспецифичные молекулы способны одновременно связываться как с ST2, так и с IL2Ra, поскольку они связывались с IL2Ra, будучи связанными с белком ST2.

Пример 3. Анализ характеристик связывания биспецифичных IL2v молекул против ST2

[000171] Связывание биспецифичных белков IL2v против ST2 с ST2 и IL2Ra человека оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) способом, аналогичным описанному в Примере 2.

[000172] Для связывания с ST2 гистидин-меченный белок ECD ST2 человека иммобилизовали на чипе в качестве лиганда. Биспецифичные молекулы Ab2-IL2v, которые состоят из Fab мАт против ST2 (Ab2) и IL-2v, вводили в качестве аналитов при скорости потока 50 мкл/мин в течение 400 сек и позволяли диссоциировать в течение 600 сек. Биспецифичные молекулы Ab2-IL2v приготавливали в различных концентрациях (0,012 нМ - 1 нМ в 3-кратном разведении). Биспецифичные молекулы Ab4-IL2v, которые состоят из Fab мАт против ST2, Ab4, и IL-2v, вводили в качестве аналита при скорости потока 50 мкл/мин в течение 200 сек и позволяли диссоциировать в течение 400 сек. Биспецифичные молекулы Ab4-IL2v приготавливали в различных концентрациях (0,062 нМ - 5 нМ в 3-кратном разведении). Поверхность чипа регенерировали 10 мМ глицином, рН 1,7. Сигналы ассоциации и диссоциации моновалентных биспецифичных молекул против ST2 аппроксимировали к модели связывания 1:1 при использовании программы BiaCore Evaluation версии 2.0 для получения кинетических констант (k_a и k_d) и вычисления констант диссоциации (K_d).

[000173] Сенсограммы показаны на ФИГ. 8А и 8В; и кинетические константы и константы диссоциации приведены в Таблице 5 ниже. Все биспецифичные молекулы демонстрировали явное связывание с белком ST2. Значения K_d моновалентных биспецифичных молекул Ab2-IL2v варьировали от 94 пМ до 137 пМ в сравнении со значением 34 пМ, приведенным в патенте US 2017/0002079 A1. Значения K_d моновалентных биспецифичных молекул Ab4/IL2v варьировали от 289 пМ до 378 пМ в сравнении со значением 301 пМ, приведенным в патенте US 2017/0002079 A1.

Таблица 5. Анализ связывания с человеческим белком ECD ST2

Аналит	Лиганд	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)
Ab2M-IL2vCM	ST2 человека	3,28E6	3,47E-4	1,06E-10
Ab2M-IL2vNM	ST2 человека	3,34E6	3,17E-4	9,43E-11
Ab2M-IL2vCB	ST2 человека	2,50E6	3,44E-4	1,37E-10
Ab4M-IL2vCM	ST2 человека	5,57E6	0,0020	3,68E-10
Ab4M-IL2vNM	ST2 человека	5,44E6	0,0021	3,78E-10
Ab4M-IL2vCB	ST2 человека	6,16E6	0,0018	2,89E-10

[000174] Для проверки, связываются ли биспецифичные молекулы одновременно и с ST2, и с IL2Ra, биспецифичные молекулы захватывали гистидин-меченным человеческим ST2, который был иммобилизован на чипе. Затем IL2R-альфа вводили в качестве аналита при скорости потока 50 мкл/мин в течение 50 сек и позволяли диссоциировать в течение 60 сек. IL2Ra приготавливали в различных концентрациях (2,5 нМ - 200 нМ в 3-кратном разведении). Поверхность чипа регенерировали 10 мМ глицином, рН 1,7. Сигналы ассоциации и диссоциации аппроксимировали к модели связывания 1:1 при использовании программы BiaCore Evaluation версии 2.0 для получения кинетических констант (k_a и k_d) и вычисления констант диссоциации (K_d).

[000175] Сенсограммы показаны на Фигурах 9А и 9В; и кинетические константы и константы диссоциации приведены в Таблице 6 ниже. Все они связывались с человеческим IL2R-альфа со значениями K_d (25-43 нМ), сопоставимыми со значениями, которые сообщали ранее. Это указывает на то, что фрагмент IL2v сохраняет связывание с IL2Ra; и биспецифичные молекулы способны одновременно связываться как с ST2, так и с IL2Ra, поскольку они демонстрировали связывание с IL2Ra, будучи связанными

с белком ST2.

Таблица 6. Одновременное связывание белков с ECD ST2 и с ECD IL2Ra

Аналит	ST2-связанный лиганд	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)
IL2R-альфа человека	Ab2M-IL2vCM	6,73E6	0,1819	2,70E-8
IL2R-альфа человека	Ab2M-IL2vNM	6,26E6	0,1550	2,48E-8
IL2R-альфа человека	Ab2M-IL2vCB	5,78E6	0,1885	3,26E-8
IL2R-альфа человека	Ab4M-IL2vCM	9,84E6	0,2513	2,55E-8
IL2R-альфа человека	Ab4M-IL2vNM	7,14E6	0,1788	2,51E-8
IL2R-альфа человека	Ab4M-IL2vCB	5,27E6	0,2002	3,80E-8
IL2R-альфа человека	Ab2-IL2vCB	4,59E6	0,1633	3,56E-8
IL2R-альфа человека	Ab2-IL2vCM	5,13E6	0,1677	3,27E-8
IL2R-альфа человека	Ab4-IL2vCB	4,55E6	0,1944	4,27E-8
IL2R-альфа человека	Ab4-IL2vCM	6,26E6	0,2568	4,10E-8

Пример 4. Активность IL2vNM-IL33vCM на мышиных ST2+ Treg-клетках

[000176] Активация Т-клеток под действием IL-2 может быть установлена при определении уровня фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) в клетках. pSTAT5 измеряли при окрашивании клеток антителом против pSTAT5 и затем выделяли различные субпопуляции лимфоцитов с помощью проточной цитометрии.

[000177] ST2+ Treg обнаружены в нескольких человеческих тканях на высоком уровне, но присутствуют в крови с очень низкой частотой, <0,01%. Из-за сложности получения тканей от человеческих доноров, действие IL2vNM-IL33vCM сначала оценивали на ST2+ Treg из селезенки мыши, в которой были определены более высокие уровни ST2+ Treg (5-10% Treg), выше, чем обнаруженные в крови (0,1-1,0% Treg). Селезенки извлекали у мышей C57Bl/6J и стимулировали суспензии отдельных клеток различными концентрациями одного из IL2vNM (моновалентный Fc-слитый белок на основе варианта IL-2), IL33vCM (моновалентный Fc-слитый белок на основе варианта IL-33) или биспецифичного IL2vNM-IL33vCM (ФИГ. 10). Активация Treg под действием IL-2 может быть измерена при определении уровня внутриклеточного фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) с помощью проточной цитометрии. IL33vCM индуцировал низкие уровни pSTAT5 только при высоких, нефизиологических концентрациях (10-100 нМ, ФИГ. 8В). Напротив, IL2vNM индуцировал pSTAT5 при намного более низких концентрациях, с EC50 2,4 нМ на ST2+ Treg (ФИГ. 8А) и EC50 0,86 нМ на ST2- Treg (ФИГ. 8В). Биспецифичный белок IL2vNM-IL33vCM повышал индукцию pSTAT5 в ST2+ Treg, выше уровней, наблюдаемых с белками IL33vCM или IL2vNM по отдельности (ФИГ. 8А), но не на ST2- Treg (ФИГ. 8В). EC50 в отношении IL2vNM-IL33vCM в этом анализе составлял 0,26 нМ, что было приблизительно в 10 раз ниже, чем EC50 IL2vNM. В заключение, IL2vNM-IL33vCM сильнее индуцировал pSTAT5 в ST2+ Treg, чем ST2- Treg, демонстрируя, что биспецифичная молекула преимущественно активирует ST2+ Treg.

