

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034326**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.28

(51) Int. Cl. *C07K 14/55* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
201591766

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(54) **МУТЕИН ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРУЮЩИЙ РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/784,669**

(56) WO-A1-2010085495
WO-A2-2009061853

(32) **2013.03.14**

(33) **US**

(43) **2016.02.29**

(86) **PCT/US2014/029111**

(87) **WO 2014/153111 2014.09.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Гэйвин Марк А., Каннан
Гунасекаран, Ли Ли, Пирсон Джошуа
Т., Кароу Маргарет (US)**

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

(57) Изобретение относится к мутеину интерлейкина-2 человека, стимулирующему регуляторные Т-клетки; слитому белку, включающему фрагмент Fc и заявленный мутеин IL-2; нуклеиновым кислотам, кодирующим заявленные мутеин IL-2 и слитый белок; вектору экспрессии и клетке-хозяину, содержащим заявленную нуклеиновую кислоту; способам получения заявленных мутеина IL-2 и слитого белка. Также изобретение относится к способам, основанным на использовании заявленных мутеина IL-2 или слитого белка, таким как способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток к нерегуляторным Т-клеткам или к НК-клеткам, способ лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания или состояния, а также способ контроля данного лечения.

B1

034326

**034326
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №61/784669, поданной 14 марта 2013 г. Указанная выше заявка включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей, предоставленным в электронной форме с помощью системы EFS-Web. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла в текстовом формате, озаглавленного A-1826-WO-PC-T_ST25.txt, который был создан 25 февраля 2014 г. и имеет размер 40849 байт. Информация, содержащаяся в перечне последовательностей, предоставленном в электронной форме, полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Уровень техники

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) связывается с тремя трансмембранными субъединицами рецептора: ИЛ-2R β и ИЛ-2R γ , которые совместно активируют передачу сигналов внутри клеток после связывания с ИЛ-2, и белком CD25 (ИЛ-2R α), который стабилизирует взаимодействие между ИЛ-2 и ИЛ-2R $\beta\gamma$. Передача сигналов посредством ИЛ-2R $\beta\gamma$ задействована в путях передачи сигналов с участием PI3-киназы, Ras-MAP-киназы и STAT5.

Для того чтобы отвечать на низкие концентрации ИЛ-2, которые обычно присутствуют в тканях, Т-клеткам необходима экспрессия CD25. Подгруппа Т-клеток, экспрессирующих CD25, включает FoxP3⁺ регуляторные Т-клетки (T_{рег} клетки), которые необходимы для подавления аутоиммунного воспаления, и FoxP3⁺ Т-клетки, которые подверглись активации для экспрессии CD25. FoxP3⁻ CD25⁺ эффекторные Т-клетки (T_{эфф}) могут относиться к типу CD4⁺ клеток или CD8⁺ клеток, при этом оба типа могут способствовать развитию воспаления, аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантата органа или реакции "трансплантат против хозяина". Передача сигналов с участием STAT5, стимулированная ИЛ-2, имеет решающее значение для нормального роста и выживания T-рег клеток и для достижения высокого уровня экспрессии FoxP3.

В заявке WO 2010/085495 тех же заявителей мы описываем применение мутеинов ИЛ-2 для предпочтительной экспансии или стимуляции T_{рег} клеток. Влияние описанных мутеинов на T_{рег} клетки можно использовать для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний при введении субъекту таких мутеинов. Несмотря на то, что мутеины ИЛ-2, описанные в настоящей заявке, можно применять для предпочтительной экспансии T_{рег} по сравнению с T_{эфф} клетками в условиях *in vivo*, было желательно создать мутеины ИЛ-2, которые имели бы оптимальные характеристики для терапевтического применения у человека.

Краткое описание изобретения

В настоящей заявке описаны мутеины ИЛ-2, которые могут быть получены с высоким выходом и обладают оптимизированной фармакологической активностью. В ходе исследований, направленных на получение образца терапевтического средства на основе мутеина ИЛ-2 для применения у человека, было сделано несколько неожиданных и непредсказуемых наблюдений. Мутеины ИЛ-2, описанные в настоящей заявке, были получены в результате указанных исследований.

Мутеины ИЛ-2, описанные в настоящей заявке, имеют минимальное количество изменений ИЛ-2, что уменьшает вероятность возникновения иммунного ответа против мутеина ИЛ-2 и/или эндогенного ИЛ-2, при этом сохраняется способность указанных мутеинов стимулировать предпочтительную экспансию и активацию T_{рег} клеток. Кроме того, в некоторых вариантах реализации мутеин ИЛ-2 гибридолизован с молекулой, например, фрагментом Fc антигена, которая увеличивает период полувыведения из сыворотки крови при введении субъекту. Мутеины ИЛ-2 имеют короткий период полувыведения из сыворотки крови (от 3 до 5 часов при подкожной инъекции). Примеры слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, описанные в настоящей заявке, имеют период полувыведения у человека, составляющий по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней или по меньшей мере 25 дней. Подобное влияние на фармакокинетику мутеинов ИЛ-2 позволяет уменьшить или снизить частоту введения терапевтического средства на основе мутеина ИЛ-2.

Также при создании большой молекулы для фармацевтического применения особое внимание должно быть уделено возможности получения указанной большой молекулы в больших количествах при одновременном снижении до минимума агрегации и повышении до максимума стабильности молекулы. Слитая молекула, содержащая мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, обладает такими характеристиками.

Помимо этого, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, содержит фрагмент Fc из IgG1. Было установлено, что в тех случаях, когда желательным является устранение эффекторных функций IgG1 (например, ADCC-индуцирующей активности), мутационная замена аспарагина в положении 297 глицином (N297G; в соответствии с системой нумерации ЕС) обеспечивает существенное улучшение эффективности очистки и биофизических свойств по сравнению с другими мутациями, которые приводят к отсутствию гликозилирования фрагмента Fc IgG1. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения остатки цистеина вводят во фрагмент Fc, чтобы обеспечить формирование дисульфидных связей, которые увеличивают

стабильность молекулы, содержащей негликозилированный фрагмент Fc. Полезные свойства негликозилированного фрагмента Fc находятся за рамками обсуждения слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Таким образом, в настоящем изобретении предложены Fc-содержащие молекулы, Fc-слитые белки и антитела, содержащие замену N297G и, возможно, замену одного или более дополнительных остатков цистеином.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к гликозилированным пептидным линкерам. Предпочтительные линкерные пептиды, которые пригодны для модификации путем N-гликозилирования, включают GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен мутеин интерлейкина-2 (ИЛ-2) человека, содержащий замену V91K и имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, при этом указанный мутеин ИЛ-2 предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 человека содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный мутеин содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислота в положении 125 представляет собой аланин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислота в положении 125 представляет собой цистеин.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен Fc-слитый белок, содержащий фрагмент Fc и мутеин ИЛ-2 человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc представляет собой фрагмент Fc IgG1 человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc IgG1 человека содержит одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного фрагмента Fc. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения IgG1 человека содержит замену в положении N297. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена в положении N297 представляет собой N297G. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения Fc-слитый белок содержит замену или делецию С-концевого лизина указанного фрагмента Fc IgG человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в указанном фрагменте Fc IgG человека удален С-концевой лизин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc и мутеин ИЛ-2 человека в указанном белке соединены линкером. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный линкер представляет собой GGGGS, GGNGT или YGNGT. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный линкер представляет собой GGGGS. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит вставки, замены или делеции аминокислот, которые приводят к изменению характера гликозилирования указанного Fc-слитого белка при экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 содержит замену T3 или T3A. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 содержит замену T3N или T3A. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит мутацию S5. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит мутацию S5T. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения Fc-слитый белок содержит димер Fc. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный Fc-слитый белок содержит два мутеина ИЛ-2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный Fc-слитый белок содержит один мутеин ИЛ-2.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутеин ИЛ-2 человека или часть Fc антитела и мутеины ИЛ-2 человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная часть Fc антитела и мутеин ИЛ-2 человека кодируются в пределах одной открытой рамки считывания. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc представляет собой фрагмент Fc IgG1 человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc IgG1 человека содержит одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного фрагмента Fc. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения IgG1 человека содержит замену в положении N297. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена в положении N297 представляет собой N297G. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc IgG1 человека содержит замену или делецию С-концевого лизина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в указанном фрагменте Fc IgG человека удален С-концевой лизин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота дополнительно кодирует линкер, соединяющий часть Fc антитела и мутеин ИЛ-2 человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный линкер представляет собой GGGGS, GGNGT или YGNGT. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный линкер представляет собой GGGGS. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит вставки, замены или делеции аминокислотных остатков, изменяющие характер гликозилирования белка, содержащего ука-

занный мутеин ИЛ-2, при экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 содержит замену ТЗ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 содержит замену ТЗN или ТЗА. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 содержит замену ТЗN. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит мутацию S5. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит мутацию S5T.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, описанную выше, функционально связанную с промотором.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, описанную выше. В одном варианте реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (СНО).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ изготовления мутеина ИЛ-2 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, описанной выше, в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного промотора, и получение мутеина ИЛ-2 человека из этой культуры. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной выше, в условиях, которые обеспечивают экспрессию указанного промотора, и получение Fc-слитого белка из этой культуры.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в популяции Т-клеток, включающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством мутеина ИЛ-2 человека, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в популяции Т-клеток, включающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством Fc-слитого белка, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества мутеина ИЛ-2 человека, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества Fc-слитого белка, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству естественных клеток-киллеров (НК-клеток) в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества мутеина ИЛ-2 человека, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁻CD19⁻ лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ клеток к количеству CD3⁻CD19⁻ лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ увеличения отношения количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству естественных клеток-киллеров (НК-клеток) в пери-

ферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества Fc-слитого белка, описанного выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19- лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19-лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается по меньшей мере на 50%.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего воспалительное или аутоиммунное заболевание, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества мутеина ИЛ-2, описанного выше.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего воспалительное или аутоиммунное заболевание, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества Fc-слитого белка, описанного выше. В одном варианте реализации настоящего изобретения введение вызывает уменьшение по меньшей мере одного симптома указанного заболевания. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества регуляторных Т-клеток (T_{reg}) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта увеличивается после введения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отношение количества регуляторных Т-клеток (T_{reg}) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта остается по существу неизменным после введения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", гепатит С-индуцированный васкулит, сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, спонтанную потерю беременности, атопические заболевания или воспалительные заболевания кишечника.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен фрагмент Fc антитела IgG1 человека, при этом указанный фрагмент Fc содержит мутацию N297G, и аминокислотная последовательность указанного фрагмента Fc IgG1 человека по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фрагмента Fc IgG1 человека по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc человеческого IgG1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc человеческого IgG1 дополнительно содержит одну или более мутаций для стабилизации полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения одна или более аминокислот, приведенных в SEQ ID NO: 3, замещены цистеином. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, замещены цистеином. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc содержит замену A287C и L306C в пределах аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc содержит замену V259C и L306C в пределах аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc содержит замену R292C и V302C в пределах аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент Fc содержит замену V323C и I332C в пределах аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее фрагмент Fc, описанный выше.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен Fc-слитый белок, содержащий фрагмент Fc, описанный выше.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ создания молекулы, содержащей негликозилированный фрагмент Fc IgG1, при экспрессии в клетках млекопитающих, включающий этап мутационной замены кодона N297 во фрагменте Fc кодоном, кодирующим глицин.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен Fc-слитый белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-слитый белок. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена клетка, содержащая указанную нуклеиновую кислоту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ изготовления Fc-слитого белка, включающий инкубирование клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного Fc-слитого белка. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания у субъекта, включающий введение эффективного количества Fc-слитого белка указанному субъекту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина".

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ контроля ответа субъекта

на лечение с применением мутеина интерлейкина-2 (ИЛ-2) человека, описанного выше, или Fc-слитого белка, описанного выше, включающий детектирование определенного изменения у указанного субъекта, причем указанное изменение представляет собой повышение температуры тела, увеличение концентрации С-реактивного белка (СРБ) в периферической крови указанного субъекта, уменьшение количества тромбоцитов в периферической крови указанного субъекта, уменьшение количества нейтрофилов в периферической крови указанного субъекта или уменьшение концентрации альбумина в периферической крови указанного субъекта, при этом в случае детектирования такого изменения лечение прекращают, приостанавливают, уменьшают частоту дозирования или уменьшают количество вводимого препарата. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное изменение включает повышение температуры тела по меньшей мере на 0,5°C, увеличение концентрации С-реактивного белка в периферической крови указанного субъекта по меньшей мере на 0,2 мг/мл, уменьшение количества тромбоцитов в периферической крови указанного субъекта по меньшей мере в 0,8 раза, уменьшение количества нейтрофилов в периферической крови указанного субъекта по меньшей мере в 0,8 раза или снижение концентрации альбумина в периферической крови указанного субъекта по меньшей мере в 0,4 раза.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - гомодимеризация путем гибридизации с С-концом фрагмента Fc IgG не изменяет активность мутеинов ИЛ-2, имеющих сниженную эффективность и высокую аффинность в отношении CD25, согласно результатам краткосрочного исследования с использованием стимуляции.

Фиг. 2А и фиг. 2В - мутеины ИЛ-2, содержащие указанные мутации и гибридизованные с С-концом одной стороны Fc-гетеродимера, испытывали для определения их способности стимулировать фосфорилирование STAT5 в Т-клетках. Эти мутеины также содержали три мутации, придающие высокую аффинность в отношении CD25 (V69A, N71R, Q74P). Их активность сравнивали с активностью трех форм ИЛ-2, не гибридизованных с фрагментом Fc (открытые символы): ИЛ-2 дикого типа, Ha дикого типа (высокая аффинность в отношении CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность в отношении CD25 и сниженная активность при передаче сигналов) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Ответы фосфо-STAT5 приведены для популяции FoxP3+ CD4+ и FoxP3-CD4+ Т-клеток с интенсивностью сигнала выше порогового значения.

Фиг. 3 - пролиферация подгруппы Т-клеток в ответ на титрование доз мутеинов ИЛ-2, гибридизованных с Fc-гетеродимером. Активность слитых белков сопоставляли с таковой для трех форм ИЛ-2, не гибридизованных с фрагментом Fc (открытые символы): ИЛ-2 дикого типа, Ha дикого типа (высокая аффинность в отношении CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность в отношении CD25 и сниженная активность при передаче сигналов) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

Фиг. 4 - пролиферация NK-клеток в ответ на титрование доз мутеинов ИЛ-2, гибридизованных с Fc-гетеродимером. Активность слитых белков сопоставляли с таковой для трех форм ИЛ-2, не гибридизованных с фрагментом Fc (открытые символы): ИЛ-2 дикого типа, Ha дикого типа (высокая аффинность в отношении CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность в отношении CD25 и сниженная активность при передаче сигналов) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

Фиг. 5 - пролиферация подгруппы Т-клеток в ответ на титрование доз мутеинов ИЛ-2, гибридизованных с Fc-гетеродимером N297G. Активность мутеинов, гибридизованных с фрагментом Fc, сравнивали с таковой для ИЛ-2 дикого типа (открытые кружки) и Fc дикого типа (закрашенные кружки). Мутации, которые придают высокую аффинность в отношении CD25 (HaMut1), включали V69A и Q74P.

Фиг. 6 - пролиферация NK-клеток в ответ на титрование доз мутеинов ИЛ-2, гибридизованных с Fc-гетеродимером N297G.

Активность мутеинов, содержащих фрагмент Fc, сравнивали с таковой для ИЛ-2 дикого типа (открытые кружки) и Fc дикого типа (закрашенные кружки).

Фиг. 7А и фиг. 7В - мутеины ИЛ-2.Fc, которые не содержат мутаций, придающих высокую аффинность в отношении CD25, стимулируют экспансию T_{рег} клеток и активацию FOXP3 у гуманизированных мышей.

Фиг. 8 - низкие еженедельные дозы (0,5 мкг на животное) мутеинов ИЛ-2.Fc стимулируют экспансию T_{рег} клеток и активацию FOXP3 у гуманизированных мышей, при этом для Fc.V91K наблюдали более высокую активность по сравнению с таковой для Fc.N88D и Fc дикого типа.

Фиг. 9А - Fc.V91K и Fc.N88D сохраняются на поверхности активированных Т-клеток за счет связи с CD25.

Фиг. 9В - поддержание процесса передачи сигналов с участием ИЛ-2R при введении Fc.V91K и Fc.N88D по сравнению с Fc дикого типа.

Фиг. 10А и В - сравнение интервалов между периодами дозирования Fc.V91K, которые составляют две недели и четыре недели, у яванских макаков, и сравнение эффективности внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) путей введения.

Фиг. 11А-Г - кинетические параметры клеточных ответов, температура тела и концентрация С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови у яванских макаков, получавших пролейкин®, Fc.V91K и

FC.N88D в соответствии с различными схемами дозирования.

Фиг. 12А - влияние увеличения дозировки пролейкина®, Fc.V91K или Fc.N88D на уровни T_{рег} клеток, NK-клеток, CD4+ FoxP3- Т-клеток и CD8+ FoxP3- Т-клеток у яванских макак. Каждая точка представляет собой средние максимальные ответы от четырех животных.

Фиг. 12В - влияние увеличения дозировки пролейкина®, Fc.V91K или Fc.N88D на уровни T_{рег} клеток и эозинофилов у яванских макак. Каждая точка представляет собой средние максимальные ответы от четырех животных.

Фиг. 12С - влияние увеличения дозировки пролейкина®, Fc.V91K или Fc.N88D на уровни T_{рег} клеток, концентрацию СРВ и температуру тела у яванских макак. Каждая точка представляет собой средние максимальные ответы от четырех животных.

Фиг. 12D - влияние увеличения дозировки пролейкина®, Fc.V91K или Fc.N88D на количество T_{рег} клеток, тромбоцитов, нейтрофилов и концентрацию альбумина у яванских макак. Каждая точка представляет собой средние максимальные ответы от четырех животных. Правые оси ОУ перевернуты, чтобы выразить относительное снижение количества тромбоцитов, нейтрофилов или концентрации альбумина по сравнению с образцами, полученными до начала дозирования.

Фиг. 13 - кинетика выработки антител к лекарственному препарату (ADA) у яванских макак, получавших FC.V91K.

Подробное описание предпочтительных вариантов реализации

Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены исключительно для структурирования текста описания и не должны быть истолкованы как ограничивающие предмет настоящего изобретения. Все литературные источники, приведенные в настоящем описании, явным образом полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Стандартные методики могут быть использованы для получения рекомбинантных ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования и трансформации тканей, очистки белков и т.п. Ферментативные реакции и методики очистки могут быть выполнены в соответствии с техническими условиями производителя или согласно стандартным способам осуществления, известным в данной области техники, или как описано в настоящей заявке. Перечисленные далее процедуры и методики могут быть, как правило, выполнены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, руководство Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которое включено в настоящую заявку посредством ссылки для любых целей. В том случае, если не предусмотрены конкретные определения, используемая номенклатура, лабораторные процедуры и методики, относящиеся к областям аналитической химии, органической химии, медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящей заявке, являются хорошо известными и обычно используемыми в данной области техники. Для проведения химического синтеза, химических исследований, приготовления и доставки фармацевтического препарата и лечения пациентов могут быть использованы стандартные методики.