Пример 5. Фрагменты IL-33, расположенные на С-конце относительно Fc-области, являются более активными

[000178] Связывание IL-33 с ST2 и комплексом IL1RAcP активирует сигнализацию через адаптер MyD88. Механизмы сигнализации IL-33 и нижестоящие эффекты варьируют в различных типах клеток. Поэтому сигнальная репортерная клеточная линия была выбрана для измерения биоактивности белков, содержащих фрагменты IL-33. Репортерная клеточная линия HEK-Blue-IL-33™ (InVivoGen Inc) является линией клеток на основе HEK293 с повышенной экспрессией рецепторов IL-33 человека, которая является чувствительным индикатором активности IL-33. Активность IL-33-содержащих молекул, перечисленных в Таблице 1, исследовали на их способность стимулировать

сигнализацию IL-33 в HEK-Blue-IL-33™ клетках согласно методике производителя.

[000179] При сравнении моновалентных молекул IL-33v, EC50 IL-33vCM была в три раза выше, чем у IL-33vNM (0,016 пМ в сравнении с 0,053 пМ, Таблица 7, Фиг. 11А).

Добавление дополнительного фрагмента IL-33 на N-конец молекулы IL-33vNM не увеличило EC50 (0,059 пМ для IL-33vNB в сравнении с 0,053 пМ для IL-33vNM).

Биспецифичные молекулы как с IL-2v, так и с IL-33v, слитыми с N-концом Fc-домена через пептидный линкер (IL2vNM-IL33vNM), обладали значительно более низкой активностью IL-33, чем моновалентный IL-33vNM (0,128 пМ в сравнении с 0,053 пМ, Фиг. 11), что указывает на потерю активности из-за присутствия обоих фрагментов на N-конце Fc-домена. Однако биспецифичные молекулы с IL-2 на N-конце относительно Fc-домена и IL-33 на C-конце относительно Fc-домена (IL2vNM-IL33vCM) обладали лучшей активностью, чем любая из молекул с IL-33 на N-конце Fc-домена (Таблица 7, 0,03 пМ, Фиг. 11В), и имели лишь двукратное снижение активности по сравнению с моновалентным IL-33 на C-конце относительно Fc-домена (IL-33vCM).

[000180] По аналогии с кинетическим анализом в Примере 2, эти анализы установили, что IL2vNM-IL33vCM, с IL-33 на C-конце от Fc-домена, обладал превосходной биоактивностью IL-33 по сравнению с IL2vNM-IL33vNM (ФИГ. 11). Поэтому молекула IL2vNM-IL33vCM была выбрана для дальнейших исследований с мышинными регуляторными Т-клетками, как описано выше в Примере 4.

Таблица 7. EC50 в анализе биоактивности IL-33

Белок	EC50 [пМ]
IL-33vNM	0,053
IL-33vCM	0,016
IL-33vNB	0,059
IL2vNM-IL33vNM	0,128
IL2vNM-IL33vCM	0,03

Пример 6. Активность биспецифичных молекул IL2/IL-33 у нормальных мышей (предполагаемая)

[000181] Для определения их активности в отношении популяций Treg у нормальных мышей, мышам BALB/c будут вводить внутривенно однократную дозу 0,001, 0,01 или 0,1 мг/кг одного из IL2vNM, IL33vCM или биспецифичного IL2vNM-IL33vCM белков (например, ФИГ. 4А). Селезенки и печень будут собирать через 2, 4, 6 или 8 дней после обработки и определять количество и процентное содержание (в процентах от CD4 клеток) ST2+ Treg. Кроме того, пролиферативный индекс субпопуляций ST2+ и ST2-Treg будут определять с помощью внутриклеточного окрашивания клеток антителом к Ki67.

[000182] Если биспецифичный IL2vNM-IL33vCM обладает большей селективностью в отношении ST2+ Treg, чем белки IL2vNM и IL33vCM, будет наблюдаться более интенсивное размножение ST2+ Treg, чем ST2- Treg, при обработке биспецифичным белком по сравнению с IL2vNM и IL33vCM. Увеличение пролиферативного индекса, отражаемое процентом Ki67+ клеток, также будет наблюдаться в результате обработки биспецифичными белками по сравнению с IL2vNM или IL33vCM. Действие белков на Treg может быть коррелировано с фармакокинетикой вводимых белков. Образцы крови, забранные после введения, будут оценивать с помощью количественного иммуноанализа с целью определения фармакокинетики вводимых молекул.

Пример 7. Активность в моделях воспаления мышц (предполагаемая)

[000183] Роль ST2+ Treg была установлена в моделях мышечного воспаления на животных. Одной из этих моделей на животных является острое повреждение мышц

(Burzyn et al., 2013, Cell 155(6):1282-1295) у мышей дикого типа, а второй моделью является модель мышечной дистрофии у мышей *mdx*, модель хронического мышечного воспаления, вызванного генетической недостаточностью дистрофина (мышцы *mdx*; Villalta et al., 2014, Sci Transl Med 5(258):258ra142).

5 [000184] Острое мышечное повреждение будет инициировано у мышей путем введения кардиотоксина в мышцы задних конечностей мышей C57Bl/6J, как описано в публикации Burzyn et al. (цитируемой выше). Введение 0,1 мг/кг биспецифичных молекул IL-2-IL-33 (например, Фиг. 4А и 4В) будет начато в день повреждения и сделано повторно в день 7. Мыши будут умерщвлены в день 1, 4, 7 и 14, и количество Treg, Teff и других
10 инфильтрующих иммунных клеток в мышцах будет определено с помощью проточной цитометрии. Продукция амфирегулина (AREG) клетками Treg является ключевым медиатором восстановления мышц (Burzyn et al., цитируется выше), и частота AREG+ Treg и пролиферативный индекс (Ki67+Treg) будут определять с помощью внутриклеточной проточной цитометрии. Также будут оценивать показатели
15 повреждения и восстановления мышц, такие как уровни креатинкиназы в сыворотке и морфологию мышечных волокон.

[000185] Для модели мышечной дистрофии на мышцах *mdx*, лечение мышей *mdx* будут начинать в возрасте 2 недель. Мышам будут еженедельно вводить 0,1 мг/кг тестируемых белков и умерщвлять в возрасте 6 недель. Количество и частоту пролиферирующих
20 Treg (Ki67+) и AREG+ Treg будут измерять в мышцах обработанных мышей по сравнению с контрольными необработанными животными такого же возраста.

[000186] Успешная активация ST2+ Treg клеток приведет к количественному увеличению Treg, увеличению доли Ki67+ Treg или увеличению доли AREG+ Treg в мышцах. Кроме того, у мышей может наблюдаться снижение Teff-клеток, снижение
25 креатинкиназы в сыворотке и улучшение морфологии мышц.

Пример 8. Активность в моделях воспалительного заболевания кишечника (предполагаемая)

[000187] Роль ST2+ Treg была установлена в модели воспалительного заболевания кишечника на мышцах (Schiering et al., 2014, Nature 513(7519):564-568). Влияние
30 тестируемых белков на ST2+ Treg в ткани толстой кишки будут исследовать в модели острого воспалительного заболевания кишечника. Мыши C57Bl/6J будут получать 3% декстрансульфат натрия (DSS) в питьевой воде в течение 7 дней. Мышам будут вводить в/в, в/б или п/к 0,1 или 0,4 мг/кг биспецифичных молекул IL-2/IL-33 (например, Фиг. 4А и 4В) в день 1 и день 4 обработки DSS, при этом обработку DSS будут начинать в день
35 1. После 7 дней обработки DSS мышей будут умерщвлять и собирать селезенку, толстую кишку и брыжеечные лимфатические узлы (MLN). Срезы толстой кишки будут исследовать в гистологическом исследовании для оценки тяжести заболевания и колита. Популяции ST2+ Treg клеток будут измерять в селезенке, толстой кишке и MLN.

[000188] Успешное лечение может привести к снижению потери веса Tre, улучшению
40 оценок заболевания или гистологии у обработанных мышей по сравнению с контрольными животными. Улучшение заболевания может сопровождаться специфическим увеличением Ki67+ пролиферирующих ST2+ Treg в толстой кишке и MLN обработанных мышей.

[000189] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные
45 варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены лишь в качестве примера. Специалистам в данной области будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от изобретения. Следует понимать, что различные

альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении изобретения. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет объем изобретения, и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения, а также их эквиваленты.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ДЕЛИНИЯ, ИНК.

<120> Поливалентные модуляторы регуляторных Т-клеток

<130> 127754-00520

<140> PCT/US2017/066163

<141> 2017-12-13

<150> 62/433,533

<151> 2016-12-27

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IL2 N88R C125S мутант

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 133

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 5 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 10 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 15 130
 <210> 3
 <211> 133
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> IL2 T3A, N88R, C125S мутант
 <400> 3
 Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 25 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 30 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 35 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 40 130
 <210> 4
 <211> 226
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> IgG1 Fc N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V мутант
 <400> 4
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

RU 2 769 871 C2

	1		5		10		15									
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				20				25					30			
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
5			35					40					45			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			50				55					60				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr
	65					70					75				80	
10	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				100					105					110		
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
15			115					120					125			
	Tyr	Val	Tyr	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
			130				135					140				
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	145					150					155				160	
20	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175		
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190			
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
25			195					200					205			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
			210			215						220				
	Pro	Gly														
	225															
30	<210>	5														
	<211>	226														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
35	<223>	IgG1 Fc N297A, T350V, T366L, K392L, T394W мутант														
	<400>	5														
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	1			5					10				15			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
40				20					25				30			
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			35					40					45			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			50				55					60				
45	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr
	65					70					75				80	
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95		

RU 2 769 871 C2

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 5 Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro
 10 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 15 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly
 225
 <210> 6
 20 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Пептидный линкер
 25 <400> 6
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 226
 30 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> IgG1 Fc 297A мутант
 <400> 7
 35 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 40 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 45 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

RU 2 769 871 C2

5	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
	115				120				125								
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	130				135				140								
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
10	145	150				155				160							
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	165				170				175								
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
	180				185				190								
15	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
	195				200				205								
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210				215				220								
	Pro	Gly															
20	225																
	<210>	8															
	<211>	226															
	<212>	БЕЛОК															
	<213>	Искусственная последовательность															
25	<220>																
	<223>	IgG1 Fc T366Y мутант															
	<400>	8															
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
	1	5				10				15							
30	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
	20				25				30								
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
	35				40				45								
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
35	50	55				60				65				70			
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	
	65	70				75				80							
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	85				90				95								
40	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
	100				105				110								
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
	115				120				125								
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
45	130	135				140				145				150			
	Leu	Tyr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	145	150				155				160							
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	165				170				175								
50	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
	180				185				190								
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
	195				200				205								
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
210				215				220									

RU 2 769 871 C2

	195		200		205
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
	210		215		220
	Pro Gly				
5	225				
	<210> 9				
	<211> 226				
	<212> БЕЛОК				
	<213> Искусственная последовательность				
10	<220>				
	<223> IgG1 Fc Y407T мутант				
	<400> 9				
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly				
	1 5 10 15				
15	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met				
	20 25 30				
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His				
	35 40 45				
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
20	50 55 60				
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr				
	65 70 75 80				
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	85 90 95				
25	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
	100 105 110				
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	115 120 125				
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser				
30	130 135 140				
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	145 150 155 160				
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro				
	165 170 175				
35	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val				
	180 185 190				
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
	195 200 205				
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
40	210 215 220				
	Pro Gly				
	225				
	<210> 10				
	<211> 159				
45	<212> БЕЛОК				
	<213> Homo sapiens				
	<400> 10				
	Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser				

RU 2 769 871 C2

	1		5		10		15									
	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr
			20				25						30			
	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val
5			35				40						45			
	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp
			50				55						60			
	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp
	65					70					75				80	
10	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His	Lys
				85					90					95		
	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Met
			100						105					110		
	His	Ser	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe
15			115					120					125			
	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser
			130				135						140			
	Glu	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr	
	145					150					155					
20	<210> 11															
	<211> 159															
	<212> БЕЛОК															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															
25	<223> IL33 C208S, C227S, C232S, C259S мутант															
	<400> 11															
	Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser
	1				5					10				15		
	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr
30			20					25					30			
	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val
			35				40						45			
	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp
			50				55						60			
35	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp
	65					70					75				80	
	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His	Lys
				85					90					95		
	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Met
40			100						105					110		
	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe
			115					120					125			
	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser
			130				135						140			
45	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr	
	145					150					155					
	<210> 12															
	<211> 374															

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IL2vN Fc цепь

5 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

25 Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
180 185 190

30 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
210 215 220

35 Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
260 265 270

40 Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
290 295 300

45 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser
325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

RU 2 769 871 C2

	340		345		350
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser				
	355		360		365
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly				
5	370				
	<210> 13				
	<211> 400				
	<212> БЕЛОК				
	<213> Искусственная последовательность				
10	<220>				
	<223> IL-33 Fc слитый белок				
	<400> 13				
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly				
	1 5 10 15				
15	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met				
	20 25 30				
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His				
	35 40 45				
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val				
20	50 55 60				
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr				
	65 70 75 80				
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly				
	85 90 95				
25	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
	100 105 110				
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val				
	115 120 125				
	Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser				
30	130 135 140				
	Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
	145 150 155 160				
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro				
	165 170 175				
35	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				
	180 185 190				
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
	195 200 205				
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
40	210 215 220				
	Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly				
	225 230 235 240				
	Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu				
	245 250 255				
45	Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser				
	260 265 270				
	Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys				
	275 280 285				

	Val	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly
	290						295					300				
	Asp	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys
	305					310					315					320
5	Asp	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His
					325					330					335	
	Lys	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn
				340					345					350		
	Met	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val
10			355					360					365			
	Phe	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser
	370					375						380				
	Ser	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr
	385					390					395					400
15	<210> 14															
	<211> 374															
	<212> БЕЛОК															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															
20	<223> IL-2 Fc слитый белок															
	<400> 14															
	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
	1				5					10					15	
	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
25				20					25					30		
	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
			35					40					45			
	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55						60				
30	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
	65					70					75					80
	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
				85					90					95		
	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
35				100					105					110		
	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
			115					120					125			
	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130					135						140				
40	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
	145					150					155				160	
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				165					170					175		
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
45				180					185					190		
	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			195					200					205			
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr

RU 2769871 C2

	210		215		220												
	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
	225					230				235					240		
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
5					245					250					255		
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
					260					265					270		
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	
					275					280					285		
10	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
	290						295					300					
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu	
	305					310					315					320	
	Thr	Trp	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
15					325					330					335		
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
					340					345					350		
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
					355					360					365		
20	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly											
	370																
	<210>	15															
	<211>	400															
	<212>	БЕЛОК															
25	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	IL33 Fc слитый белок															
	<400>	15															
	Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	
30	1				5					10					15		
	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr	
					20					25					30		
	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val	
					35					40					45		
35	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp	
	50						55					60					
	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp	
	65					70					75					80	
	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His	Lys	
40					85					90					95		
	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Met	
					100					105					110		
	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe	
					115					120					125		
45	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser	
	130						135					140					
	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	
	145					150					155					160	

RU 2 769 871 C2

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys
					165					170					175	
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				180					185					190		
5	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			195					200					205			
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
		210					215				220					
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
10	225					230				235						240
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
				245					250					255		
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
			260						265				270			
15	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
		275						280				285				
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val
		290					295				300					
	Tyr	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
20	305				310					315					320	
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
				325					330					335		
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
			340					345					350			
25	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
		355						360				365				
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		370				375					380					
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
30	385				390					395						400
	<210> 16															
	<211> 374															
	<212> БЕЛОК															
	<213> Искусственная последовательность															
35	<220>															
	<223> IL2 Fc слитый белок															
	<400> 16															
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly

RU 2 769 871 C2

					85					90				95						
					Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
					100					105								110		
					Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
5					115					120								125		
					Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
					130					135								140		
					Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
					145					150								155		160
10					Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Pro	Pro
					165					170								175		
					Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
					180					185								190		
					Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
15					195					200								205		
					His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
					210					215								220		
					Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
					225					230								235		240
20					Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
					245					250								255		
					His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
					260					265								270		
					Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro
25					275					280								285		
					Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu
					290					295								300		
					Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His
					305					310								315		320
30					Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu
					325					330								335		
					Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr
					340					345								350		
					Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser
35					355					360								365		
					Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr										
					370															
					<210>					17										
					<211>					548										
40					<212>					БЕЛОК										
					<213>					Искусственная последовательность										
					<220>															
					<223>					IL33 Fc IL2 слитый белок										
					<400>					17										
45					Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser
					1				5					10				15		
					Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr
					20									25				30		