ИЛ-2

Мутеины ИЛ-2, описанные в настоящей заявке, представляют собой варианты человеческого ИЛ-2 дикого типа. В настоящей заявке термин "человеческий ИЛ-2 дикого типа", "ИЛ-2 дикого типа" или "ИЛ-2 ДТ" означает полипептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPKKATELKH LQC
LEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFXQSIISTLT

```

В которой X представляет собой C, S, V или A (SEQ ID NO: 2).

Варианты могут содержать одну или более замен, делеций или вставок в пределах аминокислотной последовательности ИЛ-2 дикого типа. В настоящей заявке остатки аминокислот обозначены однобуквенным кодом, после которого указано положение аминокислоты в ИЛ-2, например, K35 представляет собой остаток лизина в положении 35 в последовательности SEQ ID NO: 2. В настоящей заявке замены аминокислот обозначены однобуквенным кодом, после которого указано положение аминокислоты в ИЛ-2, за которым следует однобуквенный код замещающей аминокислоты, например, K35A представляет собой замену остатка лизина в положении 35 в последовательности SEQ ID NO: 2 остатком аланина.

Мутеины ИЛ-2

В настоящем изобретении предложены мутеины ИЛ-2 человека, которые предпочтительно стимулируют регуляторные Т-клетки (T_{рег}). В настоящей заявке термин "предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки" означает, что мутеин усиливает пролиферацию, выживание, активацию и/или функцию CD3+ FoxP3+ Т-клеток в большей степени, чем CD3+ FoxP3- Т-клеток. Способность предпочтительно стимулировать T_{рег} клетки может быть измерена с помощью метода проточной цитометрии лейкоцитов периферической крови, в которой наблюдают увеличение процентной доли FOXP3+ CD4+ Т-клеток в общей популяции CD4+ Т-клеток, увеличение процентной доли FOXP3+ CD8+ Т-клеток в об-

шей популяции CD8⁺ Т-клеток, увеличение процентной доли FOXP3⁺ Т-клеток по отношению к НК-клеткам, и/или более выраженное увеличение уровня экспрессии CD25 на поверхности FOXP3⁺ Т-клеток по отношению к увеличению уровня экспрессии CD25 на поверхности других типов Т-клеток. Предпочтительную экспансию T_{рег} клеток также можно детектировать как увеличение представленности деметилированной ДНК промотора FOXP3 (т.е. T_{рег}-специфичной деметилированной области или TSDR) по отношению к деметилированным генам CD3 в общей ДНК, экстрагированной из цельной крови, согласно результатам секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), полученных из геномной ДНК, обработанной бисульфитом (J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

Мутеины ИЛ-2, которые предпочтительно стимулируют T_{рег} клетки, увеличивают отношение количества CD3⁺ FoxP3⁺ Т-клеток к количеству CD3⁺ FoxP3⁻ Т-клеток у субъекта или в образце периферической крови по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или по меньшей мере на 1000%.

Предпочтительные мутеины ИЛ-2 включают, но не ограничиваются ими, мутеины ИЛ-2, содержащие замену V91K или N88D в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2. Пример мутеина ИЛ-2 приведен в SEQ ID NO: 1. Особенно предпочтительной является аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 1, содержащая замену C125A. Несмотря на то, что уменьшение числа дополнительных мутаций в последовательности ИЛ-2 дикого типа может обеспечивать преимущества, в область настоящего изобретения включены мутеины ИЛ-2, имеющие укорочения или дополнительные вставки, делеции или замены, помимо замены V91K или N88D, при условии, что указанные мутеины сохраняют активность, направленную на предпочтительную стимуляцию T_{рег} клеток. Следовательно, варианты реализации настоящего изобретения включают мутеины ИЛ-2, которые предпочтительно стимулируют T_{рег} клетки и содержат аминокислотную последовательность, содержащую замену V91K или N88D, которая 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, приведенной в SEQ ID NO: 2. В особенно предпочтительных вариантах реализации такие мутеины ИЛ-2 содержат аминокислотную последовательность, которая 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, приведенной в SEQ ID NO: 2.

Применительно к аминокислотным последовательностям идентичность и/или сходство последовательностей определяют с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм локальной идентичности последовательностей, описанный в работе Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания для определения идентичности последовательностей, описанный в работе Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод определения сходства последовательностей, описанный в работе Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризированные варианты реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США), программу для определения идентичности последовательностей Best Fit, описанную в работе Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с использованием настроек по умолчанию или визуальной проверки. Предпочтительно процент идентичности вычисляется с помощью системы баз данных FastDB на основании следующих параметров: штраф за несоответствие 1; штраф за пропуск 1; штраф за размер пропуска 0,33; и штраф за присоединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Одним из примеров пригодного алгоритма является PILEUP. PILEUP осуществляет множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей с использованием прогрессирующего попарного выравнивания. Он также строит дерево, показывающее взаимосвязь между кластерами, используемую для построения выравнивания. В PILEUP используется упрощение способа прогрессирующего выравнивания Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; используемый способ аналогичен способу, описанному Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Подходящие параметры PILEUP включают штраф за делецию по умолчанию 3,00, штраф за продолжение делеции по умолчанию 0,10, и оцениваемые концевые делеции.

Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особенно подходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена из Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используется несколько параметров поиска, большинство из которых установлены как

значения по умолчанию. Для изменяемых параметров устанавливают следующие значения: область перекрытия =1, доля перекрытия =0,125, порог для слова (T)=11. Параметры HSP S и HSP S2 представляют собой динамические значения и устанавливаются программой самостоятельно, в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой проводят поиск представляющей интерес последовательности. Однако значения можно корректировать для повышения чувствительности.

Примером дополнительного пригодного алгоритма является GAPPED BLAST, описанный в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. GAPPED BLAST использует матрицу весовых оценок замен BLOSUM-62; значение порога T установлено равным 9; двухпиковый способ для инициации неразрывных продлений оценивает длину делеции k как 10+k; X_u установлено равным 16, и X_g установлено равным 40 для этапа поиска по базе данных и 67 для выходной стадии алгоритмов. Выравнивание последовательностей, содержащих делеции, иницируется оценкой, соответствующей приблизительно 22 битам.

Несмотря на то, что сайт или область для введения вариаций аминокислотной последовательности могут быть определены заранее, мутация сама по себе не обязательно должна быть определена заранее. Например, для того чтобы оптимизировать эффективность мутации в каком-либо сайте, целевой кодон или область могут быть подвергнуты случайному мутагенезу, затем экспрессированный мутеин ИЛ-2 подвергают скринингу для выявления оптимальной комбинации желаемых видов активности. Методики введения мутационных замен в заранее определенные сайты молекулы ДНК, имеющей известную последовательность, хорошо известны, например, мутагенез с использованием праймера M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутеинов может быть выполнен с помощью количественных исследований, описанных в настоящей заявке, например.

Замены аминокислот, как правило, представляют собой замены отдельных остатков; вставки обычно содержат от приблизительно одного (1) до двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя допустимы вставки значительно больших размеров. Делеции могут составлять от приблизительно одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут быть значительно больших размеров.

Замены, делеции и вставки аминокислотных остатков или любую их комбинацию можно использовать для получения конечного производного или варианта. Как правило, эти изменения затрагивают несколько аминокислот, чтобы минимизировать изменение молекулы, в частности, иммуногенность и специфичность антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах могут быть допустимы более существенные изменения. Консервативные замены, как правило, вводят в соответствии со следующей схемой, приведенной в табл. 1.

Таблица 1

Исходный остаток	Типичные замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Существенные изменения функции или иммунологической идентичности осуществляют путем выбора замен, которые являются менее консервативными, чем те, которые показаны в табл. 1. Например, могут быть введены замены, которые более существенно влияют на: структуру главной полипептидной цепи в области изменения, например, альфа-спиральную или бета-складчатую структуру; заряд или гидрофобность молекулы в сайте-мишени; или объем боковой цепи. Замены, которые, как ожидается, в це-

лом вызывают существенные изменения свойств полипептида, включают те, в которых (а) гидрофильный остаток, например, серил или треонил, замещен (или изменен) гидрофобным остатком, например, лейцилом, изолейцилом, фенилаланилом, валилом или аланилом; (b) цистеин или пролин замещен (или изменен) любым другим остатком; (с) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например, лизил, аргинил или гистидил, замещен (или изменен) электроотрицательным остатком, например, глутамилом или аспартилом; или (d) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например, фенилаланин, замещен (или изменен) остатком, не имеющим боковой цепи, например, глицином.

Варианты обычно проявляют аналогичную качественную биологическую активность и вызывают аналогичную иммунную реакцию, что и природный аналог, в то же время по мере необходимости проводят отбор вариантов для изменения характеристик мутеина ИЛ-2. Альтернативно, вариант может быть сконструирован так, чтобы изменить биологическую активность мутеина ИЛ-2. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены, как описано в настоящей заявке.

Мутеины ИЛ-2, имеющие увеличенный период полувыведения из сыворотки крови

Поскольку мутеины ИЛ-2, предложенные в настоящей заявке, предпочтительно стимулируют экспансию T_{reg} клеток в сравнении с, например, Тэфф или НК-клетками, ожидается, что при введении пациенту их профиль безопасности будет отличаться от такового для ИЛ-2 дикого типа или пролейкина® (алдеслейкин; Novartis, Базель, Швейцария). Побочные эффекты, связанные с введением ИЛ-2 дикого типа или пролейкина®, включают гриппоподобные симптомы, зябкость/озноб, боль в суставах, лихорадку, сыпь, зуд, реакции в месте инъекции, артериальную гипотензию, диарею, тошноту, беспокойство, спутанность сознания и депрессию. Мутеины ИЛ-2, предложенные в настоящей заявке, могут быть изменены для включения или гибридизации с молекулами, которые увеличивают период полувыведения мутеина из сыворотки крови без повышения риска того, что такое увеличение периода полувыведения увеличит вероятность возникновения или выраженность побочного эффекта или нежелательного явления у пациента. Подкожное введение такого мутеина, имеющего увеличенный период полувыведения из сыворотки крови, может обеспечить более длительное влияние на мишень с более низким системным максимальным воздействием (C_{max}). Увеличенный период полувыведения из сыворотки крови может обеспечить введение мутеина в более низкой дозе или с меньшей частотой дозирования.

Период полувыведения из сыворотки крови мутеинов ИЛ-2, предложенных в настоящей заявке, может быть увеличен по существу любым способом, известным в данной области техники.

Такие способы включают изменение последовательности мутеина ИЛ-2 для включения пептида, который связывается с неонатальным рецептором Fc γ или связывается с белком, имеющим увеличенный период полувыведения из сыворотки крови, например, IgG или сывороточным альбумином человека. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 гибридизован с полипептидом, который обеспечивает увеличение периода полувыведения гибридной молекулы. Такие полипептиды включают фрагмент Fc IgG или другие полипептиды, которые связываются с неонатальным рецептором Fc γ , сывороточным альбумином человека, или полипептиды, которые связываются с белком, имеющим увеличенный период полувыведения из сыворотки крови. В предпочтительных вариантах реализации мутеин ИЛ-2 гибридизован с молекулой Fc IgG.

Мутеин ИЛ-2 может быть гибридизован с N-концом или C-концом фрагмента Fc IgG. Как показано в примерах, гибридизация с C-концом фрагмента Fc IgG сохраняет активность мутеина ИЛ-2 в большей степени, чем гибридизация с N-концом фрагмента Fc IgG.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к димеру, содержащему два Fc-слитых полипептида, полученных путем гибридизации мутеина ИЛ-2 и фрагмента Fc антитела. Димер может быть получен, например, путем введения слитого гена, кодирующего слитый белок, в соответствующий вектор экспрессии, который экспрессирует слитый ген в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, тем самым обеспечивая сборку экспрессированного слитого белка с формированием структуры, которая близка к таковой для молекул антител, после образования межцепочечных связей между фрагментами Fc для получения димера.

В настоящей заявке термин "Fc-полипептид" или "фрагмент Fc" включает природные и мутированные формы полипептидов, полученных из фрагмента Fc антитела. Укороченные формы таких полипептидов, содержащих шарнирную область, которая способствует димеризации, также включены в область настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации фрагмент Fc содержит области CH2 и CH3 антитела. Наряду с увеличенным периодом полувыведения из сыворотки крови одним из преимуществ слитых белков, содержащих фрагменты Fc (и образованные из них олигомеры), является более легкая очистка способом аффинной хроматографии на колонках с такими сорбентами как белок А или белок G. Предпочтительные фрагменты Fc получают из человеческого IgG, который включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. При этом конкретные остатки внутри Fc обозначены с использованием номеров положений. Все положения Fc пронумерованы в соответствии с системой ЕС.

Одна из функций фрагмента Fc антитела заключается во взаимодействии с иммунной системой, когда антитело связывается со своей мишенью. Такая функция рассматривается как "эффекторная функция". Взаимодействие антитело-мишень приводит к антитело-зависимой клеточной цитотоксичности

(ADCC), антитело-зависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP инициируются при связывании фрагмента Fc с рецепторами Fc на поверхности клеток иммунной системы. CDC инициируются при связывании фрагмента Fc с белками системы комплемента, например, C1q.

Подклассы IgG различаются по их способности выступать в качестве посредников эффекторных функций. Например, IgG1 значительно превосходит IgG2 и IgG4 в отношении способности инициировать ADCC и CDC. Таким образом, в тех вариантах реализации, в которых эффекторная функция является нежелательной, фрагмент Fc IgG2 будет являться предпочтительным. Однако известно, что молекулы, содержащие Fc IgG2, сложнее получить, и они имеют менее привлекательные биофизические свойства, такие как более короткий период полувыведения, по сравнению с молекулами, содержащими Fc IgG1.

Эффекторная функция антитела может быть увеличена или уменьшена путем введения одной или более мутаций во фрагмент Fc. Варианты реализации настоящего изобретения включают слитые белки, содержащие мутин ИЛ-2 и фрагмент Fc, в которых фрагмент Fc модифицирован для увеличения эффекторной функции (U.S. 7317091 и Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки). Примеры молекул Fc IgG1, имеющих повышенную эффекторную функцию, включают те, которые содержат следующие замены:

S239D/I332E
 S239D/A330S/I332E
 S239D/A330L/I332E
 S298A/D333A/K334A
 P247I/A339D
 P247I/A339Q
 D280H/K290S
 D280H/K290S/S298D
 D280H/K290S/S298V
 F243L/R292P/Y300L
 F243L/R292P/Y300L/P396L
 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
 G236A/S239D/I332E
 K326A/E333A
 K326W/E333S
 K290E/S298G/T299A
 K290N/S298G/T299A
 K290E/S298G/T299A/K326E
 K290N/S298G/T299A/K326E

Другой способ повышения эффекторной функции белков, содержащих Fc IgG, включает уменьшение степени фукозилирования фрагмента Fc. Удаление коровой фукозы из 2-антенарных олигосахаридов, присоединенных к фрагменту Fc, значительно усиливало ADCC-эффекторную функцию без изменения антигенсвязывающей функции или CDC-эффекторной функции. Известно несколько способов уменьшения или устранения фукозилирования Fc-содержащих молекул, например, антител. Эти способы включают рекомбинантную экспрессию в определенных линиях клеток млекопитающих, включая линию клеток с заблокированным геном FUT8, вариант линии клеток CHO Lec13, линию клеток гибридомы крысы YB2/0, клеточную линию, содержащую малые интерферирующие РНК, специфичные в отношении гена FUT8, и клеточную линию, совместно экспрессирующую β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и фермент аппарата Гольджи α -маннозидазу II. В другом варианте Fc-содержащие молекулы можно экспрессировать в клетке из вида, не относящегося к млекопитающим, такой как растительная, дрожжевая или прокариотическая клетка, например, клетка *E. coli*.

В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения слитые белки, содержащие мутин ИЛ-2 и фрагмент Fc, содержат фрагмент Fc, который модифицирован для уменьшения эффекторной функции. Примеры молекул Fc, имеющих уменьшенную эффекторную функцию, включают те, которые содержат следующие замены:

N297A или N297Q (IgG1)
 L234A/L235A (IgG1)
 V234A/G237A (IgG2)
 L235A/G237A/E318A (IgG4)
 H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
 C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
 L234F/L235E/P331S (IgG1)
 S267E/L328F (IgG1)

Известно, что IgG1 человека имеет сайт гликозилирования в положении N297 (система нумерации ЕС), и гликозилирование способствует реализации эффекторной функции антител IgG1. Пример последовательности IgG1 представлен в SEQ ID NO: 3. В ряде исследовательских групп были предприняты попытки ввести мутацию в положение N297, чтобы получить негликозилированные антитела. Мутагенез был направлен предпочтительно на замещение N297 аминокислотами, которые сходны с аспарагином по физико-химической природе, такими как глутамин (N297Q) или аланин (N297A), который имитирует аспарагин без полярных групп.

В настоящей заявке термин "негликозилированное антитело" или "негликозилированный фрагмент Fc" относится к статусу гликозилирования остатка в положении 297 фрагмента Fc. Антитело или другая молекула может быть гликозилирована в одном или более других сайтов, но все еще может рассматриваться как негликозилированное антитело или негликозилированный Fc-слитый белок.

В ходе исследовательских работ с целью получения фрагмента Fc IgG1, лишённого эффекторной функции, было обнаружено, что мутационная замена аминокислоты в положении N297 человеческого IgG1 остатком глицина, то есть, N297G, обеспечивает намного более высокую эффективность очистки и улучшенные биофизические свойства по сравнению с другими аминокислотными заменами в этом остатке. См. пример 8. Следовательно, в предпочтительных вариантах реализации слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, содержит фрагмент Fc человеческого IgG1, содержащий замену N297G. Фрагмент Fc с заменой N297G можно применять в соответствии с любым вариантом реализации, в котором молекула содержит фрагмент Fc человеческого IgG1, при этом ее применение не ограничивается включением в состав слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. В некоторых вариантах реализации антитело содержит фрагмент Fc, который содержит замену N297G.

Фрагмент Fc, представляющий собой фрагмент Fc IgG1 человека с мутацией в положении N297G, также может содержать дополнительные вставки, делеции и замены. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения фрагмент Fc IgG1 человека содержит замену N297G и по меньшей мере на 90% идентичен, по меньшей мере на 91% идентичен, по меньшей мере на 92% идентичен, по меньшей мере на 93% идентичен, по меньшей мере на 94% идентичен, по меньшей мере на 95% идентичен, по меньшей мере на 96% идентичен, по меньшей мере на 97% идентичен, по меньшей мере на 98% идентичен или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. В особенно предпочтительном варианте реализации С-концевой остаток лизина замещен или удален. Аминокислотная последовательность человеческого IgG1, содержащая замену N297G и делецию С-концевого лизина, приведена в SEQ ID NO: 4.

Было показано, что молекулы, содержащие негликозилированный фрагмент Fc IgG1, менее стабильны, чем молекулы, содержащие гликозилированный фрагмент Fc IgG1. Фрагмент Fc может быть дополнительно модифицирован, чтобы повысить стабильность негликозилированной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более аминокислот замещены цистеином так, чтобы сформировать дисульфидные связи в димерном состоянии. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, могут быть замещены цистеином. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения конкретные пары остатков замещены так, что они предпочтительно формируют дисульфидную связь друг с другом, тем самым ограничивая или предотвращая беспорядочное формирование дисульфидных связей. Предпочтительные пары включают, но не ограничиваются ими, A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, и V323C и I332C.

В настоящем изобретении предложены Fc-содержащие молекулы, в которых один или более остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 замещены цистеином. Предпочтительные Fc-содержащие молекулы включают те, которые содержат замены A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C или V323C и I332C.

Дополнительные мутации, которые могут быть введены во фрагмент Fc IgG1, включают те, которые облегчают формирование гетеродимера из Fc-содержащих полипептидов. В некоторых вариантах реализации фрагмент Fc модифицирован для создания "выступов" и "впадин", которые облегчают формирование гетеродимера из двух различных Fc-содержащих полипептидных цепей при совместной экспрессии в клетке. Патент США 7695963. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент Fc изменен для использования эффекта электростатического взаимодействия, чтобы стимулировать формирование гетеродимера, препятствуя образованию гомодимера из двух различных Fc-содержащих полипептидных цепей при совместной экспрессии в клетке. Заявка WO 09/089004, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Предпочтительные гетеродимерные фрагменты Fc включают те, в которых одна цепь Fc содержит замены D399K и E356K, и другая Fc цепь содержит замены K409D и K392D. В других вариантах реализации одна цепь Fc содержит замены D399K, E356K и E357K, и другая цепь Fc содержит замены K409D, K392D и K370D.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мономерная форма слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, т.е. содержащая только одну молекулу мутеина ИЛ-2, может обеспечивать определенные преимущества. В таких вариантах реализации фрагмент Fc слитого белка может содержать одну или более мутаций, которые облегчают формирование гетеродимера. Сли-

тый белок экспрессируется совместно с фрагментом Fc, содержащим мутации, обратные в отношении тех, которые присутствуют в гибридном полипептиде, содержащем мутеин ИЛ-2 и Fc, но без мутеина ИЛ-2. При образовании гетеродимера из двух Fc-содержащих полипептидов готовый белок содержит только один мутеин ИЛ-2.

Другой способ создания мономерного слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, включает гибридизацию мутеина ИЛ-2 с мономерным фрагментом Fc, т.е., фрагментом Fc, который не подвергается димеризации. Стабильные мономерные фрагменты Fc содержат мутации, которые препятствуют димеризации и стабилизируют молекулу в мономерной форме. Предпочтительные мономерные фрагменты Fc раскрыты в WO 2011/063348, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, содержат фрагмент Fc с отрицательно заряженными аминокислотами в положениях 392 и 409 совместно с заменой аминокислот в положениях Y349, L351, L368, L398, V397, F405 или Y407 остатком треонина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, содержит линкер между Fc и мутеином ИЛ-2. В данной области техники известно много различных полипептидных линкеров, которые можно использовать для конструирования слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и Fc. В предпочтительных вариантах реализации слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и Fc, содержит одну или более копий пептида, состоящего из GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7), между Fc и мутеином ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения область полипептида между фрагментом Fc и областью мутеина ИЛ-2 содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7). В настоящей заявке раскрыто, что линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) подвергаются гликозилированию при экспрессии в соответствующих клетках и что такое гликозилирование может облегчить стабилизацию белка в растворе и/или при введении в условиях *in vivo*. Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2, содержит гликозилированный линкер между фрагментом Fc и областью мутеина ИЛ-2.

В настоящем изобретении предусмотрено, что гликозилированный линкер можно использовать применительно к конструированию полипептида. В настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7), введенные в аминокислотную последовательность полипептида или замещающие одну или более аминокислот в аминокислотной последовательности полипептида. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) введены в петлю третичной структуры полипептидов. В других вариантах реализации одна или более аминокислот в петле замещены GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

C-концевой участок фрагмента Fc и/или N-концевой участок мутеина ИЛ-2 может содержать одну или более мутаций, которые изменяют профиль гликозилирования слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, при экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 дополнительно содержит замену T3, например, T3N или T3A. Мутеин ИЛ-2 может дополнительно содержать замену S5, например, S5T.

Ковалентные модификации мутеина ИЛ-2 и слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, включены в объем настоящего изобретения, и, как правило, но не всегда, осуществляются после трансляции. Например, несколько типов ковалентных модификаций мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, вводят в молекулу с помощью взаимодействия конкретных аминокислотных остатков мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, с органическим агентом, используемым для получения производных, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или остатками N- или C-концевых аминокислот.

Остатки цистеинила наиболее часто вступают в реакцию с α -галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с формированием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Остатки цистеинила также образуют производные при взаимодействии с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила образуют производные при взаимодействии с диэтилпирокарбонатом при pH=5,5-7,0, поскольку этот агент является относительно специфичным в отношении боковой цепи гистидила. Также можно применять пара-бромфенацилбромид; реакцию проводят предпочтительно в 0,1 M какодилате натрия при pH 6,0.

Остатки лизинила и концевых аминокислот подвергают взаимодействию с янтарным ангидридом или ангидридами других карбоновых кислот. Получение производных при использовании этих агентов изменяет заряд остатков лизинила. Другие пригодные реагенты для получения производных представляют собой α -аминосодержащие остатки, включая имидоэфир, такие как метилпиколинимидат; пири-

доксаль фосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфовую кислоту; О-метилизо-мочевину; 2,4-пентандион; и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксалью.

Остатки аргинила модифицируют путем взаимодействия с одним или несколькими стандартными реагентами, включая фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Получение производных остатков аргинина требует, чтобы реакция осуществлялась в щелочных условиях из-за высокого значения рКа функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также эpsilon-аминогруппой аргинина.

Может быть проведена специфичная модификация остатков тирозина, при этом особый интерес вызывает введение спектральных меток в остатки тирозина с помощью реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Наиболее часто для образования О-ацетилпроизводных тирозила и 3-нитропроизводных используют N-ацетилимидазол и тетранитрометан, соответственно. Остатки тирозила подвергают йодированию с использованием I^{125} или I^{131} , чтобы получить меченые белки для применения в радиоиммунологических способах исследований, также можно использовать способ на основе хлорамина Т, описанный выше.

Карбоксильные боковые группы (аспартила или глутамила) селективно модифицируют путем взаимодействия с карбодиимидами ($R'-N=C=N-R'$), где R и R' представляют собой необязательно различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азони-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамила превращают в остатки аспарагина и глутамила путем взаимодействия с ионами аммония.

Получение производных с применением бифункциональных агентов можно использовать для сшивания антигенсвязывающих белков с нерастворимым в воде носителем или поверхностью для использования в различных способах исследований. Обычно используемые сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидо-эфиры, включая сложные эфиры дисукцинимидила, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Агенты для получения производных, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропионимидат, позволяют получать фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные сшивки в присутствии света. В другом варианте для иммобилизации белков используют реакционноспособные нерастворимые в воде носители, такие как углеводы, активированные цианоген-бромидом, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; и 4330440.

Остатки глутамила и аспарагина обычно деаминируют с получением соответствующих остатков глутамила и аспартила, соответственно. В другом варианте, эти остатки деаминируют в слабокислой среде. Любая форма этих остатков включена в объем настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, который включен в объем настоящего изобретения, представляет собой изменение характера гликозилирования указанного белка. Как известно в данной области техники, характер гликозилирования может зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, подвергающихся гликозилированию, как обсуждается ниже), так и от типа клетки-хозяина или организма, в котором вырабатывается белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X обозначает любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает возможный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного фрагмента таких Сахаров как N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин также могут быть использованы.