RU 2 769 871 C2

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

RU 2769871 C2

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
420 425 430
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
435 440 445
5 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
450 455 460
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
465 470 475 480
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
10 485 490 495
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
500 505 510
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
515 520 525
15 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
530 535 540
Ser Thr Leu Thr
545
<210> 18
20 <211> 548
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> IL2 Fc IL33 слитый белок
25 <400> 18
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
30 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
35 65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
40 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
45 145 150 155 160
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
165 170 175
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

RU 2 769 871 C2

		180		185		190											
		Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
		195							200					205			
		Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
5		210						215					220				
		Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
		225					230					235				240	
		Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
					245						250					255	
10		Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
					260					265					270		
		Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
					275					280					285		
		Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
15		290						295					300				
		Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu
		305					310					315				320	
		Thr	Trp	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					325						330					335	
20		Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
					340					345					350		
		Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
					355				360					365			
		Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
25		370					375						380				
		Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr
		385					390					395				400	
		Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu
					405					410					415		
30		Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu
					420					425					430		
		Lys	Lys	Asp	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser
					435				440					445			
		Asn	Glu	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu
35		450					455						460				
		Ser	Pro	Thr	Lys	Asp	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser
		465					470					475				480	
		Val	Glu	Leu	His	Lys	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe
					485						490				495		
40		Val	Leu	His	Asn	Met	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr
					500					505					510		
		Asp	Pro	Gly	Val	Phe	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile
					515				520				525				
		Lys	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys
45		530					535					540					
		Leu	Ser	Glu	Thr												
		545															
		<210>	19														

<211> 548

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> IL33 Fc IL2 слитый белок

<400> 19

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser

1 5 10 15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr

10 20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val

35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp

50 55 60

15 Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp

65 70 75 80

Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys

85 90 95

Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met

20 100 105 110

His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe

115 120 125

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser

130 135 140

25 Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Gly

145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys

165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

30 180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

210 215 220

35 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val

245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

40 260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

275 280 285

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

290 295 300

45 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

325 330 335

RU 2769871 C2

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365
5 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
385 390 395 400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
10 405 410 415
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
420 425 430
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
435 440 445
15 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
450 455 460
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
465 470 475 480
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
20 485 490 495
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
500 505 510
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
515 520 525
25 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
530 535 540
Ser Thr Leu Thr
545
<210> 20
30 <211> 548
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> IL2 Fc IL33 слитый белок
35 <400> 20
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
40 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
45 65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

RU 2 769 871 C2

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

				485					490					495		
	Val	Leu	His	Asn	Met	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr
				500					505					510		
	Asp	Pro	Gly	Val	Phe	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile
5			515					520					525			
	Lys	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys
			530				535					540				
	Leu	Ser	Glu	Thr												
	545															
10	<210>	21														
	<211>	400														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
15	<223>	IL33 Fc слитый белок														
	<400>	21														
	Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr
20				20					25					30		
	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val
			35					40					45			
	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp
		50					55					60				
25	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp
	65				70					75					80	
	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His	Lys
				85					90					95		
	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Met
30				100					105					110		
	His	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Glu	Ser	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe
			115					120					125			
	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser
		130					135					140				
35	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly
	145					150					155				160	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys
				165						170				175		
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
40				180					185					190		
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			195					200					205			
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
		210					215					220				
45	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	225					230					235				240	
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
				245						250				255		

RU 2769871 C2

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285
5 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
290 295 300
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
10 325 330 335
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365
15 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
385 390 395 400
<210> 22
20 <211> 598
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Ab2HeavyIL2vC
25 <400> 22
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
30 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
35 65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
100 105 110
40 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
45 145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

RU 2769871 C2

				180					185				190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
				195					200				205			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
5				210				215				220				
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	225					230				235						240
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245						250						255
10	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				260					265				270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
				275				280				285				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr
15				290				295				300				
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
	305					310					315					320
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325						330						335
20	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
				340					345				350			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				355				360				365				
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
25				370				375				380				
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
	385					390					395					400
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405						410						415
30	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				420					425				430			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
				435				440				445				
	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
35				450				455				460				
	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
	465					470					475					480
	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
				485						490						495
40	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro
				500					505				510			
	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu
				515				520				525				
	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His
45				530				535				540				
	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu
	545					550					555					560
	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr

		565		570		575													
		Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser		
					580					585					590				
		Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												
5					595														
		<210>	23																
		<211>	594																
		<212>	БЕЛОК																
		<213>	Искусственная последовательность																
10		<220>																	
		<223>	Ab4HeavyIL2vC																
		<400>	23																
		Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
	1					5					10				15				
15		Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu		
					20					25					30				
		Ser	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
					35				40					45					
		Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe		
20			50					55					60						
		Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr		
	65						70				75					80			
		Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
					85				90					95					
25		Ala	Thr	Trp	Trp	Asp	Phe	His	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
					100				105					110					
		Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		
					115				120					125					
		Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys		
30			130				135						140						
		Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
	145						150				155					160			
		Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		
					165				170					175					
35		Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
					180				185					190					
		Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
					195				200					205					
		Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
40			210				215						220						
		Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
	225					230				235					240				
		Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
					245				250					255					
45		Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
					260				265					270					
		Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
					275				280					285					

RU 2 769 871 C2

	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	290						295					300				
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
	305					310					315					320
5	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
					325					330					335	
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				340					345					350		
	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
10			355					360					365			
	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370							375					380			
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
	385					390					395					400
15	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405						410					415	
	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				420					425					430		
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly
20			435					440					445			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr
	450						455					460				
	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu
	465					470					475					480
25	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys
				485						490					495	
	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr
			500						505					510		
	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu
30			515					520					525			
	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg
	530						535					540				
	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser
	545					550					555					560
35	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val
				565						570					575	
	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr
				580					585					590		
	Leu	Thr														
40	<210>	24														
	<211>	598														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
45	<223>	Ab2HeavyIL2vC(W)														
	<400>	24														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	

RU 2 769 871 C2

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

RU 2769871 C2

	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
					405					410					415	
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				420					425					430		
5	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
			435					440					445			
	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		450					455					460				
	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
10	465					470				475						480
	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
				485					490					495		
	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro
			500						505					510		
15	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu
			515					520					525			
	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His
		530					535					540				
	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu
20	545					550				555						560
	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr
				565					570					575		
	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser
				580				585					590			
25	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr										
			595													
	<210>	25														
	<211>	594														
	<212>	БЕЛОК														
30	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Ab4HeavyIL2vC(W)														
	<400>	25														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
35	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu
			20						25					30		
	Ser	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
40	Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75						80
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
45				85					90					95		
	Ala	Thr	Trp	Trp	Asp	Phe	His	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu

RU 2769871 C2

		115				120				125							
		Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
		130							135				140				
		Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
5		145					150					155					160
		Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
						165					170					175	
		Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
					180					185					190		
10		Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
					195					200				205			
		Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
		210						215					220				
		Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
15		225					230					235					240
		Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
						245					250					255	
		Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
					260					265				270			
20		Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
					275					280				285			
		Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
		290						295					300				
		Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
25		305					310					315					320
		Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
						325					330					335	
		Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro
					340					345				350			
30		Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu
					355					360				365			
		Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
		370						375					380				
		Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
35		385					390					395					400
		Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
					405						410					415	
		Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
					420					425				430			
40		His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly
					435					440				445			
		Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr
		450						455					460				
		Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu
45		465					470					475					480
		Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys
					485					490						495	
		Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr

RU 2 769 871 C2

		500		505		510											
		Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu
		515							520					525			
		Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg
5		530						535					540				
		Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser
		545					550					555				560	
		Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val
					565						570					575	
10		Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr
				580					585					590			
		Leu	Thr														
		<210>	26														
		<211>	450														
15		<212>	БЕЛЮК														
		<213>	Искусственная последовательность														
		<220>															
		<223>	Ab2Heavy(V)														
		<400>	26														
20		Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
		1			5					10					15		
		Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr
				20					25					30			
		Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
25			35					40					45				
		Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	Arg	Phe	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60					
		Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Thr	Thr	Ala	Tyr
		65				70				75						80	
30		Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95			
		Ala	Arg	His	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp	Val	Trp	Gly
				100					105					110			
		Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
35			115					120					125				
		Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
			130				135					140					
		Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
		145				150				155						160	
40		Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170						175		
		Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				180				185						190			
		Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
45			195					200					205				
		Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
			210				215					220					
		Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly

RU 2 769 871 C2

	225		230		235		240
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Met
				245		250	255
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
5				260		265	270
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				275		280	285
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
				290		295	300
10	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	305				310		315
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
				325		330	335
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
15				340		345	350
	Tyr	Val	Tyr	Pro	Pro	Ser	Arg
				355		360	365
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
				370		375	380
20	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
	385				390		395
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				405		410	415
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
25				420		425	430
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				435		440	445
	Pro	Gly					
		450					
30	<210>	27					
	<211>	446					
	<212>	БЕЛОК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
35	<223>	Ab4Heavy(V)					
	<400>	27					
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser
	1			5			10
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu
40				20			25
	Ser	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln
				35			40
	Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Asp
				50			55
45	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr
	65					70	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg
						85	

RU 2 769 871 C2

	Ala	Thr	Trp	Trp	Asp	Phe	His	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
					100				105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
					115				120					125		
5	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
					130				135					140		
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
	145					150					155					160
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
10					165					170					175	
	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
					180				185					190		
	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
					195				200					205		
15	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
					210				215					220		
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
	225					230						235				240
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
20					245					250					255	
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
					260				265					270		
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
					275				280					285		
25	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
					290				295					300		
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
	305					310						315				320
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
30					325					330					335	
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Tyr	Pro
					340				345					350		
	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
					355				360					365		
35	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
					370				375					380		
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
	385					390						395				400
	Asp	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
40					405					410					415	
	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
					420				425					430		
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
					435				440					445		
45	<210>	28														
	<211>	374														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														

<220>

<223> IL2vCFc(V)

<400> 28

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

355 360 365
 Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 370
 <210> 29
 5 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Ab2Kappa
 10 <400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 15 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 20 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 25 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 30 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 35 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 30
 40 <211> 219
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Ab4Kappa
 45 <400> 30
 Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 5 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95
 10 Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 15 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 20 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 25 210 215
 <210> 31
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> Пептидный линкер
 <400> 31
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

(57) Формула изобретения

1. Слитый белок для активации регуляторных Т-клеток, содержащий:

а) белок IL-2 человека;

б) белок Fc иммуноглобулина; и

40 в) белок, который связывается с интерлейкин-1 рецептор-подобным белком 1 (ST2), где белок, который связывается с ST2, является белком IL-33 человека, антителом, специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом.

2. Слитый белок по п.1, где белок, который связывается с ST2, является белком IL-33 человека.

45 3. Слитый белок по п.1, где белок, который связывается с ST2, является антителом, специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом.

4. Слитый белок по п.1, дополнительно содержащий по меньшей мере один пептидный линкер.

5. Слитый белок по п.1, где белок IL-2 человека содержит IL-2 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L и Q126F, относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

6. Слитый белок по п.1, где белок Fc иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из варианта Fc IgG1 человека с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9.

7. Слитый белок по п.1, где белок IL-33 человека содержит IL-33 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: C208S, C227S, C232S и C259S, относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10.

8. Слитый белок по п.4, где пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

9. Слитый белок по п.1, дополнительно содержащий первый пептидный линкер и второй пептидный линкер.

10. Слитый белок по п.9, где слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой

а) С-конец белка IL-2 человека слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкера;

б) N-конец белка Fc IgG слит через пептидную связь с С-концом первого пептидного линкера;

в) N-конец второго пептидного линкера слит через пептидную связь с С-концом белка Fc IgG; и

г) N-конец белка, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с С-концом второго пептидного линкера.

11. Слитый белок по п.9, где слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой

а. С-конец белка, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкера;

б. N-конец белка Fc IgG слит через пептидную связь с С-концом первого пептидного линкера;

в. N-конец второго пептидного линкера слит через пептидную связь с С-концом белка Fc IgG; и

г. N-конец белка IL-2 человека слит через пептидную связь с С-концом второго пептидного линкера.

12. Слитый белок по п.1, где слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок по любому из пп.1-12.

14. Димерный белок для активации регуляторных Т-клеток, где димерный белок содержит слитый белок по любому из пп.1-12.

15. Димерный белок для активации регуляторных Т-клеток, где димерный белок, содержащий первый слитый белок и второй слитый белок, где:

а. каждый слитый белок включает белковый Fc-домен иммуноглобулина (IgG) и по меньшей мере один дополнительный белковый домен, выбранный из группы, состоящей из

i. белка IL-2 человека; и

ii. белка, который связывается с интерлейкин-1 рецептор-подобным белком 1 (ST2);

и

б. димерный белок включает по меньшей мере один белок IL-2 человека и по меньшей мере один белок, который связывается с ST2,

где белок, который связывается с ST2, является белком IL-33 человека, антителом,

специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом.

16. Димерный белок по п.15, где

а. первый слитый белок включает белок IL-2 человека, первый белок Fc иммуноглобулина и первый пептидный линкер; и

5 б. второй слитый белок включает белок, который связывается с ST2, второй белок Fc иммуноглобулина и второй пептидный линкер.

17. Димерный белок по п.16, где

а. первый слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой

10 i. С-конец белка IL-2 человека слит через пептидную связь с N-концом первого пептидного линкера; и

ii. N-конец первого белка Fc IgG слит через пептидную связь с С-концом первого пептидного линкера; и

б. второй слитый белок имеет такую конфигурацию, в которой

15 i. С-конец второго белка Fc IgG слит через пептидную связь с N-концом второго пептидного линкера; и

ii. N-конец белка домена, который связывается с ST2, слит через пептидную связь с С-концом второго пептидного линкера.

18. Димерный белок по любому из пп.15-17, где белок, который связывается с ST2, является белковым доменом IL-33 человека.

20 19. Димерный белок по любому из пп.15-17, где белок, который связывается с ST2, является антителом, специфичным к ST2, или его антигенсвязывающим фрагментом.

20. Димерный белок по п.15, где по меньшей мере один из слитых белков дополнительно включает по меньшей мере один пептидный линкер.

25 21. Димерный белок по любому из пп.15-17, где белок IL-2 человека включает IL-2 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L и Q126F, относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

22. Димерный белок по любому из пп.15-17, где белок Fc иммуноглобулина включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из варианта Fc IgG1 человека SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:

30 9.

23. Димерный белок по п.18, где белок IL-33 человека включает IL-33 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из: C208S, C227S, C232S и C259S, относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10.

35 24. Димерный белок по п.20, где пептидный линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

25. Димерный белок по п.15, где:

а. первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

40 б. первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

с. первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и второй слитый белок включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

45 15;

д. первый слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

27. Димерный белок по п.14, где димерный белок селективно взаимодействует с $ST2^+$ регуляторными Т-клетками по сравнению с $ST2^-$ регуляторными Т-клетками.

28. Фармацевтическая композиция для активации регуляторных Т-клеток, где фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество:

- i) слитого белка по любому из пп.1-12,
- ii) димерный белок, содержащий слитый белок по любому из пп.1-12, или
- iii) димерный белок по любому из пп.14-17.

29. Способ лечения состояния, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.28, где состояние выбрано из группы, состоящей из воспалительной миопатии, воспалительного состояния жировой ткани, воспалительного состояния кишечника, воспалительного состояния легких и аутоиммунного заболевания.

30. Способ по п.29, где введение приводит к большему увеличению уровней $ST2^+$ регуляторной Т-клетки у индивида по сравнению с уровнями $ST2^-$ регуляторных Т-клеток у индивида.

31. Способ по п.29, где введение селективно активирует $ST2^+$ регуляторные Т-клетки у индивида по сравнению с $ST2^-$ регуляторными Т-клетками у индивида.

32. Способ по п.29, где терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг.

33. Способ по п.29, где состояние является воспалительной миопатией.

34. Способ по п.33, где воспалительная миопатия выбрана из группы, состоящей из мышечной дистрофии, полимиозита, дерматомиозита.

35. Способ по п.29, где состояние выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания жировой ткани, воспалительного заболевания толстой кишки и воспалительного заболевания легкого.