Добавление сайтов гликозилирования к мутеину ИЛ-2 или слитому белку, содержащему мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, может быть легко осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она включала одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанного гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замены одного или более остатков серина или треонина в начальной последовательности (для O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, предпочтительно модифицируют путем изме-

нений на уровне ДНК, в частности, путем мутирования ДНК, кодирующей полипептид-мишень, в предварительно выбранных основаниях с получением кодонов, которые при трансляции обеспечивают желаемые аминокислоты.

Другим способом увеличения числа углеводных фрагментов на мутеине ИЛ-2 или слитом белке, содержащем мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Преимущество этих способов заключается в том, что они не требуют выработки белка в клетке-хозяине, которая обладает молекулярным аппаратом, пригодным для N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого способа связывания сахар(а) может быть прикреплен к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, например, цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, например, серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, например, фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамин. Такие способы описаны в международной патентной заявке 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в работе Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих на исходном мутеине ИЛ-2 или слитом белке, содержащем мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, может быть осуществлено химическими или ферментативными способами. Для химического дегликозилирования необходимо воздействие на белок такого соединения как трифторметансульфоновая кислота или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в работах Nakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на полипептидах может быть осуществлено с помощью различных эндо- и экзогликозидаз, описанных в работе Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем использования такого соединения как туникамицин, описанного в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует формирование связей белок-N-гликозид.

Другой тип ковалентной модификации мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, включает связывание мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь ими, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, с помощью способа, описанного в патентах США №№4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Помимо этого замены аминокислот могут быть введены в различных положениях в пределах мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как ПЭГ. Соответственно, варианты реализации настоящего изобретения включают пегилированные мутеины ИЛ-2 и пегилированные слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Такие пегилированные белки могут иметь увеличенный период полувыведения и/или сниженную иммуногенность по сравнению с непегилированными белками.

Полинуклеотиды, кодирующие мутеины ИЛ-2 и слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc

В область настоящего изобретения включены нуклеиновые кислоты, кодирующие мутеины ИЛ-2 и слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Аспекты настоящего изобретения включают полинуклеотидные варианты (например, вследствие вырожденности), которые кодируют аминокислотные последовательности, описанные в настоящей заявке. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения полипептид, кодируемый выделенной нуклеиновой кислотой, является компонентом слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и Fc.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие аминокислотным последовательностям, описанным в настоящей заявке, которые предназначены для использования в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве последовательностей для запроса при поиске в базах данных, могут быть получены с помощью "обратной трансляции" из аминокислотных последовательностей. Хорошо известная методика полимеразной цепной реакции (ПЦР) может быть использована для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей мутеины ИЛ-2 и слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Олигонуклеотиды, которые определяют желаемые концы комбинации фрагментов ДНК, используют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты распознавания рестрикционными эндонуклеазами, чтобы облегчить введение амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в вектор экспрессии. Методики ПЦР описаны в Saiki et al., Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; и PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению включают ДНК и РНК в одноцепочечной и двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. "Выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого была выделена нуклеиновая кислота, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из природных источников. В

случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативными способами на основании матрицы или химическими способами, например, ПЦР-продукты, молекулы кДНК или олигонуклеотиды, например, следует понимать, что нуклеиновые кислоты, полученные с помощью таких способов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в виде компонента более крупной конструкции нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте реализации нуклеиновые кислоты по существу не содержат загрязняющего эндогенного материала. Молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно получена из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз по существу в чистой форме и в количестве или концентрации, обеспечивающей идентификацию, преобразование и восстановление ее составных нуклеотидных последовательностей с помощью стандартных биохимических методов (например, методов, которые описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно обеспечены и/или сконструированы в форме открытой рамки считывания, которая прервана внутренними нетранслируемыми последовательностями, или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут присутствовать в направлении 5'-или 3'-конца относительно открытой рамки считывания, в участках, в которых нетранслируемые области ДНК не будут препятствовать преобразованию или экспрессии кодирующей области.

Варианты согласно настоящему изобретению обычно получают с помощью сайт-направленного мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и Fc, используя метод кассетного мутагенеза или ПЦР-мутагенеза и другие методики, хорошо известные в данной области техники, чтобы получить ДНК, кодирующую такой вариант, с последующей экспрессией рекомбинантной ДНК в клеточной культуре, как описано в настоящей заявке. Однако мутеины ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и Fc, могут быть получены с помощью синтеза в условиях *in vitro*, используя общепринятые методики. Варианты обычно проявляют качественную биологическую активность, которая аналогична таковой для природного аналога, например, экспансия $T_{рег}$ клеток, тем не менее могут быть отобраны варианты, которые имеют модифицированные характеристики, которые будут более подробно описаны ниже.

Специалисты в данной области техники поймут, что из-за вырожденности генетического кода может быть получено чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, все из которых кодируют мутеины ИЛ-2 и слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и Fc, согласно настоящему изобретению. Таким образом, после определения конкретной аминокислотной последовательности, специалисты в данной области техники смогут изготовить любое количество различных нуклеиновых кислот путем простого изменения последовательности одного или более кодонов так, что аминокислотная последовательность кодируемого белка останется неизменной.

В настоящем изобретении также предложены системы экспрессии и конструкции в форме плазмид, векторов экспрессии, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, описанный выше. Также в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие такие системы экспрессии или конструкции.

Как правило, векторы экспрессии, используемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, в совокупности называемые "фланкирующие последовательности", в некоторых вариантах реализации, как правило, будут содержать одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, один или более энхансеров, сайт инициации репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайты сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосом, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который экспрессируют, и селективный маркерный элемент. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Вектор необязательно может содержать последовательность, кодирующую "метку", т.е. молекулу олигонуклеотида, расположенную на 5'- или 3'-конце кодирующей последовательности мутеинов ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc; олигонуклеотидная последовательность кодирует полигистидиновую метку (например, hexaHis (SEQ ID NO: 21)) или другую "метку", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Такая метка, как правило, гибридна с полипептидом при экспрессии этого полипептида и может служить в качестве средства для аффинной очистки или детектирования мутеина ИЛ-2 в клетке-хозяине. Аффинную очистку можно осуществлять, например, с помощью колоночной хроматографии с использованием антител против метки в качестве аффинного носителя. Метка необязательно может быть впоследствии удалена из очищенных мутеинов ИЛ-2 и слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и Fc, с помощью различных способов, таких как использование определенных пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е., полученными из одного и того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. полученными из вида, отличного

от вида клетки-хозяина или штамма), слитыми (т.е. представляют собой комбинацию фланкирующих последовательностей, полученных более чем из одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный и беспозвоночный организм, или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована молекулярными системами клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, которые можно использовать в векторах согласно настоящему изобретению, могут быть получены любым из нескольких способов, хорошо известных в данной области техники. Как правило, фланкирующие последовательности, которые можно использовать в настоящей заявке, будут заранее выявлены с помощью картирования и/или путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой и, следовательно, могут быть выделены из надлежащего тканевого источника с использованием соответствующих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В настоящей заявке фланкирующие последовательности могут быть синтезированы с помощью способов синтеза нуклеиновых кислот или клонирования, описанных в настоящей заявке.

Независимо от того, известна вся или только часть фланкирующей последовательности, такая последовательность может быть получена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с использованием подходящего зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из этого же или другого вида. Если фланкирующая последовательность не известна, то фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из более крупного фрагмента ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение может быть осуществлено путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением правильного фрагмента ДНК с последующим выделением с помощью очистки в агарозном геле, колоночной хроматографии на основе систем Qiagen® (Чатсворт, Калифорния, США) или другими способами, известными специалистам в данной области техники. Параметры выбора подходящих ферментов для осуществления этой цели будут очевидны для любого специалиста со стандартной квалификацией в данной области техники.

Сайт инициации репликации, как правило, является частью коммерчески доступных прокариотических векторов экспрессии и облегчает амплификацию вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайта инициации репликации, то такой сайт может быть химически синтезирован на основе известной последовательности и лигирован в вектор. Например, сайт инициации репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс, США) пригоден для большинства грамотрицательных бактерий, и различные сайты инициации репликации вирусного происхождения (например, SV40, полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломы, такие как HPV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, сайт инициации репликации не является необходимым компонентом для векторов экспрессии в клетках млекопитающих (например, сайт инициации репликации SV40 обычно используется только потому, что он дополнительно содержит промотор ранних генов вируса).

Последовательность терминации транскрипции, как правило, расположена на 3'-конце области, кодирующей полипептид, и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой фрагмент, обогащенный парами GC, за которым расположена политиминовая последовательность. В то время как последовательность может быть легко клонирована из библиотеки или даже получена коммерчески как часть вектора, она также может быть легко синтезирована с помощью способов синтеза нуклеиновых кислот, таких как те, которые описаны в настоящей заявке.

Селективный маркерный ген кодирует белок, необходимый для выживания и размножения клетки-хозяина, выращиваемой в селективной культуральной среде. Обычные селективные маркерные гены кодируют белки, которые (а) придают прокариотическим клеткам-хозяевам устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину; (б) дополняют разные виды ауксотрофной недостаточности клетки; или (с) снабжают необходимыми питательными веществами, недоступными из сложных сред или сред с определенным составом. Конкретные селективные маркерные гены включают ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Предпочтительно ген устойчивости к неомицину также может быть использован для отбора в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Другие селективные гены могут быть использованы для амплификации гена, который будет экспрессирован. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, необходимые для выработки белка, важного для размножения или выживания клеток, повторяются в тандеме в хромосомах последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) и ген тимидинкиназы, не содержащий промотора. Трансформированные клетки млекопитающих подвергаются давлению отбора, в результате этого размножаются только трансформированные клетки, уникальным образом приспособленные к выживанию благодаря наличию селективного гена, присутствующего в векторе. Давление отбора создают

путем культивирования трансформированных клеток в условиях, в которых концентрация селективного агента в среде последовательно увеличивается, что приводит к амплификации как селективного гена, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Как следствие этого на основе амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида, такого как мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc.

Сайт связывания рибосом обычно необходим для инициации трансляции мРНК и содержит последовательность Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательность Козака (эукариоты). Этот элемент обычно расположен в направлении 3'-конца по отношению к промотору и 5'-конца по отношению к кодирующей последовательности полипептида, который экспрессируют. В некоторых вариантах реализации одна или более кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES), что обеспечивает трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, когда гликозилирование является желательным в системе экспрессии на основе эукариотических клеток-хозяев, различные пред- или пропоследовательности могут быть модифицированы, чтобы улучшить характер гликозилирования или выход продукта. Например, сайт расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида может быть изменен, либо могут быть добавлены пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может иметь в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или более дополнительных аминокислот, подходящих для экспрессии, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или два аминокислотных остатка в сайте расщепления пептидазой, прикрепленном к аминоконцу. В другом варианте использование некоторых сайтов ферментативного расщепления может привести к образованию незначительно укороченной формы желаемого полипептида, если фермент осуществляет расщепление в такой области в пределах последовательности зрелого полипептида.

Векторы экспрессии и клонирования согласно настоящему изобретению, как правило, будут содержать промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные перед (т.е. в направлении 5'-конца) стартовым кодоном структурного гена (обычно в пределах приблизительно от 100 до 1000 п.о.), которые контролируют транскрипцию структурного гена. Промоторы обычно относятся к одному из двух классов: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы иницируют повышение уровня транскрипции с последовательности ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторое изменение условий культивирования, такое как наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Конститутивные промоторы, с другой стороны, обеспечивают постоянную транскрипцию гена, с которым они функционально связаны, то есть, практически не управляют экспрессией гена. Большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны в данной области техники.

Промоторы, подходящие для использования в дрожжевых хозяевах, также хорошо известны в данной области техники. Энхансеры дрожжевых генов предпочтительно используют с промоторами дрожжевых генов. Промоторы, подходящие для использования в клетках-хозяевах млекопитающих, хорошо известны и включают, но не ограничиваются ими, промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы белков теплового шока и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, но не ограничиваются ими: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промотор и регуляторные последовательности из гена металлотioneина (Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731); или промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Также определен интерес представляют следующие области, контролирующие транскрипцию у животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы у трансгенных животных: контрольный участок гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ormitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); контрольный участок гена инсулина, который активен в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); контрольный участок гена иммуноглобулина, который активен в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature

318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); контрольный участок гена вируса рака молочной железы мыши, который активен в клетках яичек, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); контрольный участок гена альбумина, который активен в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); контрольный участок гена альфа-фетопротейна, который активен в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); контрольный участок гена альфа-1-антитрипсина, который активен в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); контрольный участок гена бета-глобина, который активен в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); контрольный участок гена основного белка миелина, который активен в олигодендроцитах мозга (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); контрольный участок гена легкой цепи миозина-2, который активен в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); и контрольный участок гена гонадотропин-высвобождающего гормона, который активен в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Последовательность энхансера может быть вставлена в вектор для повышения эффективности транскрипции у высших эукариот. Энхансеры представляют собой cis-действующие элементы ДНК, обычно содержащие приблизительно 10-300 п.о., которые действуют на промотор, чтобы повысить эффективность транскрипции. Энхансеры относительно независимы от ориентации и положения, поскольку их обнаруживали в положениях, которые расположены в направлении как 5'-конца, так и 3'-конца относительно транскрипционной единицы. Известно несколько последовательностей энхансеров, доступных из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Тем не менее, обычно применяют какой-либо вирусный энхансер. Примеры энхансерных элементов для активации промоторов у эукариот включают энхансер SV40, энхансер промотора ранних генов цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов, известные в данной области техники. Несмотря на то, что энхансер может быть расположен в векторе в направлении либо 5'-конца, либо 3'-конца относительно кодирующей последовательности, как правило, он расположен в участке последовательности в направлении 5'-конца относительно промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть включена в вектор экспрессии для усиления внеклеточной секреции мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых должен вырабатываться белок, причем гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах млекопитающих, включают: сигнальную последовательность для интерлейкина-7 (ИЛ-7), описанную в патенте США №4965195; сигнальную последовательность для рецептора интерлейкина-2, описанную в работе Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид для рецептора интерлейкина-4, описанный в патенте EP №0367566; сигнальный пептид для рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США №4968607; сигнальный пептид для рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в патенте EP №0460846.

Вектор может содержать один или более элементов, которые облегчают экспрессию, когда вектор интегрирован в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) и участок прикрепления к ядерному матриксу (MAR). Участки MAR выступают посредниками при структурной организации хроматина и могут защитить интегрированный вектор от эффекта "положения". Следовательно, участки MAR являются особенно подходящими в тех случаях, когда вектор используется для создания стабильных трансфектантов. Ряд природных и синтетических MAR-содержащих нуклеиновых кислот известен в данной области техники, например, патенты США №№6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Векторы экспрессии согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать все желаемые фланкирующие последовательности или могут не содержать их. В тех случаях, когда одна или более из фланкирующих последовательностей, описанных в настоящей заявке, не присутствует изначально в векторе, они могут быть получены отдельно и лигированы в вектор. Способы, используемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники.

После получения вектора и введения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, в надлежащий сайт вектора, готовый вектор может быть введен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектора экспрессии в выбранную клетку-хозяина можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию с использованием DEAE-декстрана или другими известными способами. Выбранный способ будет частично зависеть от типа клетки-хозяина, которая будет использована. Перечисленные способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области техники и изложены, например, в руководстве Sambrook et al., 2 001, выше.

Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях синтезирует мутеин ИЛ-2 или слитый

белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, которые впоследствии могут быть собраны из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует белок в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей белок (если белок не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как желаемый уровень экспрессии, полипептидные модификации, которые являются желательными или необходимыми для обеспечения активности (например, гликозилирование или фосфорилирование) и легкости сворачивания в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (АТСС), и любые клеточные линии, используемые в системе экспрессии, известной в данной области техники, могут быть использованы для получения рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению. В целом, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным вектором экспрессии, который содержит ДНК, кодирующую желаемый мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Клетки-хозяева, которые можно использовать, включают прокариотические, дрожжевые или клетки высших эукариот. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или бациллы. Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и установленные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток почки обезьян COS-7 (АТСС CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (АТСС CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые выращивают в бессывороточной среде (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клетки HeLa, клеточные линии ВНК (АТСС CRL 10) и клетки линии CV1/EBNA, полученные из линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 (АТСС CCL 70), описанной в работе McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, линии клеток мезонефроса человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, клетки эпидермиса человека A431, клетки человека Co1o205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культивируемой в условиях *in vitro* первичной ткани, первичные экспланты, HL-60, U937, клетки линий HaK или Jurkat. В случае необходимости, клеточные линии млекопитающих, такие как HepG2/3B, KB, NIH-3T3 или S49, например, могут быть использованы для экспрессии полипептида, когда желательным является использование полипептида в различных путях передачи сигналов или количественных исследованиях с использованием репортерного гена.

В другом варианте полипептид может быть получен в клетках низших эукариот, таких как дрожжи, или в клетках прокариот, таких как бактерии. Подходящие штаммы дрожжей включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida* или любой другой штамм дрожжей, который способен экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие штаммы бактерий включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой другой штамм бактерий, который способен экспрессировать гетерологичные полипептиды. В случае если полипептид вырабатывается клетками дрожжей или бактерий, то желательной может быть модификация полипептида, полученного в таких системах, например, путем фосфорилирования или гликозилирования соответствующих сайтов, чтобы получить функциональный полипептид. Ковалентное присоединение таких фрагментов можно осуществлять с использованием известных химических или ферментативных способов.

Полипептид также может быть получен с помощью функционального связывания выделенной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению с подходящей управляющей последовательностью в одном или более векторов экспрессии в клетках насекомых, а также используя систему экспрессии в клетках насекомых. Материалы и способы, касающиеся систем экспрессии на основе бакуловирусов/клеток насекомых, доступны коммерчески в виде набора, например, от Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния, США (набор MaxVac®), такие способы также хорошо известны в данной области техники и описаны в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Бесклеточные системы трансляции также можно использовать для получения полипептидов с помощью РНК, полученных из конструкций нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящей заявке.

Соответствующие векторы клонирования и экспрессии для использования в бактериальных, грибковых, дрожжевых клетках-хозяевах и клетках-хозяевах млекопитающих описаны в Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, предпочтительно, функционально связанную по меньшей мере с одной последовательностью, которая управляет экспрессией, представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяина".

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую мутеин ИЛ-2 человека, который предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки и аминокислотная последовательность которого содержит замену V91K и 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%, по

меньшей мере на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. Выделенная нуклеиновая кислота может кодировать любой из типичных мутеинов ИЛ-2, предложенных в настоящей заявке.

В область настоящего изобретения также включены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из типичных слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и Fc, описанных в настоящей заявке. В предпочтительных вариантах реализации часть Fc антитела и мутеин ИЛ-2 человека кодируются в пределах одной открытой рамки считывания, возможно, содержащей линкер, кодирующая последовательность которого находится между фрагментом Fc и мутеином ИЛ-2.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные выше мутеины ИЛ-2 или слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, которые функционально связаны с промотором.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные выше мутеины ИЛ-2 или слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*, или эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (СНО).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы получения мутеина ИЛ-2 человека. Указанные способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию промотора, функционально связанного с мутеином ИЛ-2 человека. Далее из указанной культуры получают мутеин ИЛ-2 человека. Мутеин ИЛ-2 может быть получен из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы получения слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 человека и фрагмент Fc. Указанные способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию промотора, функционально связанного с слитым белком, содержащим мутеин ИЛ-2 человека и фрагмент Fc. Далее из указанной культуры получают слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 человека и фрагмент Fc. Слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 человека и фрагмент Fc, может быть получен из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество мутеина ИЛ-2 совместно с фармацевтически эффективными разбавителями, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 относится к слитому белку, содержащему мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, жидкие, замороженные и лиофилизованные композиции.

Предпочтительно материалы для изготовления композиций являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах реализации предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы, содержащей мутеин ИЛ-2, например, слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может содержать материалы для изготовления композиций, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, значения pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. В таких вариантах реализации подходящие материалы для изготовления композиций включают, но не ограничиваются ими, аминокислоты (например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); наполнители (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (например, плоронные кислоты, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); повышающие стабильность агенты (такие как сахароза или сорбит); повышающие тоничность агенты (такие как галогениды щелочных металлов,

предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. См. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области техники в зависимости от, например, предполагаемого пути введения, способа доставки и желаемой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, выше. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения в условиях *in vivo* и скорость клиренса антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения основной наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным. Например, подходящий наполнитель или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, возможно, с добавлением других материалов, которые являются стандартными для композиций для парентерального введения. Другие примеры наполнителей включают нейтральный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции содержат Трис-буфер с показателем pH приблизительно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с показателем pH приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий аналог. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции, содержащие мутеин ИЛ-2, могут быть получены для хранения в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты, с необязательными агентами для изготовления композиций (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше). Также в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения продукт, содержащий мутеин ИЛ-2, может быть приготовлен в виде лиофилизата с использованием соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В другом варианте композиции могут быть выбраны для введения путем ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Изготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники. Компоненты композиций присутствуют предпочтительно в концентрациях, которые приемлемы для места введения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буферы используются для поддержания показателя pH композиции в пределах физиологических значений pH или незначительно более низких значений pH, как правило, в диапазоне значений pH от приблизительно 5 до приблизительно 8.

В том случае, если предполагается использование парентерального пути введения, терапевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть обеспечены в виде апиrogenного водного раствора, подходящего для парентерального введения, который содержит желаемую композицию мутеина ИЛ-2 в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно подходящим носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, на основе которой композиция, содержащая мутеин ИЛ-2, изготавливается в виде стерильного изотонического раствора с надлежащей концентрацией консервантов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продукт может содержать композицию, содержащую желаемую молекулу совместно с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечить контролируемое или пролонгированное высвобождение указанного продукта, который может быть доставлен с помощью инъекции с замедленным всасыванием компонентов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения может быть использована гиалуроновая кислота, которая способствует увеличению периода циркуляции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства могут быть использованы для введения композиции, содержащей мутеин ИЛ-2.

Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны для специалистов в данной области техники, включая составы с пролонгированным или контролируемым высвобождением композиции, содержащей мутеин ИЛ-2. Методики изготовления многих других систем, обеспечивающих пролонгированную или контролируемую доставку, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекции с замедленным высвобождением компонентов, также известны специалистам в данной области техники. См., например, международную патентную заявку PCT/US93/00829, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки и в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с пролонгированным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные носители в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Носители, обеспечивающие пролонгированное высвобождение, могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США №3773919 и в Европейской патентной заявке EP 058481, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-

глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли-2-гидроксиэтилметакрилат (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), сополимер этилена и винилацетата (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация Европейской патентной заявки EP 133988). Композиции с пролонгированным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации Европейских патентных заявок EP036676; EP088046 и EP143949, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, используемые для введения в условиях *in vivo*, как правило, обеспечиваются в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Если композиция является лиофилизированной, то стерилизация с использованием этого способа может быть проведена либо перед, либо после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Композиции для парентерального введения, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает составы, содержащие мутеин ИЛ-2, которые обладают буферной способностью, подходящие для использования в виде фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке 06138181A2 (PCT/US2006/022599), которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Как обсуждалось выше, в некоторых вариантах реализации предложены композиции, содержащие мутеин ИЛ-2, в частности, фармацевтические слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, которые содержат, помимо композиции, содержащей мутеин ИЛ-2, одно или более вспомогательных веществ, таких как те, которые приведены в качестве примера в данном разделе и в других местах настоящей заявки. Применительно к указанным композициям вспомогательные вещества могут быть использованы в настоящем изобретении для самых различных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, например, регулирование вязкости, и/или в соответствии со способами согласно настоящему изобретению для улучшения эффективности и/или стабилизации таких составов, и в соответствии со способами защиты от разложения и порчи, вследствие, например, воздействий, возникающих в процессе производства, перевозки, хранения, предпродажной подготовки, введения и в течение последующих этапов.

Существуют различные методические указания, описывающие способы стабилизации белка и материалы для изготовления композиций, а также способы, которые подходят для этих целей, например, см. работы Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," в: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки, в частности, в разделы, касающихся вспомогательных веществ и вышеуказанных способов для обладающих буферной способностью белковых составов согласно настоящему изобретению, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов, подходящих для использования в медицинских целях у животных и/или человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения соли могут быть использованы, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава, и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков за счет связывания с заряженными остатками на поверхности белка, экранирования заряженных и полярных групп в белке и уменьшения прочности их электростатических взаимодействий, т.е. притяжения и отталкивания. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, за счет связывания с денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Также ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и тем самым предотвратить или уменьшить агрегацию белка и его нерастворимость.

Различные виды ионов значительно различаются по своему воздействию на белки. Было разработано несколько качественных классификаций ионов и их влияния на белки, которые могут быть использованы при изготовлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является серия Гофмейстера, в которой ионные и полярные неионные растворенные вещества классифицируются в соответствии с их влиянием на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропные вещества обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 М сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание").

Хаотропные вещества обычно используются для денатурирования и/или солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении процессов "высаливания" и "всаливания" определяет их положение в серии Гофмейстера.

В соответствии с различными вариантами реализации настоящего изобретения свободные аминокислоты могут быть использованы в составах, содержащих мутеин ИЛ-2, в качестве наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов, а также в соответствии с другими стандартными способами применения. Лизин, пролин, серин и аланин можно использовать для стабилизации белков в составе. Глицин можно использовать при лиофилизации, чтобы обеспечить правильную структуру и свойства лиофилизированной таблетки. Аргинин можно использовать для ингибирования агрегации белка в жидких и лиофилизированных составах. Метионин можно использовать в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, такие как маннит и сахароза, сорбит и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и, применительно к настоящему описанию, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными соединениями. Их можно использовать в качестве стабилизирующих агентов в жидких и лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физического и химического разрушения. Полиолы также можно использовать для регулирования тоничности составов.

Полиолы, которые можно использовать в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, включают маннит, который обычно применяют, чтобы обеспечить структурную стабильность таблетки в лиофилизированных составах. Маннит обеспечивает структурную стабильность лиофилизированной таблетки. Как правило, он используется совместно с лиопротектором, например, сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных агентов для регулирования тоничности, а также стабилизаторами, защищающими от воздействий во время циклов замораживания-оттаивания при транспортировке или получении нерасфасованного продукта в процессе производства.

Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Соответственно, они, как правило, не входят в число предпочтительных полиолов для использования в соответствии с настоящим изобретением. Помимо этого, сахара, которые образуют такие активные формы, например, сахароза, которая при гидролизе в кислых условиях распадается на фруктозу и глюкозу, и, следовательно, приводит к гликированию, по этой причине также не входят в число предпочтительных полиолов согласно настоящему изобретению. ПЭГ можно использовать для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и благодаря этим качествам он может быть использован в настоящем изобретении.

Варианты составов, содержащих мутеин ИЛ-2, дополнительно содержат поверхностно-активные вещества. Белковые молекулы могут всасываться на поверхностях и денатурировать с последующей агрегацией на поверхности раздела фаз воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Как правило, вероятность возникновения таких явлений обратно пропорциональна концентрации белка. Интенсивность таких вредных взаимодействий обычно обратно пропорциональна концентрации белка и, как правило, усугубляется при физическом встряхивании, например, таком, которое создается во время доставки и погрузки продукта.

Поверхностно-активные вещества обычно используют для предотвращения, сведения до минимума или снижения поверхностного всасывания. Поверхностно-активные вещества, которые пригодны для использования в настоящем изобретении для этих целей, включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие жирнокислотные сложные эфиры полиэтоксилатов сорбита и полуксамер 188.

Поверхностно-активные вещества также обычно используют для контроля конформационной стабильности белка. Использование поверхностно-активных веществ для этой цели зависит от конкретного белка, поскольку любое конкретное поверхностно-активное вещество, как правило, будет стабилизировать одни белки и дестабилизировать другие.

Полисорбаты подвержены окислительному разложению и зачастую поставляются с содержанием достаточного количества пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей аминокислотных остатков белка, особенно метионина.

Следовательно, следует с осторожностью использовать полисорбаты и, в случае их использования, они должны присутствовать в самой низкой эффективной концентрации. В этой связи полисорбаты иллюстрируют общее правило, что вспомогательные вещества должны быть использованы в минимальных эффективных концентрациях.

Варианты составов, содержащих мутеин ИЛ-2, дополнительно содержат один или более антиоксидантов. Вредное окисление белков в фармацевтических составах в некоторой степени можно предотвратить путем поддержания надлежащего внешнего уровня кислорода и температуры, а также избегая воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут быть использованы, чтобы предотвратить окислительное разрушение белков. Антиоксиданты, подходящие для этой цели, включают восстанавливающие агенты, ловушки активных форм кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для использования в терапевтических белковых составах в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. ЭДТА является предпочтительным антиоксидантом для этой

цели в соответствии с настоящим изобретением.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстанавливающие агенты, такие как глутатион, в частности, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Следовательно, антиоксиданты, подходящие для использования в настоящем изобретении, выбирают так, чтобы, среди прочего, устранить или значительно уменьшить возможность повреждения белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и необходимы для образования координационных комплексов белков, такие как цинк, который необходим для образования некоторых суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые вызывают разрушение белков. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изо-аспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (вплоть до 100 мМ) могут повышать устойчивость дезоксирибонуклеазы человека. Однако ионы Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут вызывать дестабилизацию рчДНазы. Аналогичным образом, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, в то время как ионы Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} могут привести к его дестабилизации, а ионы Al^{+3} могут усилить агрегацию этого фактора.

Варианты составов, содержащих мутеин ИЛ-2, дополнительно содержат один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозных составов для парентерального введения, в которых предусмотрено более одного отбора препарата из одного и того же контейнера. Их основная функция заключается в ингибировании роста микроорганизмов и в обеспечении стерильности продукта в течение всего срока годности или срока использования лекарственного препарата. Обычно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Несмотря на то, что консерванты долгое время используются совместно с низкомолекулярными соединениями для парентерального введения, разработка белковых составов, которые содержат консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие на белки (вызывают агрегацию), и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозных белковых составах. На сегодняшний день большинство белковых лекарственных препаратов изготовлено только для однократного использования. Однако в тех случаях, когда возможно использование многодозных составов, они обеспечивают дополнительное преимущество в отношении удобства для пациента и повышенную конкурентоспособность. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в отношении которого разработка содержащих консерванты составов привела к промышленному выпуску более удобных шприцев-ручек для многократного использования. В настоящее время в продаже доступны по меньшей мере четыре разновидности устройств шприцев-ручек, содержащих составы на основе гормона роста человека с добавлением консервантов. Нордитропин (жидкость, Novo Nordisk), нутропин AQ (жидкость, Genentech) и генотропин (лиофилизированная форма, картридж с двумя отделениями, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, тогда как соматроп (Eli Lilly) изготовлен с добавлением м-крезола.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, такой как, например, Fc.IL-2(V91K) или Fc.IL-2(N88D), изготовлены в концентрации 10 мг/мл в растворе 10 мМ L-глутаминовой кислоты, 3,0% (мас./об.) L-пролина, при pH 5,2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, такой как, например, Fc.IL-2(V91K) или Fc.IL-2(N88D), изготовлен в растворе 10 мМ K_3PO_4 , 161 мМ L-аргинина, при pH 7,6.

В ходе изготовления и разработки дозированных форм с добавлением консервантов следует учитывать ряд аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Это потребует проведения испытаний данного консерванта в составе лекарственной формы в диапазоне концентраций, которые обеспечивают антимикробную эффективность без ущерба для стабильности белка.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены мутеины ИЛ-2 или слитые белки, содержащие мутеины ИЛ-2 и фрагмент Fc, обеспеченные в форме лиофилизированных составов. Сублимированные продукты могут быть лиофилизированы без консерванта и восстановлены разбавителем, содержащим консервант, во время использования. Это сокращает время, в течение которого консервант находится в контакте с белком, значительно уменьшая риски, связанные со стабильностью. При использовании жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться на протяжении всего срока годности продукта (приблизительно от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное вещество и все вспомогательные компоненты.

Составы, содержащие мутеин ИЛ-2, как правило, предназначены для конкретных путей и способов введения, конкретных дозировок и частоты введения, конкретных видов лечения конкретных заболеваний и имеют определенный диапазон биодоступности и устойчивости, помимо всего прочего. Составы, следовательно, могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутриушной, окулярный, ректальный, вагинальный и парентеральный пути введения, включая внутривенную и внутриартериальную

инъекцию, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После изготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить в готовой к использованию форме или в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. В настоящем изобретении также предложены наборы для получения стандартной лекарственной формы для однократного введения. Каждый набор согласно настоящему изобретению может включать первый контейнер, содержащий высушенный белок, и второй контейнер, содержащий водный состав. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы, содержащие жидкие составы, и шприцы с лиофилизированным составом).

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей мутеин ИЛ-2, предназначенной для применения, будет зависеть, например, от терапевтических показаний и целей. Специалист в данной области техники поймет, что соответствующие уровни доз для лечения будут варьироваться в зависимости, в частности, от доставленной молекулы, показания, в соответствии с которым используют мутеин ИЛ-2, пути введения, размера (масса тела, площадь поверхности тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения врач может титровать дозу и изменять путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Обычная доза может варьироваться от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно до 1 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. В конкретных вариантах реализации доза может варьироваться от 0,5 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг, возможно, от 2,5 мкг/кг до приблизительно 50 мкг/кг.

Терапевтически эффективное количество мутеина ИЛ-2 предпочтительно вызывает уменьшение степени тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращает возникновение нарушений или инвалидности благодаря угнетению заболевания.

Фармацевтические композиции могут быть введены с помощью медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851; и 5399163, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Способы лечения аутоиммунных или воспалительных заболеваний

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 согласно настоящему изобретению используют для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения используют слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc.

Заболевания, которые особенно поддаются лечению с использованием мутеина ИЛ-2, раскрытого в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоарткулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиарткулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный реактивный артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоарткулярный ревматоидный артрит, полиарткулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), дерматомиозит, псориаз, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, базедову болезнь), болезнь Аддисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, ТПХ, отторжение трансплантата, повреждение почек, гепатит С-индуцированный васкулит, спонтанную потерю беременности и тому подобное.

В предпочтительных вариантах реализации аутоиммунное или воспалительное заболевание представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", гепатит С-индуцированный васкулит, сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, спонтанную потерю беременности, атопические заболевания и воспалительные заболевания кишечника.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пациент, страдающий аутоиммунным или воспалительным заболеванием или подверженный риску развития такого заболевания, получает мутеин ИЛ-2 (например, мутеин ИЛ-2, описанный в настоящей заявке, такой как слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, описанный в настоящей заявке, или другой мутеин ИЛ-2, известный в данной области техники, или ИЛ-2 дикого типа, возможно в качестве части Fc-слитой молекулы, относящейся к типу, описанному в настоящей заявке), с последующим контролем ответа пациента на лечение. Контролируемый ответ пациента может представлять собой любой детектируемый или поддающийся оценке ответ пациента на лечение, или любую комбинацию таких видов ответа. Например, ответ может представлять собой изменение физиологического состояния пациента, такого как температура тела или лихорадка, аппетит, потливость, головная боль, тошнота, усталость, голод, жажда, умственная активность или т.п. В другом варианте ответ может представлять собой изменение количества клеток определенного типа или продукта гена (например, белка, пептида или нуклеиновой кислоты), например, в образце периферической крови, взятой у пациента. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения схема лечения пациента меняется, если пациент имеет детектируемый или поддающийся оценке ответ на лечение или если такой ответ превышает конкретный порог. Изменение схемы лечения может представлять собой уменьшение или увеличение частоты дозирования, или уменьшение или увеличение количества мутеина ИЛ-2, вводимого в виде однократной дозы, или прекращение приема препарата (т.е. временное прекращение лечения либо прекращение на указанный период времени, либо до тех пор, пока лечащий врач не определит, что лечение должно быть продолжено, или до тех пор, пока контролируемый ответ пациента не будет свидетельствовать о том, что лечение должно или может быть возобновлено) или прекращение лечения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ответ представляет собой изменение температуры тела или концентрации С-реактивного белка у пациента. Например, ответ может представлять собой повышение температуры тела пациента или увеличение концентрации СРБ в образце периферической крови, или оба изменения одновременно. В одном конкретном варианте реализации настоящего изобретения лечение пациента ограничивают, приостанавливают или прекращают, если температура тела пациента во время лечения увеличивается по меньшей мере на 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2° или 2,5°C. В другом конкретном варианте реализации настоящего изобретения лечение пациента ограничивают, приостанавливают или прекращают, если во время лечения концентрация СРБ в образце периферической крови пациента увеличивается по меньшей мере на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5 или 2 мг/мл. Другие виды ответов пациента, которые может контролировать и использовать при принятии решения об изменении, ограничении, приостановке или прекращении лечения, включают возникновение или ухудшение синдрома капиллярной утечки (гипотензия и сердечно-сосудистая неустойчивость), нарушение функции нейтрофилов (например, в результате инфекции либо при возникновении или обострении инфекции), тромбоцитопению, тромботическую ангиопатию, реакции в месте инъекции, васкулит (например, гепатит С-индуцированный васкулит) или воспалительные симптомы или заболевания. Другие виды ответов пациента, которые можно контролировать и использовать при принятии решения об изменении, ограничении, усилении, приостановке или прекращении лечения, включают увеличение количества NK-клеток, T_{рег} клеток, FOXP3⁺ CD4 T-клеток, FOXP3⁺ CD4 T-клеток, FOXP3⁻ CD8 T-клеток или эозинофилов. Увеличение количества клеток этих типов можно детектировать, например, как увеличение количества таких клеток на единицу объема периферической крови (например, выраженное как увеличение количества клеток на миллилитр крови) или как увеличение доли такого типа клеток, например, по сравнению с другим типом клеток или количеством клеток в образце крови. Другой тип ответа пациента, который можно контролировать, представляет собой увеличение количества мутеина ИЛ-2, связанного на поверхности CD25⁺ клеток в образце периферической крови пациента.

Способы экспансии T_{рег} клеток

Мутеин ИЛ-2 или слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, можно использовать для экспансии T_{рег} клеток у субъекта или в образце. В настоящем изобретении предложены способы увеличения отношения количества T_{рег} клеток к количеству нерегуляторных T-клеток. Способ включает приведение популяции T-клеток в контакт с эффективным количеством человеческого ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc. Величина отношения может быть измерена путем определения отношения количества CD3⁺ FOXP3⁺ клеток к количеству CD3⁺ FOXP3⁻ клеток в популяции T-клеток. Как правило, T_{рег} клетки в крови человека составляют 5-10% от общего количества CD4⁺ CD3⁺ T-клеток, однако при заболеваниях, перечисленных выше, эта доля может быть выше или ниже. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения доля T_{рег} клеток увеличивается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или по меньшей мере на 1000%. Максимальная величина относительного увеличения доли T_{рег} клеток может варьироваться для конкретных заболеваний. Однако максимальная частота T_{рег} клеток, которая может быть получена с помощью лечения мутеином

ИЛ-2, составляет 50% или 60% от общего количества CD4+ CD3+ Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутеин ИЛ-2 или слитый белок, содержащий мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, вводят субъекту, при этом в периферической крови субъекта увеличивается отношение количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток.

Поскольку мутеин ИЛ-2 и слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и Fc, предпочтительно стимулируют экспансию $T_{\text{рег}}$ клеток в сравнении с другими типами клеток, они также могут быть использованы, чтобы увеличить отношение количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству естественных клеток-киллеров (НК) в периферической крови субъекта. Величина отношения может быть измерена путем определения отношения количества CD3+ FOXP3+ клеток к количеству CD16+ и/или CD56+ лимфоцитов, которые относятся к типу CD19- и CD3-.

В настоящем изобретении также предусмотрено, что мутеины ИЛ-2 или слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, могут оказывать терапевтическое действие на заболевание или расстройство у пациента без существенного увеличения отношения количества $T_{\text{рег}}$ клеток к количеству нерегуляторных Т-клеток или НК-клеток в периферической крови пациента. Терапевтическое действие может быть обусловлено локализованной активностью мутеина ИЛ-2 или слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, в очаге воспаления или аутоиммунного заболевания.

Примеры

Описанные далее примеры, включая конкретные примеры и примеры возможного использования, приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов реализации или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Снижение числа мутаций, которые придают высокую аффинность в отношении CD25.

Мутеины ИЛ-2 с повышенной аффинностью в отношении CD25 и уменьшенной активностью передачи сигналов с участием ИЛ-2R β предпочтительно стимулируют экспансию и функцию $T_{\text{рег}}$ клеток. Чтобы уменьшить потенциальную иммуногенность был проведен поиск минимального числа мутаций, необходимых для достижения высокой аффинности в отношении CD25. Кристаллическая структура ИЛ-2 в комплексе с тремя его рецепторами (код PDB-2B5I) показывает, что замены V69A и Q74P расположены в спиральной структуре, которая взаимодействует с CD25. Этот факт может объяснить, почему замены V69A и Q74P часто выделяли в двух независимых скрининговых исследованиях, направленных на поиск мутаций ИЛ-2, обеспечивающих высокую аффинность связывания с CD25 (Rao et al. 2005; Thanos et al. 2006). Цель исследования, описанного в данном примере, заключалась в определении того, какие из других мутаций в мутеине ИЛ-2 "2-4", выявленных в скрининговом исследовании, проведенном Rao et al., являются наиболее важными для повышения аффинности до величины, превышающей ту, которую наблюдали для V69A и Q74P по отдельности. Следующие белки подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии для оценки связывания с CD25 на поверхности активированных Т-клеток. Все конструкции также включали С-концевую метку FLAG и полигистидиновую метку для очистки и детектирования. Конкретные мутации приведены в скобках.

HaMut1D	(V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 8)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEEALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut2D	(N30S, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 9)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINSYKNPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEEALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut3D	(K35R, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 10)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEEALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut4D	(T37A, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 11)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLARMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEEALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut5D	(K48E, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 12)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEEALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut6D	(E68D, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 13)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQC LEEEL KPLEDALN LAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT		
HaMut7D	(N71R, V69A, Q74P, N88D, C125A)	(SEQ ID NO: 14)