36. Способ по п.35, где жировая ткань является висцеральной жировой тканью.

37. Способ по п.29, где состояние является аутоиммунным заболеванием.

38. Способ по п.37, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции трансплантат против хозяина, вульгарной пузырчатки, системной красной волчанки, склеродермии, язвенного колита, болезни Крона, псориаза, диабета 1-го типа, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза, очаговой алопеции, увеита, оптиконевромиелита и миодистрофии Дюшенна.

39. Способ по любому из пп.29-38, где введение является внутривенным.

40. Способ по любому из пп.29-38, где введение является подкожным.

41. Способ по любому из пп.29-38, где индивид является человеком.

42. Способ селективной активации $ST2^+$ регуляторной Т-клетки по сравнению с $ST2^-$ регуляторной Т-клеткой у индивида, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.28.

43. Способ по п.42, где терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 250 мкг/кг.

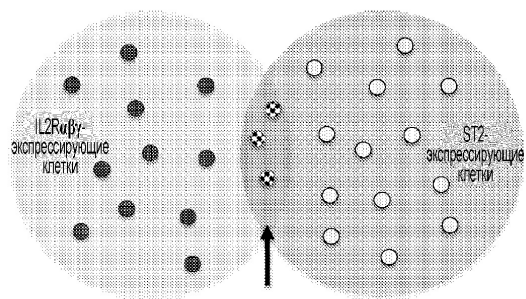
44. Способ по п.42 или 43, где введение является внутривенным.

45. Способ по п.42 или 43, где введение является подкожным.

46. Способ по любому из пп.42 или 43, где индивид является человеком.

1

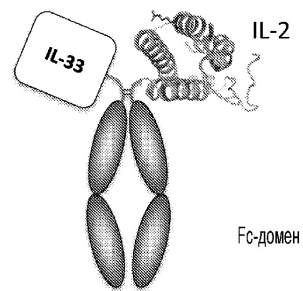
1/23



ФИГ. 1

2

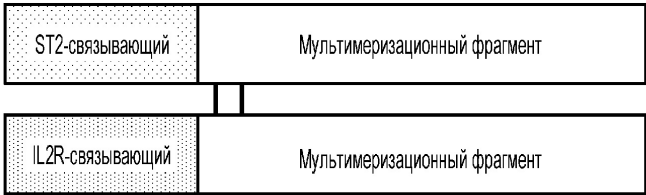
2/23



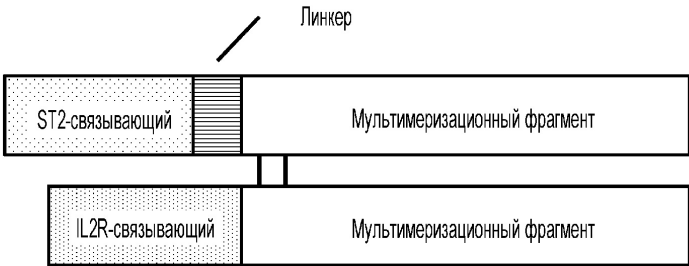
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

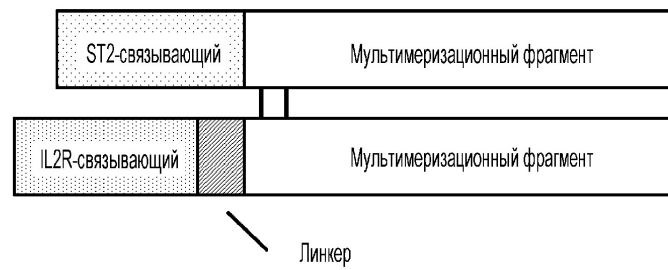


ФИГ. 3В

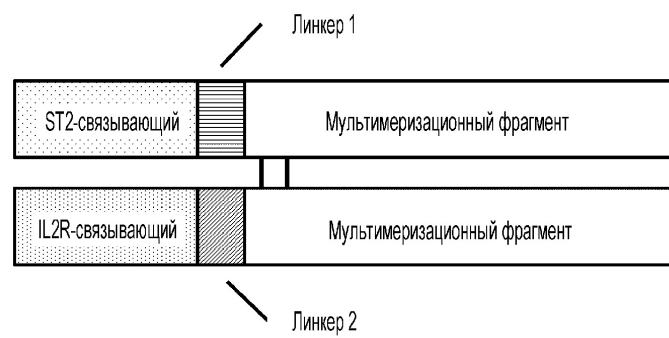


ФИГ. 3С

4/23

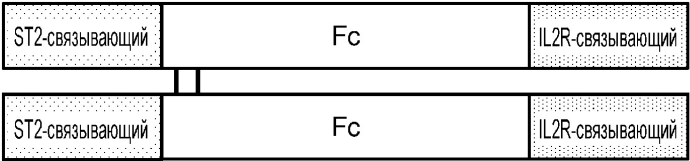


ФИГ. 3D



ФИГ. 3E

5/23

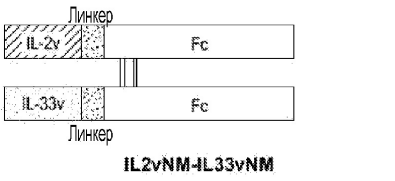


ФИГ. 3F

6/23



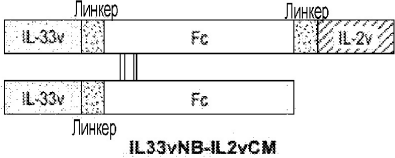
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 4С

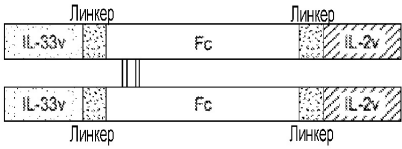


ФИГ. 4D

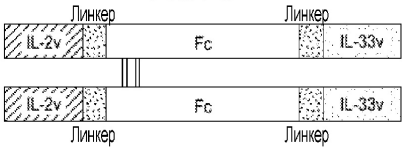


ФИГ. 4Е

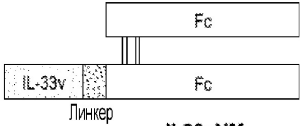
7/23



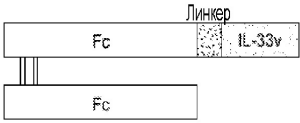
IL33vNB-IL2vCB
ФИГ. 4F



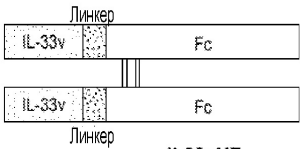
IL2vNB-IL33vCB
ФИГ. 4G



IL33vNM
ФИГ. 4H

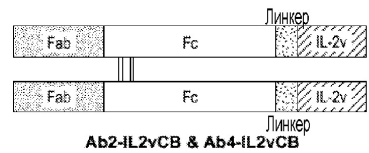


IL33vCM
ФИГ. 4I



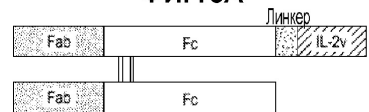
IL33vNB
ФИГ. 4J

8/23



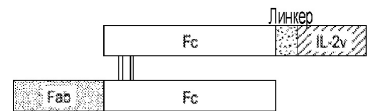
Ab2-IL2vCB & Ab4-IL2vCB

ФИГ. 5А



Ab2-IL2vCM & Ab4-IL2vCM

ФИГ. 5В



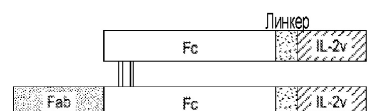
Ab2M-IL2vCM & Ab4M-IL2vCM

ФИГ. 5С



Ab2M-IL2vNM & Ab4M-IL2vNM

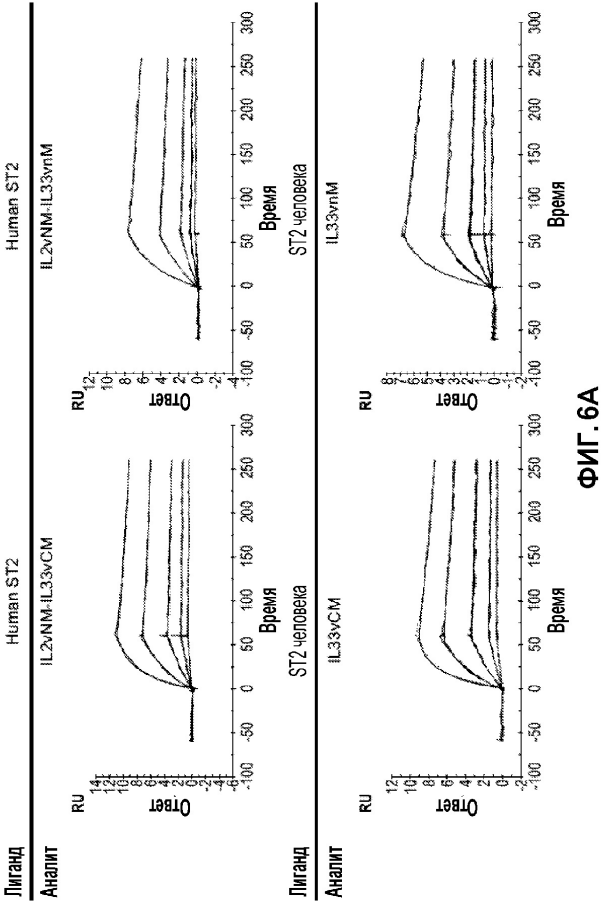
ФИГ. 5D

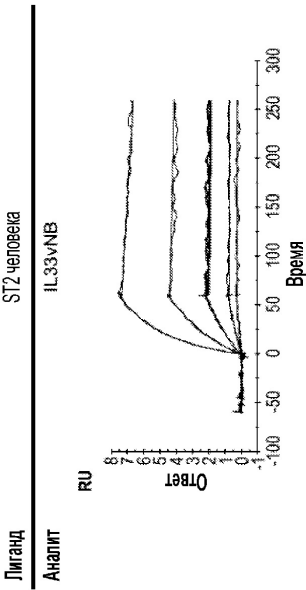


Ab2M-IL2vCB & Ab4M-IL2vCB

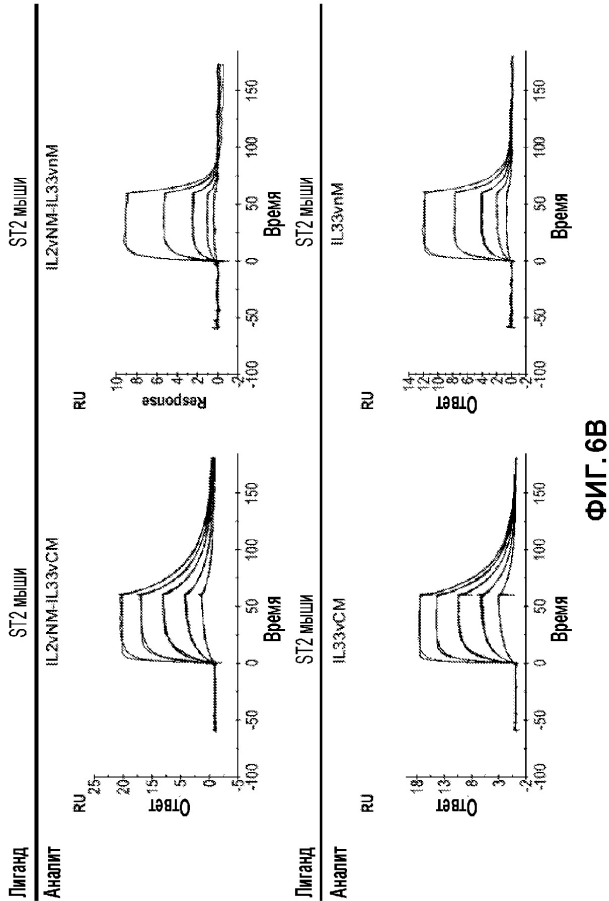
ФИГ. 5Е

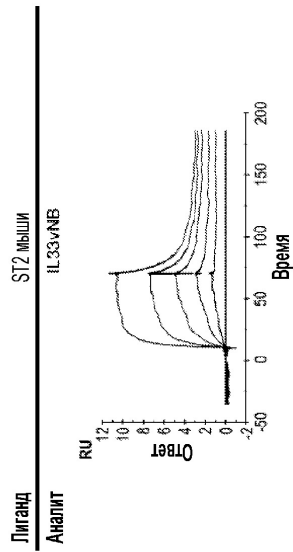
9/23



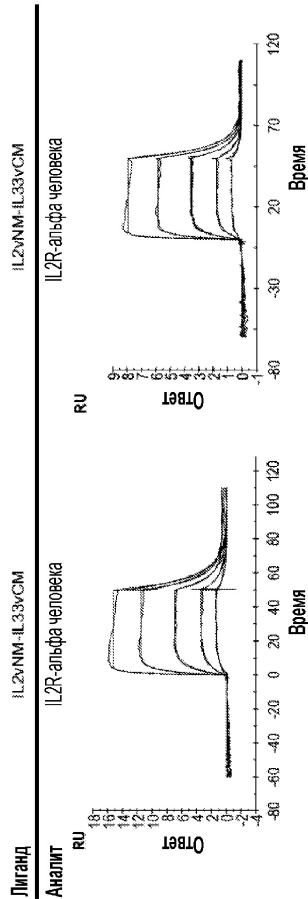


ФИГ. 6А
(продолжение)

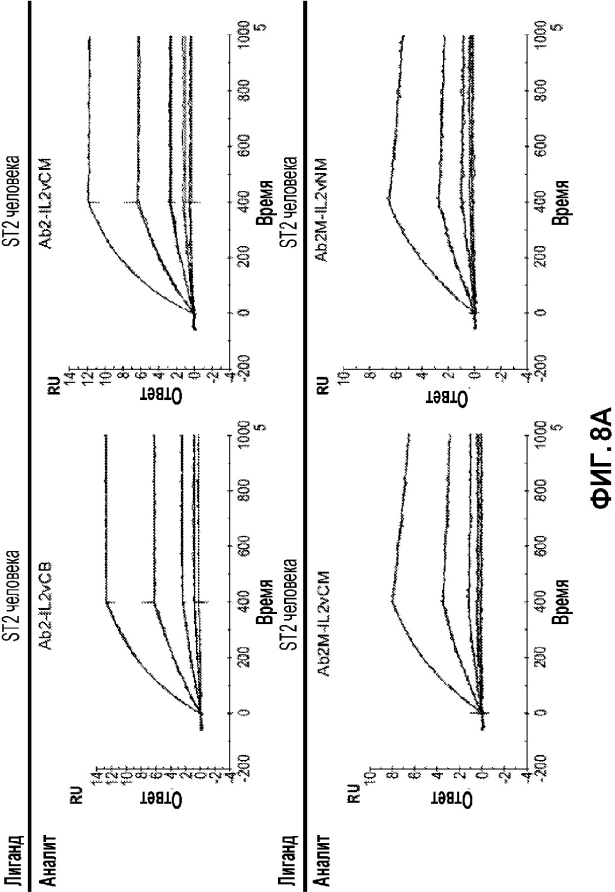


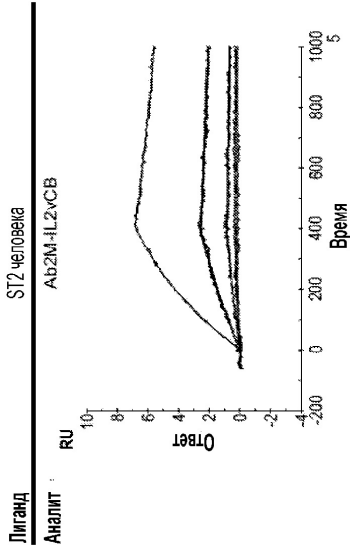


ФИГ. 6В
(продолжение)