```

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEEL
KPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ
SIISTLT
      HaMut8D      (K35R, K48E, E68D, N88D, C125A)      (SEQ ID NO: 15)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLCLEEEEL
KPLEEDVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ
SIISTLT

```

Конструкция HaMut7D связывалась с CD25 с аффинностью, величина которой была аналогична таковой для исходного изолята "2-4" (~200 пМ), это указывает на то, что мутация N71R была способна значительно увеличивать аффинность до величины, превышающей ту, которую наблюдали для V69A, Q74P по отдельности (HaMut1D, ~2 нМ). Аффинность других конструкций была аналогична или незначительно выше, чем аффинность HaMut1D, за исключением HaMut8D, величина аффинности которой была лишь незначительно выше, чем у ИЛ-2 дикого типа.

Пример 2. Мутеины ИЛ-2, гибридные с фрагментом Fc IgG1 для улучшения периода полувыведения.

Чтобы уменьшить частоту дозирования, необходимую для обогащения популяции T_{рег} клетками при использовании мутеина ИЛ-2, проводили оценку различных слитых белков между ИЛ-2 и фрагментами Fc IgG1. Фрагменты Fc содержали точечные мутации, чтобы устранить эффекторные функции, опосредованные IgG1, такие как лизис клетки-мишени. Мутации фрагмента Fc для устранения эффекторной функции включали A327Q, Ala Ala (L234A+L235A) или N297G. Поскольку мутеины ИЛ-2, селективные в отношении T_{рег} клеток, имеют частично сниженную активность ИЛ-2, представлялось важным гибридовать ИЛ-2 с фрагментом Fc таким способом, который не оказывает существенного влияния на передачу сигналов с участием ИЛ-2R. Соответственно, мутеины ИЛ-2 испытывали, чтобы оценить их способность активировать ИЛ-2R после гибридизации с фрагментом Fc или в негибридованном состоянии.

Чтобы определить, приведет ли димеризация ИЛ-2 при гибридизации с фрагментом Fc к увеличению интенсивности передачи сигналов с участием ИЛ-2R вследствие повышенной avidности в отношении ИЛ-2R, более слабый мутеин ИЛ-2 (haD5)(US20110274650) гибридовали с аминоконцом фрагмента Fc, отделенного линкерной последовательностью GGGGS (SEQ ID NO: 5). Этот мутеин содержал 3 мутации, влияющие на передачу сигналов с участием ИЛ-2R (E15Q, H16N, N88D), 8 мутаций, придающих высокую аффинность в отношении CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al. 2005), и C125S, чтобы предотвратить ошибочное спаривание цистеина и агрегацию. Гибридизация с фрагментом Fc таким способом полностью устранила биологическую активность haD5, в то время как его высокоаффинное связывание с поверхностным CD25 усилилось, вероятно, вследствие повышения avidности в результате димеризации.

Мутеины ИЛ-2 также гибридовали с N- или C-концом гетеродимера Fc так, что только одна цепь димера Fc несла домен ИЛ-2. Гетеродимерное спаривание между двумя асимметричными цепями Fc усиливалось за счет электростатических взаимодействий между введенными остатками лизина на одной цепи Fc и введенными остатками аспарагиновой кислоты на другой цепи Fc. Мутеин ИЛ-2, haD6, гибридовали с N-концом одной цепи Fc или другой цепи, в том случае, если одна конфигурация была предпочтительной, две полученные белковые конструкции обозначили haD6.FcDD и haD6.FcKK. Мутеин haMut7D также гибридовали с C-концом гетеродимера Fc с использованием одного или двух линкеров GGGGS (SEQ ID NO: 5) (FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)2haMut7D).

Гибридизация мутеина ИЛ-2, haD6, с N-концом гетеродимера Fc привела к частичной потере активности по сравнению со свободным мутеином haD6 в экспериментах по исследованию фосфорилирования pSTAT5 и пролиферации T-клеток. Напротив, гибридизация haMut7D с C-концом гетеродимера Fc с использованием одного или двух линкеров GGGGS (SEQ ID NO: 5) не изменяла активность haMut7D.

Также было изучено влияние гибридизации мутеина ИЛ-2 с C-концом гомодимера Fc. Общий пул мононуклеарных клеток периферической крови (МПКК) при плотности 300 миллионов клеток на 100 мл активировали в колбах T75 для выращивания тканевых культур с использованием 100 нг/мл антитела к CD3 (ОКТ3). На 3-й день культивирования клетки промывали 3 раза и оставляли в состоянии покоя в свежей среде в течение 3 дней. Затем клетки стимулировали с использованием вариантов ИЛ-2 в 10-кратном диапазоне доз для титрования от 1 пМ до 10 нМ в конечном объеме 50 мкл. Уровень фосфорилирования STAT5 измеряли с помощью набора буферов BD Phosflow™. В общих чертах, 1 мл лизирующего/фиксирующего буфера BD Phosflow™ добавляли, чтобы остановить стимуляцию. Клетки фиксировали в течение 20 мин при 37°C и пермеабелизовали ×1 буфером для пермеабелизации BD Phosflow™ Perm на льду перед проведением окрашивания CD4, CD25, FoxP3 и pSTAT5.

Как можно видеть на фиг. 1, биологическая активность мутеинов haMut1D и haMut7D не изменялась в результате гибридизации с C-концом гомодимера Fc. Следовательно, гибридизация между N-концом ИЛ-2 и C-концом Fc не ухудшает агонистическую активность мутеинов ИЛ-2, даже применительно к гомодимеру Fc.ИЛ-2. В этих конструкциях мутацию C125A использовали вместо C125S для

улучшения производственного процесса.

Пример 3. Регулирование активности мутеина ИЛ-2 для обеспечения предпочтительной экспансии $T_{рег}$ клеток.

Исходная панель мутеинов ИЛ-2 содержала N88D по отдельности или в комбинации с 1 или 2 дополнительными мутациями, влияющими на передачу сигналов с участием ИЛ-2R. Для того чтобы выявить мутеины, обладающие аналогичной или незначительно более высокой агонистической активностью, по сравнению с серией N88D, была разработана вторая панель мутеинов, которые все содержали одиночные точечные мутации. Панель, включающая 24 сигнальные мутации, была выявлена на основании предсказанных аминокислот, взаимодействующих с ИЛ-2R β (кристаллическая структура, код PDB-2B5I). Конкретные замены выбирали на основании прогнозируемого снижения свободной энергии связывания между мутеином и ИЛ-2R β . Величину свободной энергии связывания рассчитывали с использованием вычислительного алгоритма EGAD (лаборатория Генделя, Калифорнийский университет в Сан-Диего, США). Величину свободной энергии связывания мутированного варианта определяют как $\Delta\Delta G_{мут} = \mu (\Delta G_{мут} - \Delta G_{дт})$. Где μ ($= 0,1$, как правило) обозначает поправочный коэффициент, используемый для нормирования прогнозируемых изменений аффинности связывания, чтобы получить наклон кривой 1, при сопоставлении с экспериментальными величинами энергии (Pokala and Handel 2005). Свободную энергию диссоциации (ΔG) определяли как разность величин энергии между связанным состоянием ($\Delta G_{связ}$) и свободным состоянием ($\Delta G_{своб}$). Величину энергии диссоциации $\Delta G_{мут}$ рассчитывали для каждой замены.

Панель мутеинов ИЛ-2, содержащих следующие замены (H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20N, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R или E95I), экспрессировали в виде C-концевых слитых белков с гетеродимером Fc. Эти конструкции также содержали мутации haMut7, для придания высокой аффинности связывания с CD25 (V69A, N71R, Q74P), и C125A, чтобы обеспечить эффективный фолдинг белковой цепи.

Панель подвергали скринингу для определения активности с помощью количественного исследования уровня фосфорилирования STAT5 в T-клетках, описанного в примере 2, при этом было обнаружено, что активность H16E, D84K, V91N, V91K и V91R была ниже, чем активность ИЛ-2 дикого типа, и выше, чем активность N88D (фиг. 2).

H16E, D84K, V91N, V91K и V91R обладали активностью, которая была ниже, чем активность ИЛ-2 дикого типа, и выше, чем активность N88D.

Отобранные мутеины также испытывали в количественных исследованиях пролиферации T-клеток и NK-клеток.

Для проведения исследований пролиферации T-клеток общий пул МКПК при плотности 3 млн. клеток/мл активировали 100 нг ОКТ3. На 2-й день клетки промывали 3 раза и оставляли в состоянии покоя в свежей среде в течение 5 дней. Затем клетки помечали с использованием сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) и дополнительно культивировали в 24-луночной планшете при плотности 0,5 млн./лунку в среде, содержащей ИЛ-2, в течение 7 дней перед проведением исследования способом проточной цитометрии (FACS). Пролиферация подгруппы T-клеток представлена на фиг. 3 как разбавление CFSE (медиана интенсивности флуоресценции CFSE).

Для исследования пролиферации NK-клеток подгруппу CD16+ NK-клеток, отобранных с помощью магнито-активированного клеточного сортирования, культивировали в среде, содержащей ИЛ-2, в течение 3 дней при плотности 0,1 млн./лунку в 96-луночных планшетах. По 0,5 мкКи³ H-тимидина вносили в каждую лунку в течение последних 18 часов инкубации. Результаты исследования приведены на фиг. 4.

Мутированные варианты H16E, D84K, V91N, V91K и V91R были способны стимулировать экспансию $T_{рег}$ клеток, аналогично тому, как это наблюдали для ИЛ-2 дикого типа, однако были приблизительно в 10 раз менее активны в отношении других T-клеток (фиг. 3) и приблизительно в 100 раз менее активны в отношении NK-клеток (фиг. 4).

Была сконструирована отдельная панель слитых белков Fc.ИЛ-2, в которых расстояние между гетеродимером Fc и мутеином haMut7 (V69A, N71R, Q74P, C125A) уменьшили путем укорочения аминокислотной последовательности на несколько остатков.

Fc.haMut7

Fc...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID

NO: 22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:

23)

Trunc2 Fc...TQKSLSLS-STKKTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:

24)

Trunc3 Fc...TQKSLSLS--TKKTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:

25)

Trunc4 Fc...TQKSLSL---KKTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:
26)
Trunc5 Fc...TQKSLSL----KTQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:
27)
Trunc6 Fc...TQKSLSL-----TQLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:
28)
Trunc7 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:
29)
Trunc8 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMI LN...haMut7 (SEQ ID NO:
30)

Активность вариантов Trunc1-Trunc4 была аналогична таковой для полноразмерной исходной конструкции Fc.haMut7, согласно результатам измерения уровня фосфорилирования STAT5 и пролиферации Т-клеток и NK-клеток, как описано для фиг. 2, 3 и 4. Варианты Trunc5 и Trunc6 стимулировали более слабые ответы, интенсивность которых, тем не менее, была сильнее, чем интенсивность ответов, стимулированных мутацией N88D (haD и haMut7D), и была практически аналогична интенсивности ответов, стимулированных V91K. Активность варианта Trunc7 была слабее, чем активность мутеинов, содержащих N88D, Trunc8 имел очень низкую активность. Тем не менее, при испытании на NK-клетках Trunc5 и Trunc6 проявили себя как более сильные агонисты, чем V91K, это свидетельствует о том, что селективности в отношении T_{per} клеток легче достичь при использовании мутаций, влияющих на пути передачи сигналов, чем при создании стерических препятствий с помощью проксимального фрагмента Fc.

Пример 4. Мутации, обеспечивающие высокую аффинность в отношении CD25, применительно к гомодимеру Fc.

Мутации, которые придавали высокую аффинность связывания с CD25, считались предпочтительными, поскольку они повышали тропизм в отношении Т-клеток, экспрессирующих высокие уровни CD25, способствовали образованию устойчивой связи мутеин ИЛ-2::CD25 и обеспечивали более длительную передачу сигналов. Однако уменьшение числа мутаций может снизить возможную иммуногенность. Мутеины, содержащие N88D или V91K, с и без мутаций haMut1 V69A и Q74P, обеспечивающих высокую аффинность, экспрессировали в виде С-концевых гибридов гомодимера Fc и сравнивали их биологическую активность. В исследовании уровня фосфорилирования pSTAT5 гомодимеризация не оказывала влияния на интенсивность сигнала по сравнению с мономерным мутеином. Реверсия мутаций V69A и Q74P, обеспечивающих высокую аффинность, также не влияла на передачу сигналов с участием pSTAT5. В исследованиях пролиферации Т-клеток мутации, обеспечивающие высокую аффинность, уменьшали активность обычных CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток, но не регуляторных Т-клеток (фиг. 5). Мутации, обеспечивающие высокую аффинность, также не изменяли пролиферативные ответы NK-клеток (фиг. 6).

Чтобы определить, влияют ли мутации, обеспечивающие высокую аффинность, на ответы Т-клеток в условиях *in vivo*, гуманизированным мышам (NOD.SCID.I12rg-нулевые мыши, иммунную функцию которых восстанавливали человеческими CD34+ гемопоэтическими стволовыми клетками) вводили слитые белки, содержащие мутеин ИЛ-2 и Fc, и контролировали экспансию T_{per} клеток. NOD.SCID.I12rg-нулевых (NSG) мышей в возрасте 7-и недель (Jackson Labs, Бар-Харбор, Мэн, США) облучали (180 рад) и восстанавливали иммунную функцию путем введения 94000 эмбриональных CD34+ гемопоэтических стволовых клеток печени человека. Через 21 неделю мышей распределяли на 6 групп на основании равномерного распределения доли химеризма (согласно результатам проточной цитометрии лимфоцитов периферической крови) и вводили 1 мкг указанных слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и фрагмент Fc, или фосфатно-солевой буфер (ФСБ) путем подкожных инъекций на 0-й и 7-й день. На 11-й день количество Т-клеток определенной подгруппы в крови определяли с помощью проточной цитометрии. При низкой дозе 1 мкг на животное мутации, обеспечивающие высокую аффинность, не улучшали экспансию T_{per} клеток сверх того, что наблюдали для мутаций N88D или V91K по отдельности (фиг. 7).

Экспансия T_{per} являлась селективной в том, что доля FoxP3⁺CD4⁺ Т-клеток не увеличивалась по отношению к общему количеству лейкоцитов периферической крови (ЛПК), представляющих собой смесь В- и Т-клеток человека, и миелоидных клеток мыши. Кроме того, при более высоких дозах мутации, обеспечивающие высокую аффинность, способствовали увеличению количества CD25⁺ FoxP3⁺ Т-клеток, тем самым уменьшая селективность в отношении T_{per} клеток. Следовательно, применительно к гомодимеру Fc мутации, обеспечивающие высокую аффинность, не рассматривали как необходимые для стимулирования предпочтительной экспансии T_{per} клеток.

Fc дикого типа IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (C125A) (SEQ ID NO:16)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C
LEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFAQSIISTLT

Fc.haMut1V91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO:17)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C
LEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFAQSIISTLT

Fc.V91K (или Fc.IL-2 (V91K)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C
LEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFAQSIISTLT

Fc.haMut1N88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:19)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C
LEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFAQSIISTLT

Fc.N88D (или Fc.IL-2 (N88D)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C
LEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
ITFAQSIISTLT

Пример 5. Более длительная связь мутеинов ИЛ-2.Fc с CD25 на поверхности клеток.

В ходе исследований на гуманизированных мышах был получен неожиданный результат, свидетельствующий о том, что, несмотря на свою пониженную способность передавать сигналы, мутеины индуцировали более устойчивое обогащение популяции T_{рег} клетками по сравнению с Fc.ИЛ-2 дикого типа. Более значительное обогащение T_{рег} клетками и активацию FoxP3 по сравнению с теми, которые наблюдали при использовании Fc дикого типа, обнаруживали при дозе 1 мкг/мышь (фиг. 7) и при более низкой дозе 0,5 мкг/мышь (фиг. 8). Такое увеличение активности в условиях *in vivo*, возможно, было обусловлено снижением поглощения T-клетками, что привело к увеличению количества слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2.Fc, доступного для более длительной передачи сигналов.

Однако в ходе исследований фармакокинетики в условиях *in vitro* и *in vivo* не были получены доказательства существенного увеличения продолжительности сохранения FC.V91K или FC.N88D по сравнению с Fc дикого типа в супернатантах, полученных из культур активированных T-клеток, или в сыворотке мышей, получавших исследуемые соединения. Поскольку Fc-слитые белки несли два домена мутеина ИЛ-2, то повышенное рециклирование в эндосомах может привести к более длительной связи с клеточной поверхностью вследствие увеличения авидности в отношении CD25. Действительно, было обнаружено, что FC.V91K и FC.N88D более эффективно, чем Fc дикого типа, сохраняются на поверхности ранее активированных T-клеток после кратковременного воздействия слитых белков (фиг. 9А и В).

Первичные МКПК предварительно стимулировали в течение двух дней, используя 100 нг/мл ОКТ3. Клетки собирали, промывали четыре раза и оставляли в состоянии покоя в течение ночи в культуральной среде. Затем клетки стимулировали 400 пМ Fc.ИЛ-2 в течение 30 мин при 37°C. После стимуляции клетки собирали для определения в T0 после одной промывки или промывали еще три раза в 12 мл теплой среды и культивировали в течение четырех часов. Для детектирования связанного с клетками Fc.ИЛ-2 клетки окрашивали FITC-конъюгированными антителами к человеческому IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Грив, Пенсильвания, США) и конъюгированными с аллофикоцианином антителами к CD25 (фиг. 9А).

Увеличение продолжительности передачи сигналов с участием ИЛ-2R при использовании FC.V91K и FC.N88D, по сравнению с Fc дикого типа, наблюдали с помощью внутриклеточного иммунного детектирования фосфо-STAT5 в аналогичных временных точках. Средние величины интенсивности флуоресценции фосфо-STAT5 в FoxP3+ CD4+ T-клетках приведены на фиг. 9В.

Пример 6. Оптимизация гибридной последовательности.

В доклинических исследованиях на мышах было показано, что величины воздействия слитых белков, содержащих мутеины ИЛ-2 и Fc, были различными, когда концентрации интактной молекулы в сыворотке крови сравнивали с таковыми для фрагмента Fc человека по отдельности, что указывает на циркуляцию катаболита Fc человека. Для оптимизации стабильности и фармакокинетики слитых белков, содержащих мутеины ИЛ-2 и Fc, в условиях *in vivo* проводили исследования модификаций гибридной последовательности, чтобы определить их влияние на протеолитическое расщепление слитых белков, содержащих мутеины ИЛ-2 и фрагмент Fc, в системном кровотоке и во время рециклирования в ретикулоэндотелиальной системе. Перечисленные далее конструкции оценивали в отношении их влияния на протеолитическую деградацию в условиях *in vitro* и *in vivo*.

(Ala_Ala)_G4S...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha7N88D (SEQ ID NO:
31)

(N297G_delK)_G4S...TQKSLSLSPG GGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID
NO: 32)

(N297G_KtoA)_AAPT...TQKSLSLSPGA_____APTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID
NO: 33)

(N297G_KtoA)_AAPA...TQKSLSLSPGA_____APASSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID
NO: 34)

Стабильность измеряли с помощью количественных иммунологических исследований путем сравнения концентрации общего пула Fc человека и концентрации интактного слитого белка, содержащего Fc и мутеин ИЛ-2, в различных временных точках. Протеолиз слитого белка, содержащего мутеины ИЛ-2 и Fc, подтверждали с помощью вестерн-блоттинга, используя антитела к ИЛ-2 и антитела к Fc человека, с последующим связыванием катаболитов иммунологическими способами и исследованием способом масс-спектрометрии. При проведении масс-спектрометрических исследований катаболитов (Ala_Ala)_G4S из образцов, полученных в условиях *in vitro* и *in vivo*, C-концевой Lys фрагмента Fc был определен как сайт протеолитического расщепления. Делеция или мутация C-концевого лизина во фрагменте Fc ((N297G_delK)_G4S и (N297G_KtoA)_AAPT) обеспечила более длительную стабильность в мышинной сыворотке при 37°C в условиях *in vitro* по сравнению с конструкциями Fc, содержащими C-концевой лизин ((Ala_Ala)_G4S). Подобная более длительная стабильность в сыворотке крови в условиях *in vitro* привела к большей величине воздействия у мышей, согласно результатам измерения области

под кривой концентрация-время (AUC) в сыворотке крови для слитого белка, содержащего мутеин ИЛ-2 и Fc. Более длительную стабильность слитых белков, содержащих мутеин ИЛ-2 и лишенный C-концевого лизина фрагмент Fc, также наблюдали в сыворотке крови яванских макак и человека в условиях *in vitro*. Мутация Thr-3 на Ala ((N297G_KtoA)_AAPA) в ИЛ-2 привела к снижению стабильности в условиях *in vitro* при 37°C (по сравнению с (N297G_KtoA)_AAPA) в сыворотке крови мышей и в отдельных экспериментах, включавших инкубацию с рекомбинантным катепсином D и L человека. Подобная сниженная стабильность в сыворотке крови в условиях *in vitro* привела к уменьшению воздействия (AUC) у мышей в условиях *in vivo* для (N297G_KtoA)_AAPA по сравнению с (N297G_KtoA)_AAPA. Масс-спектрометрическое исследование катаболитов (N297G_KtoA)_AAPA из образцов, полученных в условиях *in vitro* и *in vivo*, выявило, что остатки Lys 8 и Lys 9 мутеина ИЛ-2 восприимчивы к протеолизу, который не был обнаружен для эквивалентных образцов (N297G_KtoA)_AAPA. Снижение стабильности при 37°C (N297G_KtoA)_AAPA до величины характерной для (N297G_KtoA)_AAPA также наблюдали в сыворотке крови яванских макак и человека в условиях *in vitro*.

Ввиду важности гликозилирования в этой области и для того чтобы потенциально улучшить производственную технологичность слитого белка, слитые последовательности изменяли, как описано далее, чтобы усилить N-связанное, но не O-связанное гликозилирование:

Исходная конструкция

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ

(SEQ ID NO: 32)

Измененная конструкция

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A)

TQKSLSLSPGGGGGSAPNSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A)

TQKSLSLSPGGGGGSAPNSTSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 36)

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)

TQKSLSLSPGGGGGTAPASSSTKKTQLQ n (SEQ ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)

TQKSLSLSPGYGNGTAPASSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 38)

Пример 7. Определение фармакокинетики и фармакодинамики у яванских макак.

При использовании стандартных способов лечения, направленных на стимуляцию иммунной системы под действием ИЛ-2, необходимы перерывы между циклами введения лекарственных препаратов (отсутствие воздействия), чтобы избежать нежелательных побочных эффектов. В отличие от этого, способы лечения, направленные на стимулирование или экспансию T_{per} клеток, могут нуждаться в длительном воздействии с устойчивыми остаточными уровнями лекарственных препаратов (C_{min} в сыворотке крови), достаточными для стимуляции T_{per} клеток, но с максимальными величинами воздействия (C_{max} в сыворотке крови), которые ниже уровня лекарственного препарата, который приводит к активации иммунной системы. Этот пример описывает стратегии дозирования мутеинов, имеющих увеличенный период полувыведения, у яванских макак для достижения более длительного влияния на мишень (C_{min} в сыворотке крови), при сохранении максимальных величин воздействия (C_{max} в сыворотке крови) ниже уровня лекарственного препарата, который, как ожидается, будет необходим для провоспалительной активации иммунной системы.

В четырех группах (A-D) яванских макак вводили FC.V91K (IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A), причем в трех группах (A-C) введение осуществляли подкожным путем и в одной группе (D) путем внутривенных инъекций. В каждой из групп четырем биологически наивным самцам яванских макак вводили исследуемые соединения с использованием стратегии дозирования, описанной ниже. Подкожное введение мутеинов с увеличенным периодом полувыведения может обеспечить более интенсивное всасывание в лимфатической системе, что ведет к получению более низких величин воздействия (C_{max} в сыворотке крови) и/или более надежному фармакологическому ответу (экспансия T_{per}). Стратегия дозирования для группы A состоит из введения трех последовательных доз 10 мкг/кг на 0, 2, 4-й день в цикле 1, и 10 мкг/кг на 14-й день, что обеспечивает более длительное влияние на мишень, аналогичное тому, которое наблюдают при более высокой начальной дозе 50 мкг/кг, при сохранении более низкой максимальной величины воздействия (C_{max}). Стратегия дозирования для группы B включает введение доз 50 мкг/кг на 0-й и 14-й день для сравнения с группой A. Стратегия дозирования для группы C включает введение дозы 50 мкг/кг на 0-й и 28-й день. Указанные дозировки позволяют определить, оказывают ли остаточные концентрации исследуемых препаратов влияние на мишень, которое является достаточным для поддержания предпочтительной экспансии T_{per} клеток, а также обеспечивает ли перерыв между циклами введения препарата какое-либо преимущество. Стратегия дозирования для группы D с внутривенным введением включает введение дозы 50 мкг/кг на 0-й день, что позволяет сравнить максимальные величины воздействия (C_{max}) и различия в степени обогащения T_{per} клетками с этими показате-

лями при подкожном введении.

Фармакокинетические параметры (количественное иммунологическое исследование интактной молекулы и общего уровня Fc человека), уровни антител к лекарственному препарату, уровни отщепленной растворимой формы CD25 и цитокинов в сыворотке крови (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИФН- α , ИЛ-10, ИЛ-5, ИЛ-4 и ИЛ-13) измеряли в следующих временных точках для каждой указанной дозовой группы:

Группа А: перед введением дозы (первый цикл; доза 1), 48 (первый цикл перед введением дозы; доза 2), 96 (первый цикл перед введением дозы; доза 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336 (второй цикл перед введением дозы), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 и 1008 ч.

Группа В: перед введением дозы (первый цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336 (второй цикл перед введением дозы), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 и 1008 ч.

Группа С: перед введением дозы (первый цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672 (второй цикл перед введением дозы), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080 и 1176 ч.

Группа D: перед введением дозы (первый цикл), 0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 и 672 ч.

Фармакодинамические параметры (иммунологическое фенотипирование и подсчет T_{рег} клеток, нерегуляторных CD4 и CD8 T-клеток и NK клеток в периферической крови) измеряют в следующих временных точках для каждой указанной дозовой группы:

Группа А: перед введением дозы (первый цикл; доза 1), 96 (первый цикл перед введением дозы; доза 3), 168, 336 (второй цикл перед введением дозы), 456 и 576 ч.

Группа В: перед введением дозы (первый цикл), 120, 240, 336 (второй цикл перед введением дозы), 456 и 576 ч.

Группа С: перед введением дозы (первый цикл), 120, 240, 672 (второй цикл перед введением дозы), 792 и 912 ч.

Группа D: перед введением дозы (первый цикл), 120 и 240 ч.