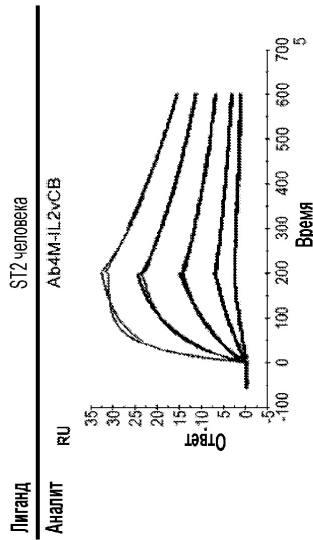
ФИГ. 7



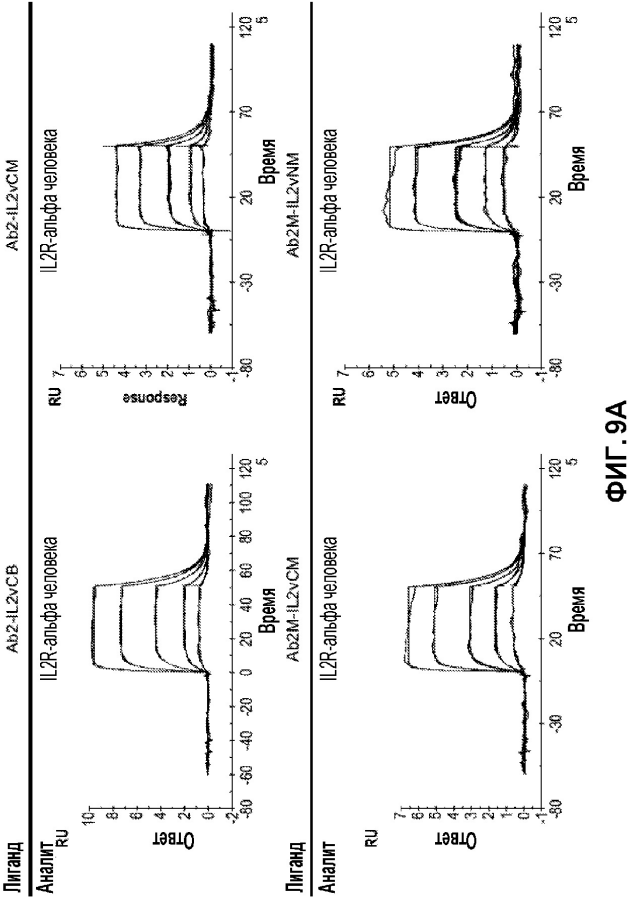


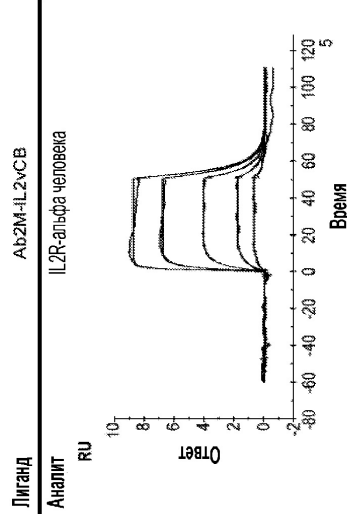
ФИГ. 8А
(продолжение)



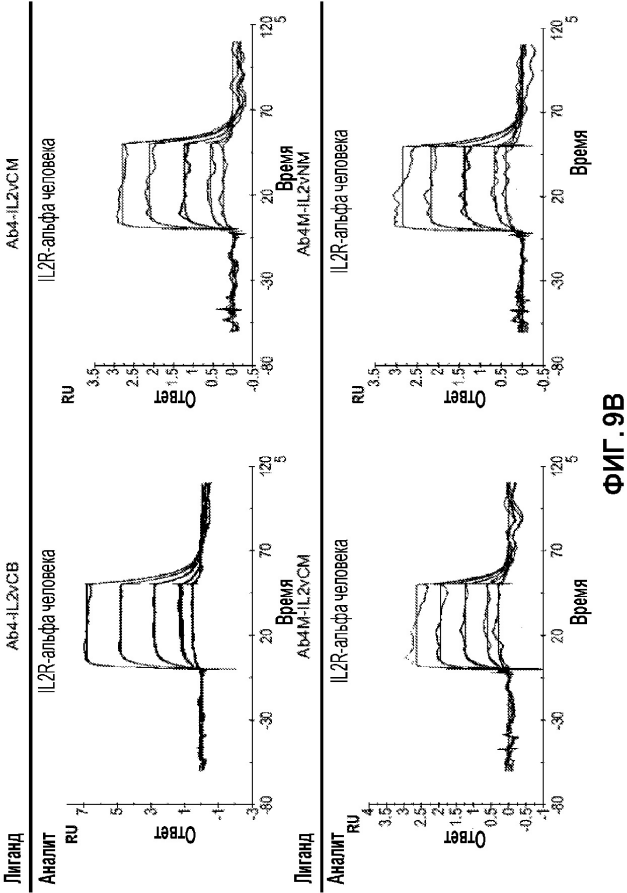


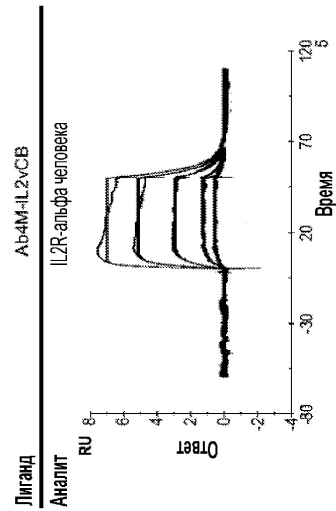
ФИГ. 8В
(продолжение)





ФИГ. 9А
(продолжение)

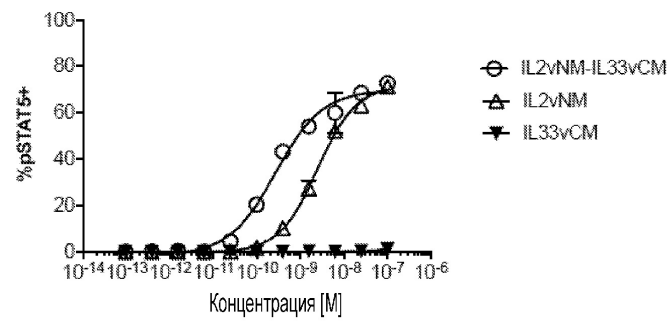




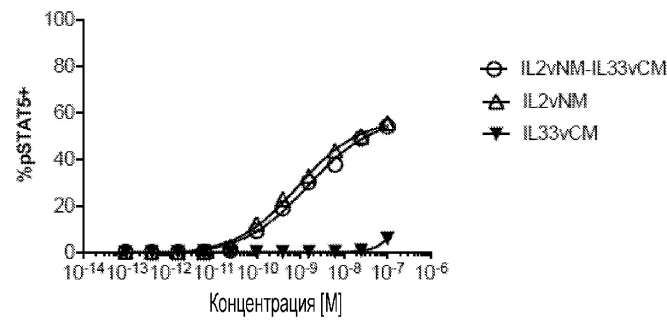
ФИГ. 9В
(продолжение)

22/23

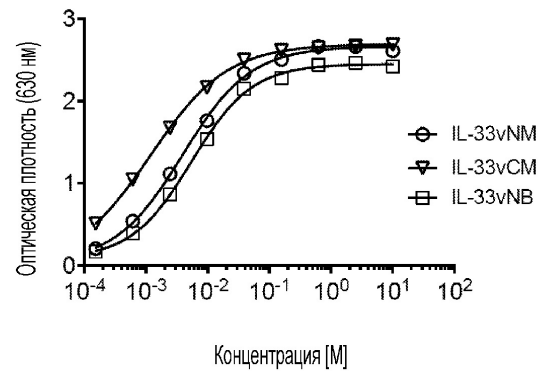
ФИГ. 10А



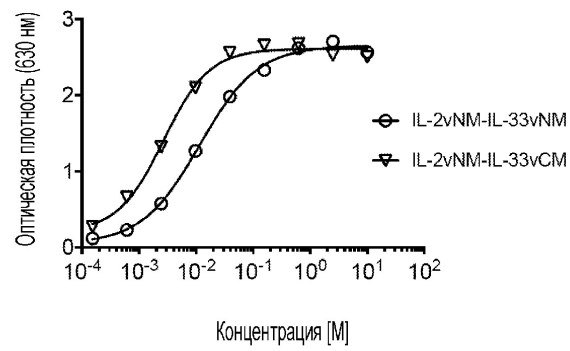
ФИГ. 10В



23/23



ФИГ. 11А



ФИГ. 11В