Показатели общего и биохимического анализа крови оценивают у всех животных и во всех дозовых группах перед введением дозы и через 24 часа после введения начальной дозы в каждой дозовой группе. Оценивают следующие параметры.

Гематологические показатели:

Количество лейкоцитов (общее и абсолютное содержание лейкоцитов)

Количество эритроцитов

Гемоглобин

Гематокрит

Средняя эритроцитарная концентрация гемоглобина, средний объем эритроцитов, средняя эритроцитарная концентрация гемоглобина (расчетная)

Абсолютное количество ретикулоцитов

Количество тромбоцитов

Морфология клеток крови

Ширина распределения эритроцитов по объему

Средний объем тромбоцитов

Показатели биохимического анализа крови:

Щелочная фосфатаза

Общий билирубин (прямой билирубин, если общий билирубин превышает 1 мг/дл)

Аспаратаминотрансфераза

Аланинаминотрансфераза

Гамма-глутамилтрансфераза

Азот мочевины

Креатинин

Общий белок

Альбумин

Глобулин и соотношение А/Г (альбумин/глобулин) (расчетное)

Глюкоза

Общий холестерин

Триглицериды

Электролиты (натрий, калий, хлорид)

Кальций

Фосфор

Пример 8. Негликозилированный фрагмент Fc IgG1.

Природные антитела IgG содержат сайт гликозилирования в константной области 2 тяжелой цепи (CH2). Например, человеческие антитела IgG1 содержат сайт гликозилирования в положении Asn297 (нумерация в соответствии с системой ЕС). На сегодняшний день стратегии создания негликозилированных антител включают замену остатка Asn аминокислотой, физико-химические свойства которой аналогичны таковым Asn (например, Gln), или остатком Ala, который имитирует боковую цепь Asn без поляри-

ных групп. В данном примере описаны преимущества замены Asn глицином (N297G). Фрагменты Fc с заменой N297G представляют собой негликозилированные молекулы с улучшенными биофизическими свойствами и параметрами, относящимися к производственной технологичности (например, восстановление в процессе очистки).

Изучение нескольких известных кристаллических структур фрагментов Fc и антител IgG выявило значительную конформационную гибкость вокруг гликозилированного петлевого сегмента, особенно в положении остатка Asn297, который гликозилирован. Во многих известных кристаллических структурах остаток Asn297 принимал конформацию с положительным значением торсионных углов основной цепи. Gly имеет высокую склонность принимать конформацию с положительным значением торсионного угла основной цепи из-за отсутствия атомов боковой цепи. Таким образом, на основании этой конформации и структурного фактора Gly может представлять собой более предпочтительную замену для Asn, чем N297Q или N297A.

Мутационный обмен Asn297 на Gly приводит к получению негликозилированных молекул с существенно улучшенной способностью к восстановлению (или эффективностью) в процессе очистки и улучшенными биофизическими свойствами. Например, процент восстановления (конечный выход) из пула, сорбированного на белке А, составил 82,6% для мутации N297G по сравнению с 45,6% для N297Q и 39,6% для N297A. Исследование с использованием колонки, содержащей гидролизованые пептидные фрагменты соевого белка со связанными фосфолипидами, выявило, что более низкий процент восстановления для мутированных вариантов N297Q и N297A был связан с удлинением ниспадающей части пика, которая указывает на присутствие высокомолекулярных агрегатов и/или фрагментов с неправильной упаковкой цепей. Этот результат был повторно подтвержден в крупномасштабной серии экспериментов с реакционным объемом равным 2 л.

В биофармацевтической промышленности молекулы, которые потенциально можно использовать в крупномасштабном производственном процессе, например, потенциально пригодные для выпуска на рынок в качестве лекарственного средства, оценивают по ряду характеристик, чтобы снизить риск того, что молекула непригодна для крупномасштабного производства и очистки. При оценке производственной технологичности замена N297G проявила устойчивость к изменениям pH. При испытании N297G отсутствовали проблемы, связанные с агрегацией; в то время как замены N297Q и N297A вызывали 20% и 10% увеличение агрегации, соответственно. Несмотря на то, замена N297G демонстрировала лучшие характеристики производственной технологичности, ее показатели были аналогичны таковым для N297Q и N297A во всех функциональных исследованиях, в которых она была испытана. Например, в исследованиях ADCC-индуцирующей способности было показано, что N297G не имеет цитотоксичности, аналогично N297Q и N297A.

Пример 9. Стабилизированный гликозилированный фрагмент Fc IgG1.

Этот пример описывает способ улучшения стабильности каркаса антител IgG путем введения сконструированной дисульфидной(ых) связи(ей). Природные антитела IgG являются стабильными молекулами. Однако для некоторых видов терапевтического применения может потребоваться введение мутаций или создание негликозилированных молекул. Например, негликозилированные молекулы IgG могут быть использованы для терапевтических показаний, при которых необходимо избежать ADCC и связывания с рецепторами Fcγ. Тем не менее, негликозилированные молекулы IgG1 имеют гораздо более низкую температуру плавления (температура плавления домена CH2 уменьшается на приблизительно 10°C; с 70°C до 60°C), чем гликозилированные молекулы IgG1. Наблюдаемая более низкая температура плавления негативно влияет на различные биофизические свойства негликозилированного IgG1. Например, негликозилированный IgG1 более склонен к образованию агрегатов при низком значении pH по сравнению с гликозилированным IgG1.

Для конструирования дисульфидных связей первоначально использовали способ, основанный на структурных данных, включающий расчет расстояния между C-альфа атомами, чтобы выявить 54 пары остатков во фрагменте Fc, пригодных для мутационной замены остатком Cys. Эти 54 сайта далее сократили до 4 пар остатков (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C). Используемые критерии включали (i) положения в пределах области CH2, (ii) положения, удаленные от петель, изгибов цепи и углеводных фрагментов, (iii) положения, удаленные от рецептора Fcγ и сайтов взаимодействия с FcRn, (iv) положения, доступные для растворителя (предпочтительно углубленные положения) и т.д.

Парные замены цистеином создавали для использования в последовательности негликозилированного фрагмента Fc N297G. Пептидное картирование в невозстанавливающих условиях выявило, что три из четырех сконструированных сайтов формировали дисульфидные связи, в соответствии с прогнозом и предполагаемым дизайном указанного фрагмента. Мутация V259C-L306C не формировала дисульфидные связи и привела к неправильному спариванию с нативным дисульфидом, уже присутствующим в области CH2. Другие три пары мутаций: R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C формировали дисульфидные связи надлежащим образом, в соответствии с прогнозом и предполагаемым дизайном. Добавление дисульфидной связи к мутации N297G привело к улучшению термостабильности приблизительно на 15°C по сравнению с мутацией N297G по отдельности. Из таких вариантов потенциальных

дисульфидных связей как R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C, мутации R292C-V302C и A287C-L306C обладали хорошими фармакокинетическими параметрами при введении крысам ($T_{1/2}$ составил одиннадцать дней и девять дней, соответственно). Эти результаты отличались от опубликованного ранее фармакокинетического профиля, наблюдаемого у крыс, для дисульфидной связи в области CH2 (Gong et al., J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210), согласно которому $T_{1/2}$ составил пять дней.

Конструирование дисульфидной связи в области CH2 улучшает стабильность негликозилированной молекулы до величины, характерной для гликозилированных молекул IgG1 (улучшение температуры плавления на 10°C-15°C, согласно результатам дифференциальной сканирующей калориметрии). Сконструированные сайты, описанные в настоящей заявке, не приводят к беспорядочному формированию дисульфидных связей, и дисульфидные связи формируются в соответствии с прогнозом приблизительно в 100% популяции. Еще более важным является тот факт, что в отличие от сайта дисульфидной связи в области CH2, описанного в опубликованных литературных источниках, дисульфидные связи, описанные в настоящей заявке, не влияют на параметры фармакокинетики у крыс.

Пример 10.

Влияние мутаций V91K и N88D на ответы в Т-клетках и НК-клетках яванских макак и человека сопоставляли в условиях *in vitro*. В присутствии CD25 (популяция CD4⁺ CD25⁺ Т-клеток клеток, интенсивность сигнала которых выше порогового значения, при регистрации ответов pSTAT5 в образце цельной крови) влияние мутации V91K на передачу сигналов с участием ИЛ-2R у яванских макак было незначительным по сравнению со снижением активности передачи сигналов с участием ИЛ-2R человека. Тем не менее, в отсутствие CD25 (в популяции CD25⁻ Т-клеток, интенсивность сигнала которых выше порогового значения, при регистрации ответов pSTAT5 в цельной крови, и в исследовании пролиферации НК-клеток) мутация V91K вызывала более выраженное уменьшение передачи сигналов с участием ИЛ-2R у яванских макак. Напротив, Fc.N88D вызывала уменьшение передачи сигналов в CD25⁺ Т-клетках цельной крови яванских макак, которое было более сходно с влиянием мутации Fc.V91K на передачу сигналов в Т-клетках цельной крови человека. Данные в табл. 2, полученные в условиях *in vitro*, показывают, что терапевтическое окно, наблюдаемое для более слабого агониста Fc.N88D у яванских макак, позволит предсказать влияние мутации Fc.V91K у человека.

Таблица 2. Обобщенные данные о влиянии мутаций V91K или N88D на ответы в клетках человека и яванских макак в условиях *in vitro*

	pSTAT5 в цельной крови		Пролиферация НК-клеток
	CD25+ Т-клетки	CD25- Т-клетки	
V91K у яванских макак	∅	↓	↓
V91K у человека	↓	↓↓	↓↓
N88D у яванских макак	↓	↓↓	↓↓
N88D у человека	↓↓	↓↓	↓↓↓

Пример 11.

Два исследования в условиях *in vivo* были проведены на яванских макаках. Первое исследование на яванских макаках было разработано для сравнения интервалов между введением Fc.V91K, составляющих две недели и четыре недели, чтобы определить, изменяет ли полный или частичный фармакокинетический (ФК) и фармакодинамический (ФД) спад терапевтической активности величину ответа на вторую дозу (фиг. 10А и В). В исследованиях использовали первую дозу, которая согласно прогнозам, обеспечивает сильный ответ T_{per} клеток (50 мкг/кг), и вторую дозу, чтобы изучить нижние пределы терапевтического окна (10 мкг/кг). Поскольку не было известно, была ли доза 10 мкг/кг слишком низкой, дозы вводили на 1, 3 и 5-й день, чтобы увеличить вероятность ответа. Эта схема дозирования обеспечила получение величины воздействия после 5-го дня, которая была аналогична величине, достигнутой при введении однократной дозы 50 мкг/кг подкожно (п/к), но с более низким значением C_{max} . Группа, получавшая дозу 50 мкг/кг внутривенно (в/в), также была включена для изучения потенциальных различий параметров ФД в зависимости от более высокой величины воздействия препарата в лимфатической системе по сравнению с кровеносной системой. Результаты этого исследования показали, что каждый из уровней доз индуцировал активную экспансию T_{per} клеток, которое не сопровождалось нежелательными явлениями (НЯ) или экспансией $T_{эфф}$ или НК-клеток, и что величины ответов на вторую дозу, которую вводили на 14-й или 28-й день, были эквивалентными.

Таблица 3. Дизайн первого исследования на яванских макаках

Группа	Кол-во животных	Дозирование (дни)	Доза Fc.V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 мкг/кг подкожно
2	4	1, 15	50 мкг/кг подкожно
3	4	1, 29	50 мкг/кг подкожно
4	4	1	50 мкг/кг внутривенно

Второе исследование на яванских макаках было разработано, чтобы изучить пределы терапевтического окна для Fc.V91K в дозах равных 1, 3, 100, 200 мкг/кг (п/к) и сравнить их с показателями для слабого агониста FC.N88D в дозах 3, 10, 100, 200 мкг/кг (п/к) и пролейкина® в дозах 3, 10, 30, 100 мкг/кг (п/к, 1 р./сут в течение 5 дней). Дозы пролейкина® выбирали на основании опубликованных данных исследований с участием людей и на приматах, за исключением человека (Hartemann et al., 2013, Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305; Saadoun et al., 2011, NEJM 365:2067-77; Aoyama et al., 2012, Am J Transplantation 12:2532-37), и вводили 1 р./сут в течение 5 дней, чтобы имитировать клинические исследования с использованием низких доз ИЛ-2 для лечения ВГС-индуцированного васкулита и сахарного диабета 1 типа (СД1).

Таблица 4. Дизайн второго исследования на яванских макаках

Группа	Кол-во животных	Испытываемый препарат	1-й цикл лечения	2-й цикл лечения
			День введения дозы: доза (п/к)	День введения дозы: доза (п/к)
1	4	Пролейкин®	Дни 1-5: 3 мкг/кг	Дни 14-18: 30 мкг/кг
2	4	Пролейкин®	Дни 1-5: 10 мкг/кг	Дни 14-18: 100 мкг/кг
3	4	Fc.V91K	День 1: 1 мкг/кг	День 14: 100 мкг/кг
4	4	Fc.V91K	День 1: 3 мкг/кг	День 14: 200 мкг/кг
5	4	Fc.N88D	День 1: 3 мкг/кг	День 14: 100 мкг/кг
6	4	Fc.N88D	День 1: 10 мкг/кг	День 14: 200 мкг/кг

На рис. 11A-F показаны изменения кинетики клеточных ответов, температуры тела и концентрации СРБ в сыворотке крови. Временная шкала на оси абсцисс начинается с 0-го дня, а не 1-го дня, как дня введения первой дозы.

В совокупности результаты двух исследований на яванских макаках показали, что мутеины ИЛ-2 индуцировали более значимое обогащение популяции T_{reg} клетками с более широким терапевтическим окном, чем при использовании пролейкина® (фиг. 12A и B). При использовании пролейкина® обогащение T_{reg} клетками осуществлялось одновременно с экспансией НК-клеток и эозинофилов. Безотносительно к какой-либо конкретной теории авторы полагают, что экспансия эозинофилов является известным ответом на лечение с использованием ИЛ-2 и, скорее всего, вызвано ИЛ-2-индуцированным высвобождением ИЛ-5 из CD25⁺ врожденных лимфоидных клеток. Экспансия CD4 и CD8 $T_{эфф}$ клеток имело место при дозах, которые вызывали увеличение количества T_{reg} клеток на 25-35% от общей популяции CD4 T-клеток. В отличие от этого Fc.V91K и Fc.N88D с большей селективностью индуцировали экспансию T_{reg} клеток в сравнении с НК-клетками и эозинофилами, и дозы, которые стимулировали экспансию $T_{эфф}$ клеток, были выше тех, которые вызывали обогащение T_{reg} клетками до >40% от общей популяции CD4 T-клеток.

Согласно данным из клинических исследований с использованием низких доз ИЛ-2, описанным в литературных источниках, первые развившиеся нежелательные явления (НЯ) включали гриппоподобные симптомы и лихорадку. Таким образом, в дополнение к сравнению терапевтических окон, цель данного исследования заключалась в выявлении биомаркеров, которые предшествовали лихорадке. Как показано на фиг. 12C, было обнаружено, что при использовании двух высоких доз пролейкина® уровень СРБ коррелировал с температурой тела. При самой высокой дозе Fc.V91K было обнаружено умеренное повышение температуры тела, и при введении следующей более низкой дозы наблюдали небольшое увеличение СРБ. Таким образом, уровень СРБ может быть использован для контроля ответа субъекта на лечение с использованием молекулы согласно настоящему изобретению и/или для определения верхнего предела повышения дозы у пациента.

У животных, получавших пролейкин®, также наблюдали некоторые виды токсичности, которые были либо менее выраженными, либо отсутствовали у животных, получавших Fc.V91K или Fc.N88D (фиг. 12D). Было установлено, что уровни тромбоцитов, нейтрофилов и альбумина снижались в резуль-

тате лечения пролейкином®, тогда как дозы FC.V91K или FC.N88D, которые вызывали аналогичное или более выраженное обогащение популяции T_{рег} клетками, незначительно снижали эти параметры или не оказывали на них влияния. В совокупности эти данные показывают, что терапевтическое окно для лечения пациентов с использованием FC.V91K или FC.N88D, как ожидается, будет значительно больше, чем при использовании пролейкина®.

Пример 12.

В отдельных временных точках в образцах сыворотки, полученных из первого исследования на яванских макаках, описанного в примере 11, определяли присутствие антител к лекарственному препарату (ADA) (фиг. 13). Приведены данные о соотношении сигнал/шум для ADA в образцах, в которых специфичность FC.V91K подтверждали с помощью конкурентного исследования. Временные точки, в которых проводили испытания ADA, показаны вертикальными линиями выше оси OX. В группе 1 у одного животного ADA вырабатывались по меньшей мере через пятнадцать дней после введения последней дозы, в группе 2 ни одно животное не имело положительных результатов определения ADA, и в группе 3 ADA последовательно появились у трех животных через пятнадцать или более дней после введения первой дозы. После повторного введения препарата в группах 1 и 2 в дозе 50 мкг/кг на 162-й день ни одно другое животное не имело положительного результата определения ADA через четыре недели (190-й день). У двух животных в группе 3, у которых были получены самые сильные сигналы ADA (210, 212), снизились показатели фармакодинамики, что соответствовало уменьшению величины C_{max}, наблюдаемому у этих животных после введения второй дозы. Ни одно из животных в четвертой группе (50 мкг/кг, в/в) не имело положительного результата определения ADA. ADA были специфичны в отношении как ИЛ-2, так и фрагмента Fc, что можно было бы ожидать из-за различия по восьми аминокислотным остаткам между последовательностью ИЛ-2 яванских макаков и ИЛ-2 человека (V91K, C125A). Нейтрализующую активность ADA не испытывали.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутеин интерлейкина-2 человека (IL-2), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 и которая в положении 91 содержит аминокислотный остаток лизина, причем мутеин IL-2 стимулирует регуляторные T-клетки.

2. Мутеин IL-2 человека по п.1, отличающийся тем, что содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Мутеин IL-2 человека по п.1 или 2, отличающийся тем, что содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

4. Мутеин IL-2 человека по любому из пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что аминокислота в положении 125 представляет собой аланин или цистеин.

5. Fc-слитый белок, содержащий фрагмент Fc и мутеин IL-2 человека по любому из пп.1-4.

6. Fc-слитый белок по п.5, отличающийся тем, что фрагмент Fc представляет собой фрагмент Fc IgG1 человека.

7. Fc-слитый белок по п.6, отличающийся тем, что фрагмент Fc IgG1 человека содержит замену в положении N297.

8. Fc-слитый белок по п.7, отличающийся тем, что указанная замена в положении N297 представляет собой N297G.

9. Fc-слитый белок по любому из пп.6-8, содержащий замену или делецию C-концевого лизина указанного фрагмента Fc IgG1 человека.

10. Fc-слитый белок по п.9, отличающийся тем, что указанный C-концевой лизин указанного фрагмента Fc IgG1 человека удален.

11. Fc-слитый белок по любому из пп.5-10, отличающийся тем, что фрагмент Fc и мутеин IL-2 человека соединены с помощью линкера.

12. Fc-слитый белок по п.11, отличающийся тем, что указанный линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

13. Fc-слитый белок по любому из пп.5-12, отличающийся тем, что указанный мутеин IL-2 дополнительно содержит замену в положении T3 и замену в положении S5.

14. Fc-слитый белок по п.13, отличающийся тем, что указанная замена в положении T3 представляет собой T3N или T3A.

15. Fc-слитый белок по п.14, отличающийся тем, что указанная замена в положении T3 представляет собой T3N.

16. Fc-слитый белок по п.13, отличающийся тем, что указанная замена в положении S5 представляет собой S5T.

17. Fc-слитый белок по любому из пп.5-16, отличающийся тем, что содержит димер фрагмента Fc.

18. Fc-слитый белок по п.17, отличающийся тем, что содержит димер мутеина IL-2.

19. Fc-слитый белок по п.17, отличающийся тем, что содержит мономер мутеина IL-2.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутеин IL-2 человека по любому из пп.1-4.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-слитый белок по любому из пп.5-19.
22. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.20 или 21, функционально связанную с промотором.
23. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п.20 или 21.
24. Клетка-хозяин по п.23, в которой нуклеиновая кислота функционально связана с промотором.
25. Клетка-хозяин по п.23 или 24, представляющая собой прокариотическую клетку.
26. Клетка-хозяин по п.25, представляющая собой клетку *E. coli*.
27. Клетка-хозяин по п.23 или 24, представляющая собой эукариотическую клетку.
28. Клетка-хозяин по п.27, представляющая собой клетку млекопитающего.
29. Клетка-хозяин по п.28, представляющая собой клетку линии СНО.
30. Способ получения мутеина IL-2 человека по любому из пп.1-4, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.23-29 в условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты по п.20, и сбор мутеина IL-2 человека из клеточной культуры.
31. Способ получения Fc-слитого белка по любому из пп.5-19, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.23-29 в условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты по п.21, и сбор Fc-слитого белка из клеточной культуры.
32. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству нерегуляторных T-клеток в популяции T-клеток, включающий приведение популяции T-клеток в контакт с эффективным количеством мутеина IL-2 человека по любому из пп.1-4.
33. Способ по п.32, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток.
34. Способ по п.33, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.
35. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству нерегуляторных T-клеток в популяции T-клеток, включающий приведение популяции T-клеток в контакт с эффективным количеством Fc-слитого белка по любому из пп.5-19.
36. Способ по п.35, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток.
37. Способ по п.36, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.
38. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству нерегуляторных T-клеток в периферической крови субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мутеина IL-2 человека по любому из пп.1-4.
39. Способ по п.38, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток.
40. Способ по п.39, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.
41. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству нерегуляторных T-клеток в периферической крови субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества Fc-слитого белка по любому из пп.5-19.
42. Способ по п.41, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток.
43. Способ по п.42, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3+ FoxP3- клеток увеличивается по меньшей мере на 50%.
44. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) в периферической крови субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мутеина IL-2 человека по любому из пп.1-4.
45. Способ по п.44, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19-лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16.
46. Способ по п.45, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19-лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается по меньшей мере на 50%.
47. Способ увеличения отношения количества регуляторных T-клеток (T_{per}) к количеству натуральных клеток-киллеров (NK) в периферической крови субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества Fc-слитого белка по любому из пп.5-19.
48. Способ по п.47, при котором увеличивается отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19-лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16.
49. Способ по п.48, при котором отношение количества CD3+ FoxP3+ клеток к количеству CD3-CD19-лимфоцитов, экспрессирующих CD56 и/или CD16, увеличивается по меньшей мере на 50%.
50. Способ лечения субъекта, имеющего воспалительное или аутоиммунное заболевание или состояние, включающий введение терапевтически эффективного количества мутеина IL-2 по любому из пп.1-4.
51. Способ лечения субъекта, имеющего воспалительное или аутоиммунное заболевание или со-

стояние, включающий введение терапевтически эффективного количества Fc-слиятого белка по любому из пп.5-19.

52. Способ лечения по п.50 или 51, вызывающий уменьшение по меньшей мере одного симптома указанного заболевания.

53. Способ по п.52, при котором увеличивается отношение количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта.

54. Способ по п.52, при котором остается неизменным отношение количества регуляторных Т-клеток ($T_{\text{рег}}$) к количеству нерегуляторных Т-клеток в периферической крови субъекта.

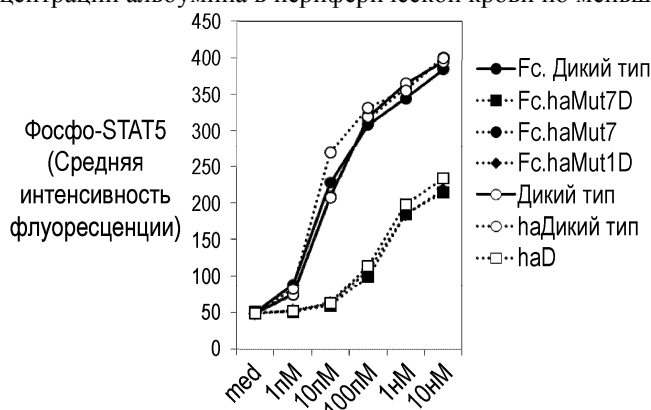
55. Способ по любому из пп.50-54, отличающийся тем, что указанное воспалительное или аутоиммунное заболевание или состояние представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом С, сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, спонтанный выкидыш, атопические заболевания или воспалительные заболевания кишечника.

56. Способ контроля лечения субъекта мутеином интерлейкина-2 (IL-2) человека по п.1 или Fc-слиятым белком по п.5, включающий детектирование у указанного субъекта одного из следующих изменений:

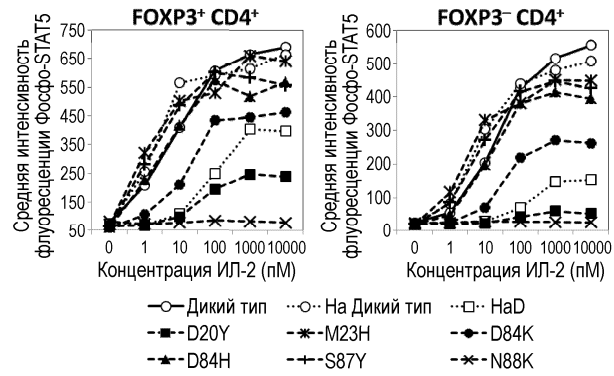
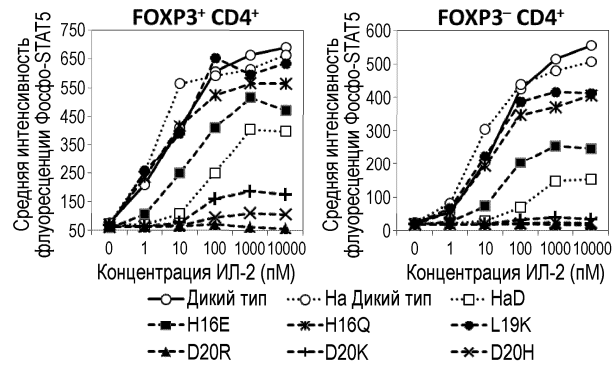
- повышение температуры тела,
 - увеличение концентрации С-реактивного белка в периферической крови,
 - снижение количества тромбоцитов в периферической крови,
 - снижение количества нейтрофилов в периферической крови или
 - уменьшение концентрации альбумина в периферической крови,
- причем при детектировании указанного изменения указанное лечение прекращают, приостанавливают, уменьшают частоту дозирования или снижают количество вводимого препарата.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что указанное изменение представляет собой:

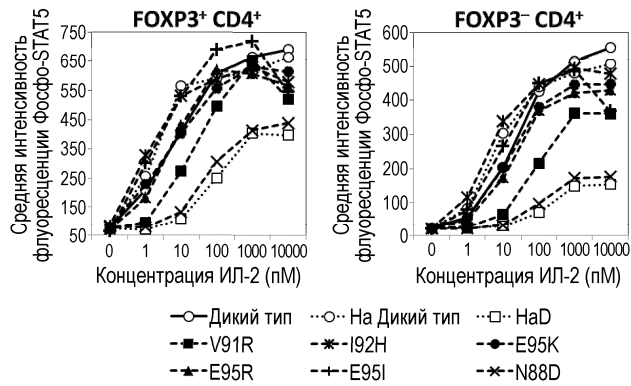
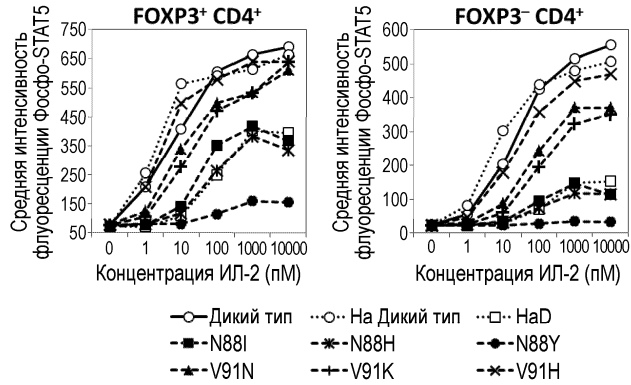
- повышение температуры тела по меньшей мере на $0,5^{\circ}\text{C}$,
- увеличение концентрации С-реактивного белка в периферической крови по меньшей мере на $0,2$ мг/мл,
- снижение количества тромбоцитов в периферической крови по меньшей мере в $0,8$ раз,
- снижение количества нейтрофилов в периферической крови по меньшей мере в $0,8$ раз или
- уменьшение концентрации альбумина в периферической крови по меньшей мере в $0,4$ раза.



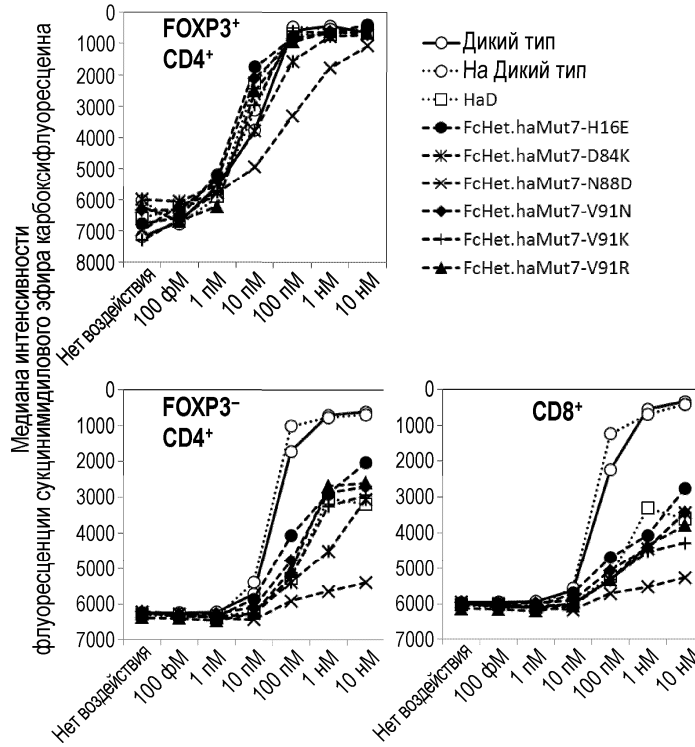
Фиг. 1



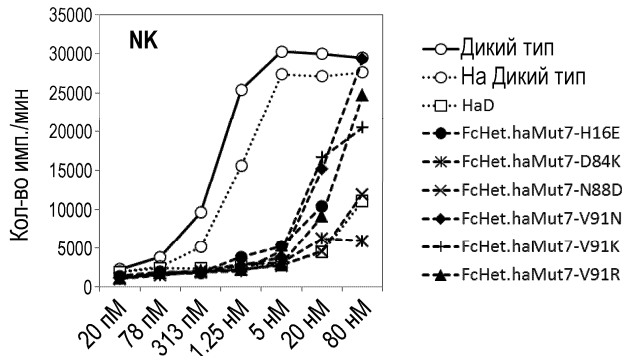
Фиг. 2А



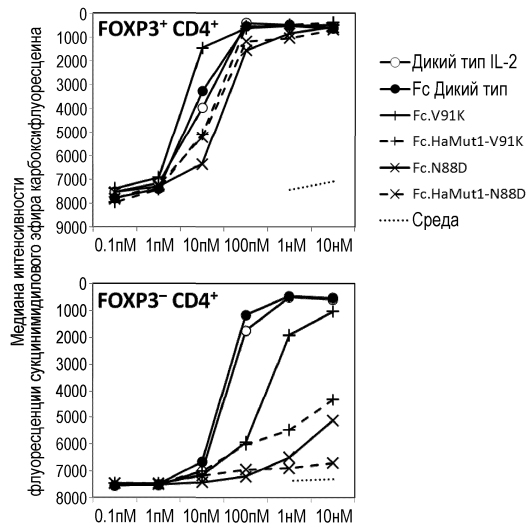
Фиг. 2В



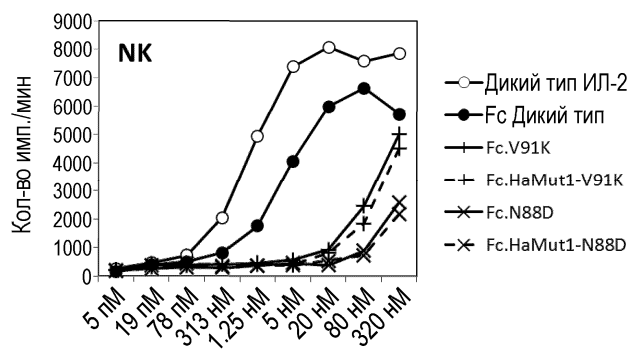
Фиг. 3



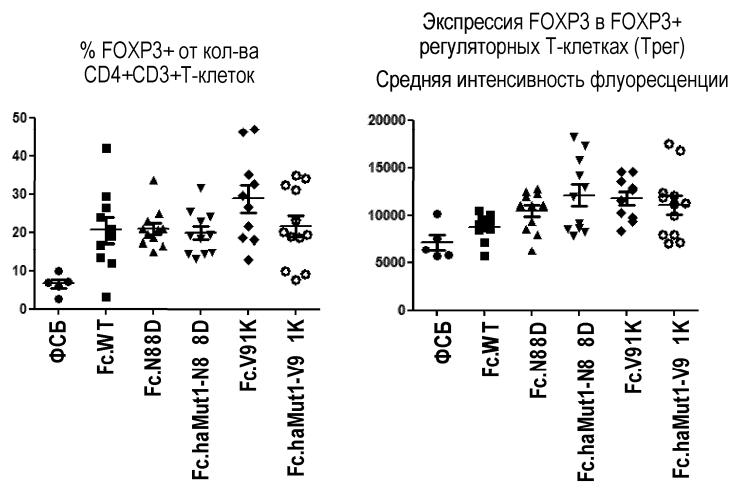
Фиг. 4



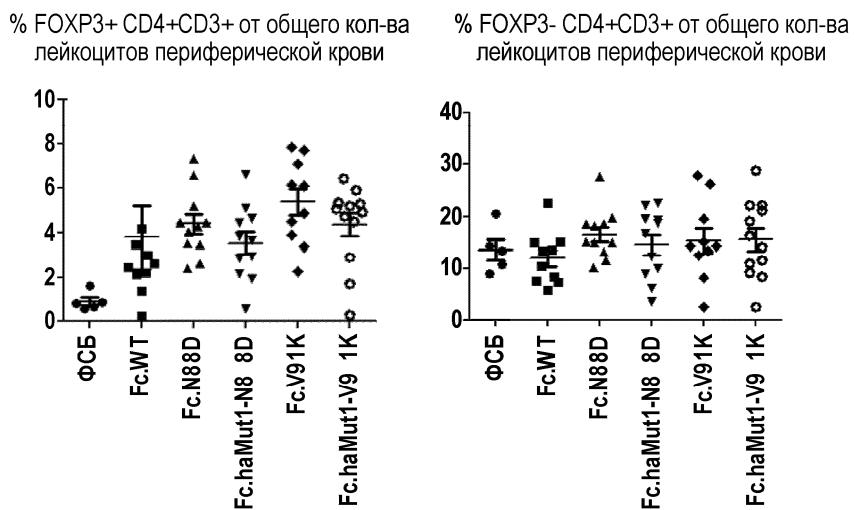
Фиг. 5



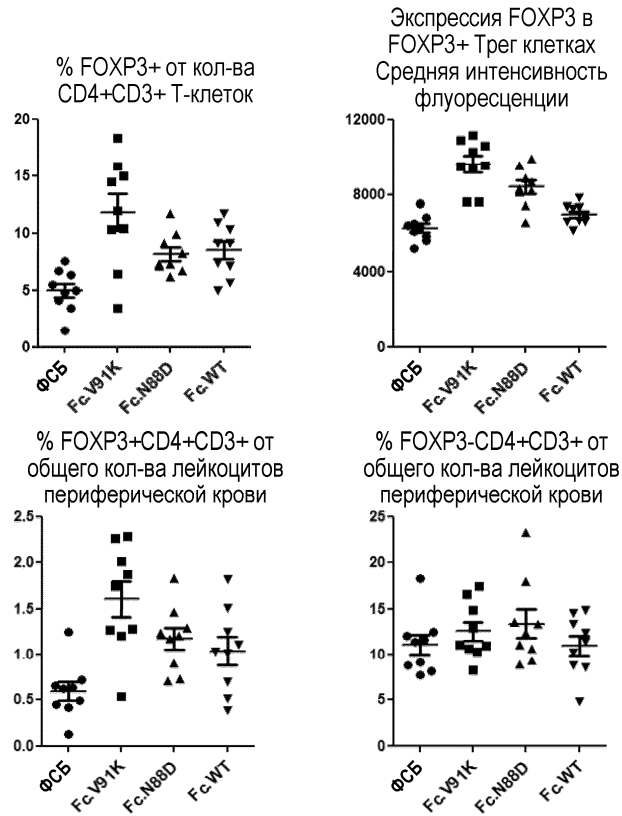
Фиг. 6



Фиг. 7А

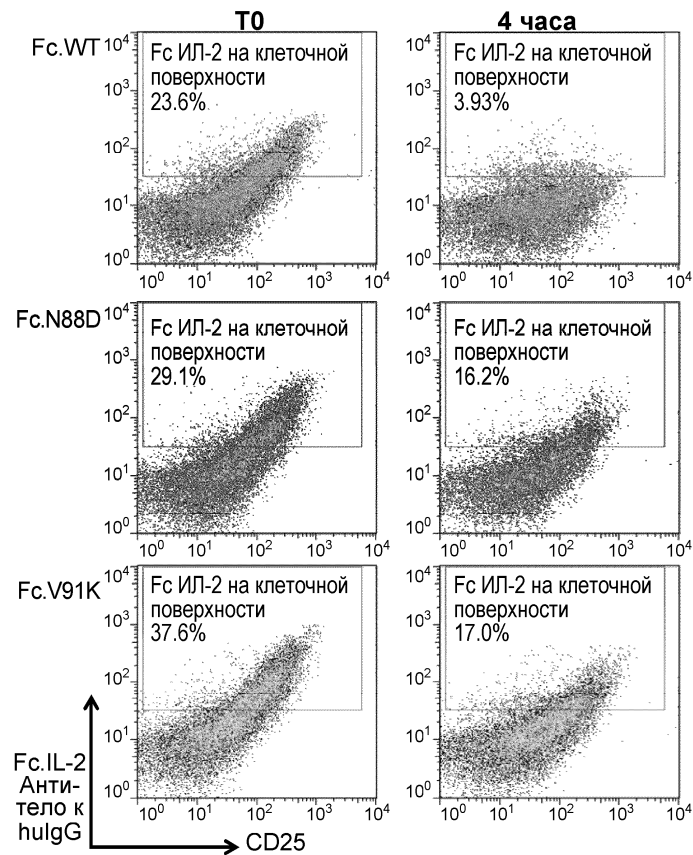


Фиг. 7В

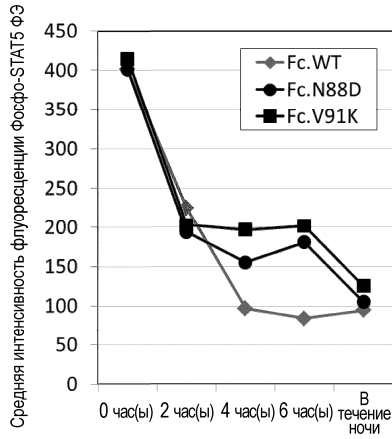


Фиг. 8

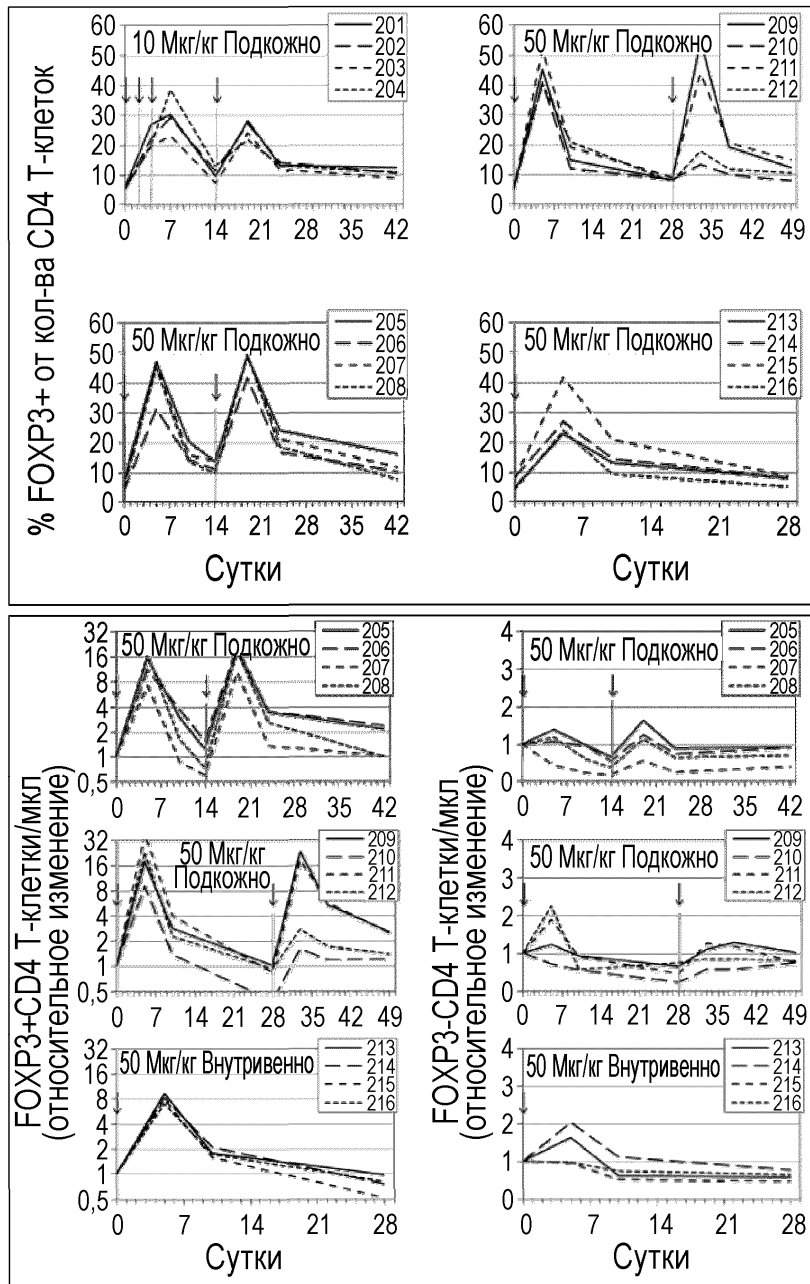
Селекция CD3+CD4+



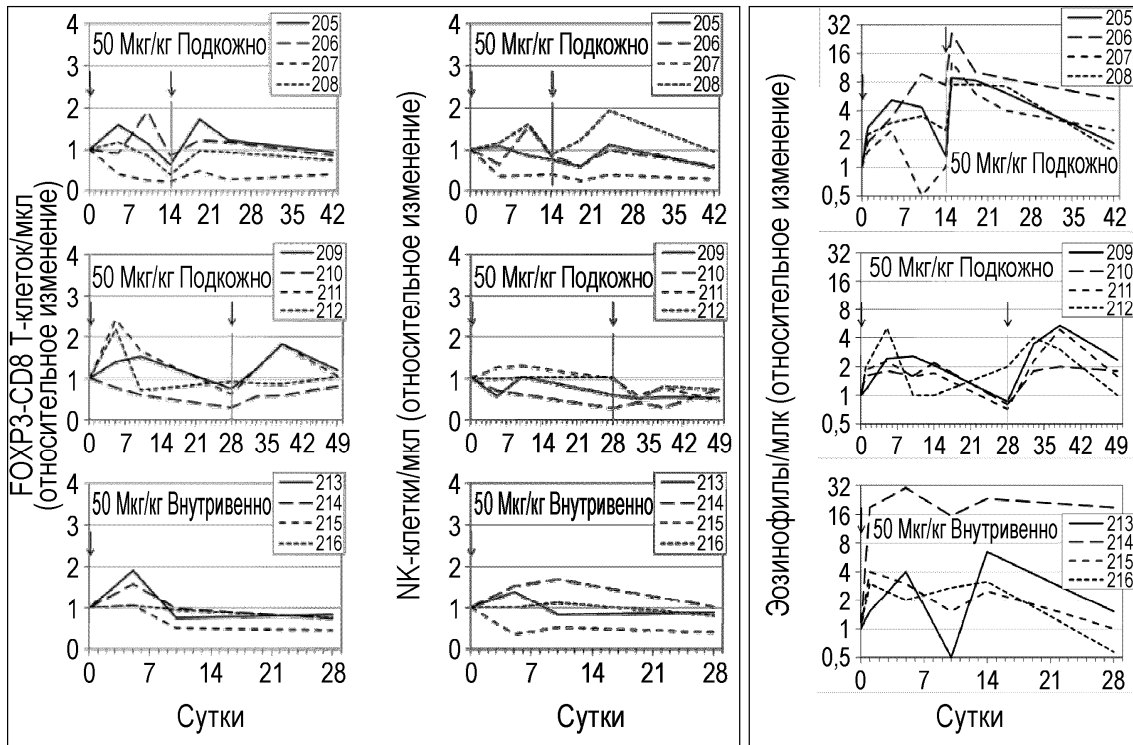
Фиг. 9А



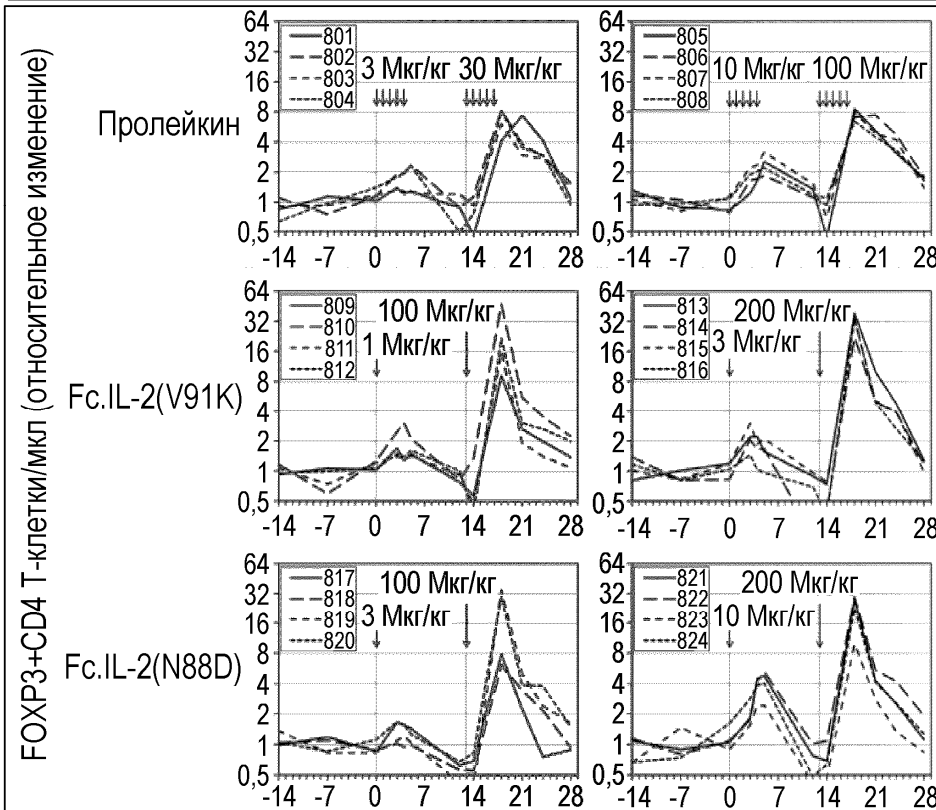
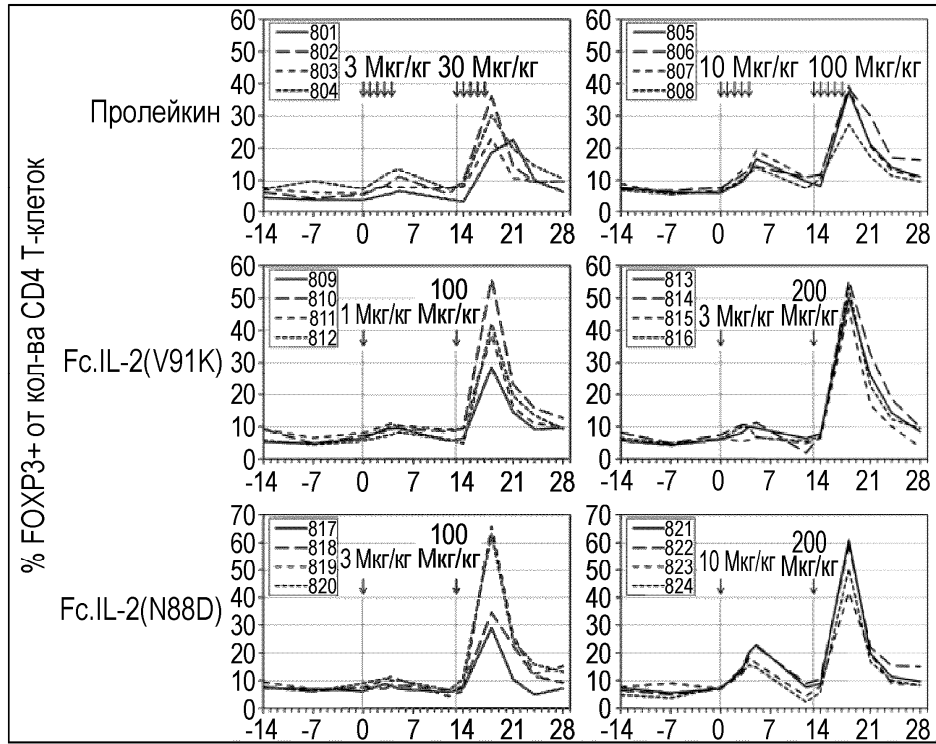
Фиг. 9В



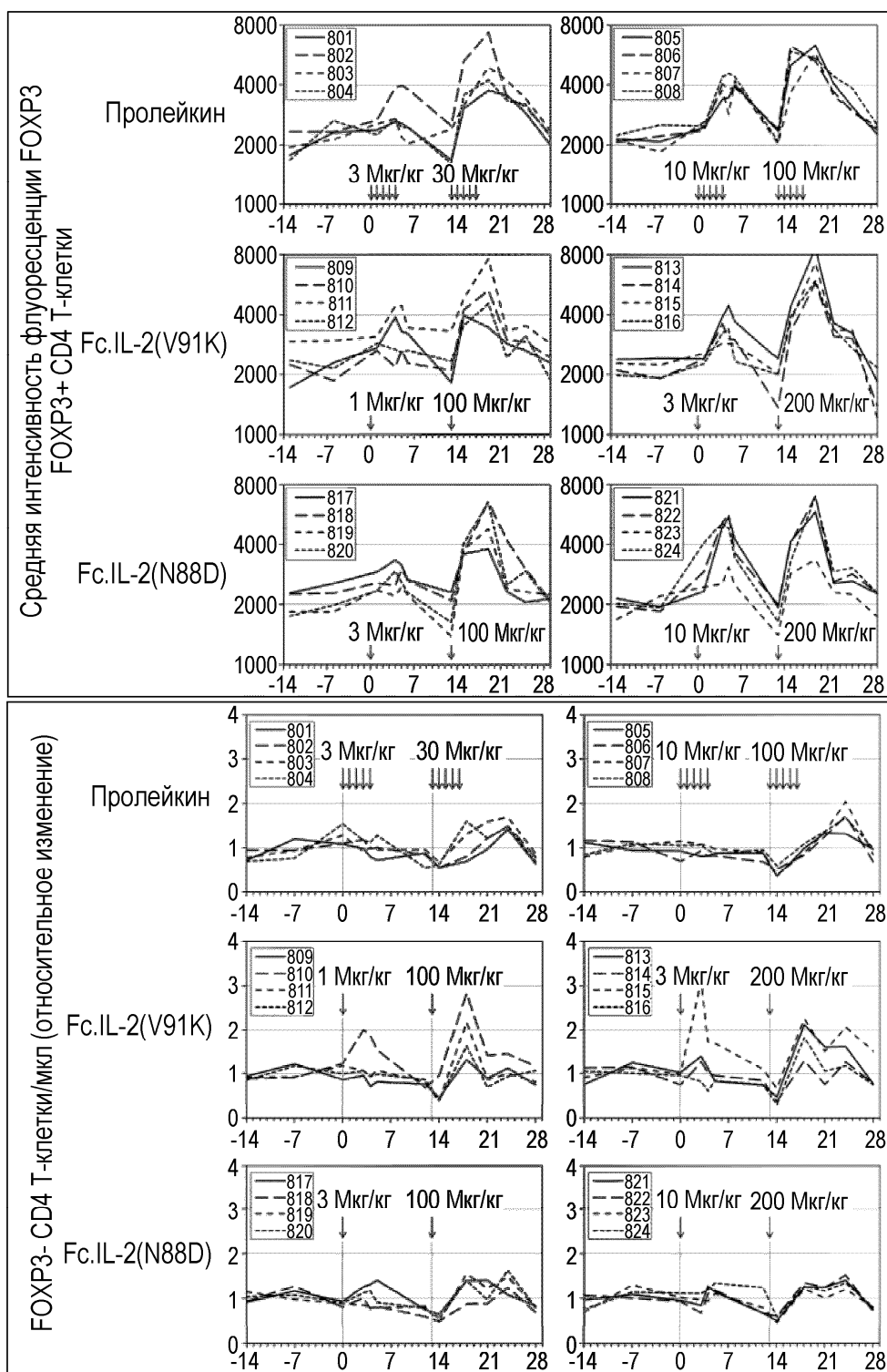
Фиг. 10А

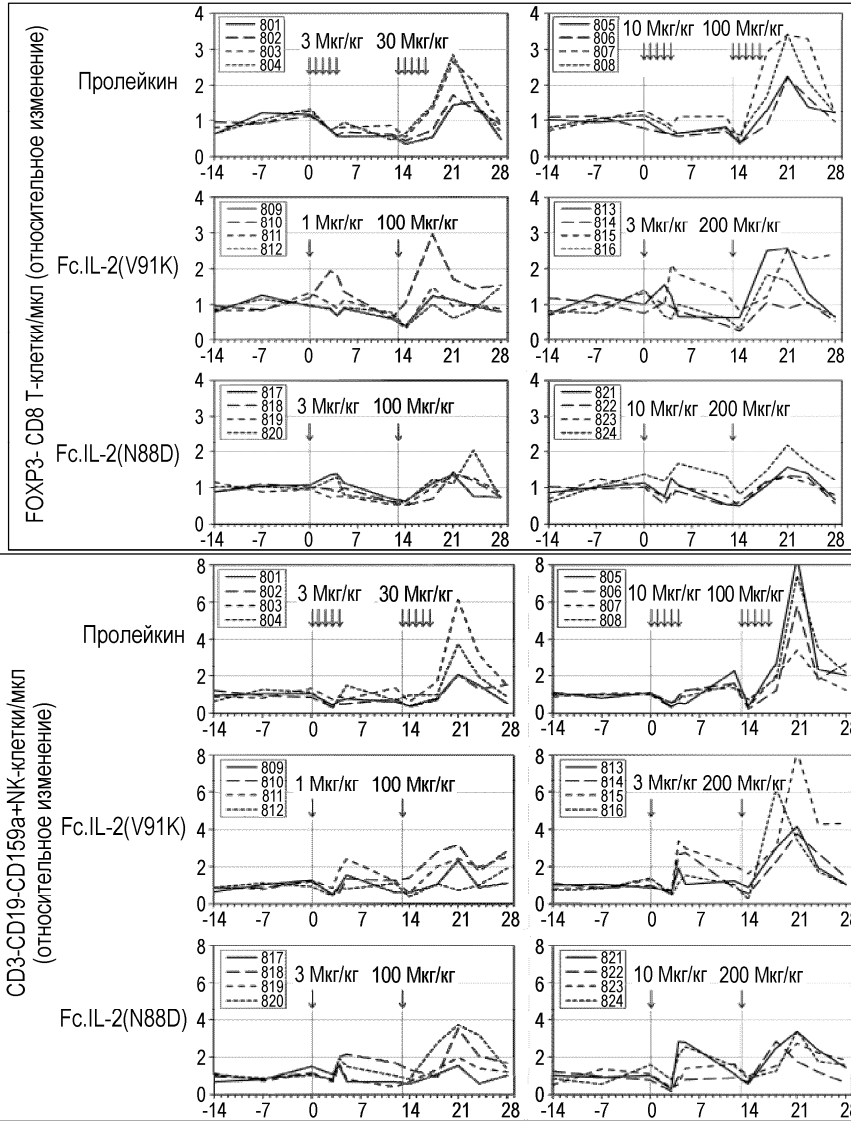


Фиг. 10В

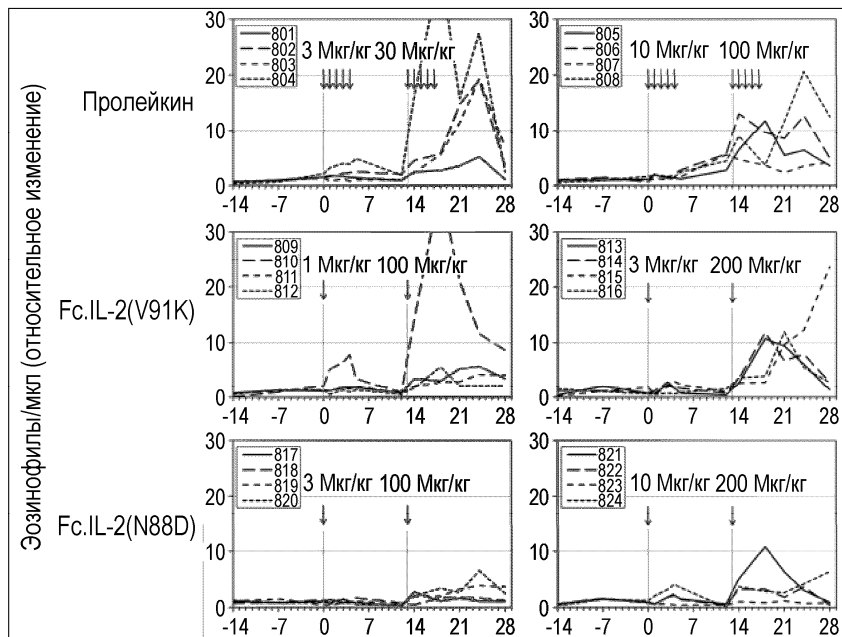


Фиг. 11А

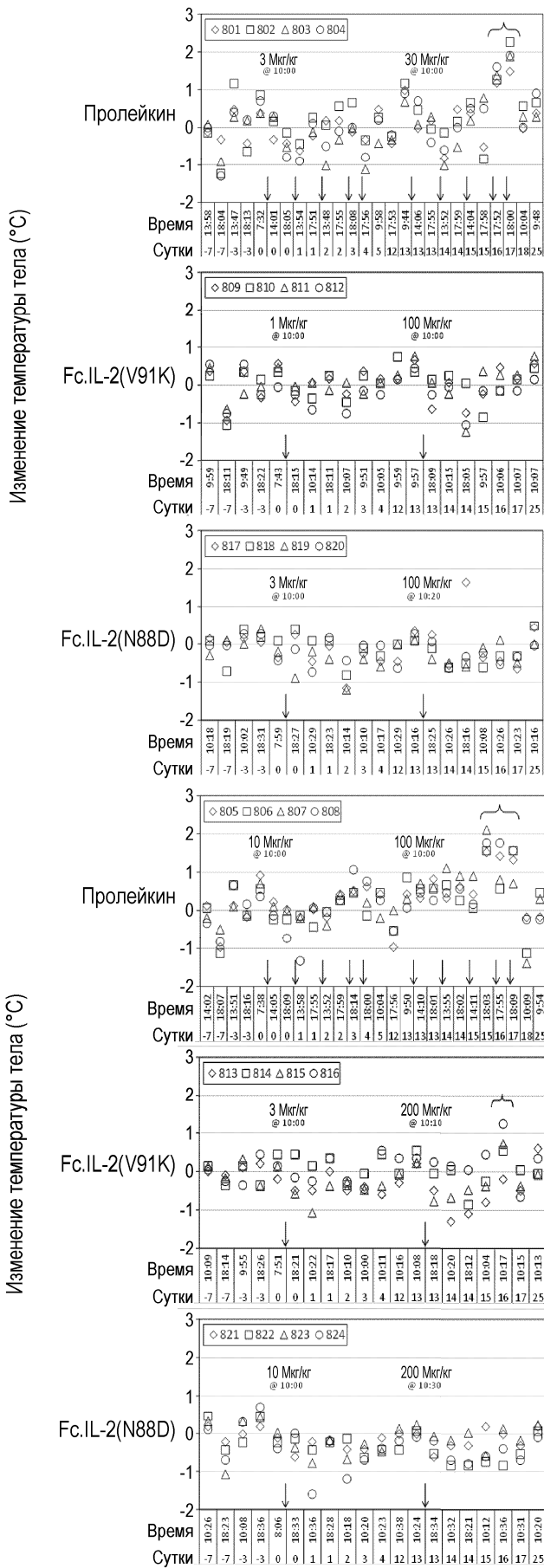




Фиг. 11С



Фиг. 11D



Фиг. 11Е

