

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034925**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.07

(21) Номер заявки
201790371

(22) Дата подачи заявки
2015.08.10

(51) Int. Cl. **A61K 38/20** (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ИЛ-2, КОТОРЫЕ СЕЛЕКТИВНО АКТИВИРУЮТ РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **62/070,016**

(32) **2014.08.11**

(33) **US**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/US2015/044462**

(87) **WO 2016/025385 2016.02.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЕЛИНИЯ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Грив Джеффри (US)

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

(56) WO-A1-2014023752

US-A-5206344

US-A1-20110020266

STRAUSBERG, RL et al. Generation And Initial Analysis Of More Than 15,000 Full-Length Human And Mouse cDNA Sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 24 December 2002, Vol. 99, No. 26; pages 16899-16903; DOI: 10.1073/pnas.242603899.

GUJAR, SA et al. Characterization Of Bioactive Recombinant Woodchuck Interleukin-2 Amplified By RLM-RACE And Produced In Eukaryotic Expression System. Vet Immunol Immunopathol. 15 August 2006, Vol. 112, No. 34; pages 183-198; DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.02.011.

(57) Изобретение предоставляет новый белок ИЛ-2 с селективной агонистической активностью по отношению к регуляторным Т-клеткам и с дополнительной аминокислотной заменой, которая обеспечивает возможность для химической конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ), который удлиняет период полувыведения из кровотока по сравнению с только одним ИЛ-2 селективным агонистом. Предпочтительным вариантом ИЛ-2 селективного агониста является ИЛ2/N88R/C125S/D109C.

B1

034925

034925 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет заявки на патент США № 62/070,016, поданной 11 августа 2014, содержание которой включено в настоящее описание в виде ссылки.

Уровень техники

Иммунная система должна быть в состоянии отличать "своих" от "чужих". При нарушении способности отличать "своих" от "чужих" иммунная система разрушает клетки и ткани организма, приводя в результате к развитию аутоиммунных заболеваний. Регуляторные Т-клетки активно подавляют активацию иммунной системы и предотвращают патологическую самореактивность и последующее развитие аутоиммунного заболевания. Разработка лекарственных средств и способов для избирательной активации регуляторных Т-клеток для лечения аутоиммунного заболевания является предметом интенсивных исследований и до разработки настоящего изобретения в основном было безуспешными.

Регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой класс CD4+CD25+ Т-клеток, которые подавляют активность других иммуноцитов. Treg играют центральную роль в гомеостазе иммунной системы, а также в поддержании толерантности к аутоантигенам и в модуляции иммунного ответа на чужеродные антигены. Было показано, что для множества аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в том числе диабета 1 типа (T1D), системной красной волчанки (СКВ) и заболевания "трансплантат против хозяина" (ЗТПХ), характерен дефицит количества Treg клеток или функции Treg. Следовательно, имеется большой интерес к разработке методов лечения, которые увеличивают количество и/или усиливают функцию Treg клеток.

Одним из изучаемых подходов к лечению аутоиммунных заболеваний является трансплантация аутологичных, размножающихся *ex vivo* Treg клеток (Tang Q., et al., 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3:1-15). Хотя этот подход оказался перспективным при лечении заболеваний на моделях животных и в некоторых ранних клинических испытаниях на людях, он требует персонализированного подхода к лечению пациента его собственными Т-клетками, является инвазивным и технически сложным. Другой подход заключается в лечении низкими дозами интерлейкина-2 (IL-2). Для Treg клеток характерны высокие уровни конститутивной экспрессии высокоаффинного рецептора IL-2, IL2R $\alpha\beta\gamma$, который состоит из субъединиц IL2RA (CD25), IL2RB (CD122) и IL2RG (CD132), при этом была показана зависимость роста Treg клеток от IL-2 (Malek T.R., et al., 2010, Immunity, 33:153-65). Клинические испытания лечения пациентов, страдающих хроническим ЗТПХ (Koreth J., et al., 2011, N Engl J Med., 365:2055-66) и HCV-ассоциированным аутоиммунным васкулитом (Saadoun D., et al., 2011, N Engl J Med., 365:2067-77) низкими дозами IL-2 показали повышенные уровни Treg и клиническую эффективность. Были начаты новые клинические испытания по изучению эффективности IL-2 в отношении множества других аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Пролейкин (продаваемый компанией Prometheus Laboratories, San Diego, CA), являющийся рекомбинантной формой IL-2, используемого в этих испытаниях, ассоциирован с высокой токсичностью. Пролейкин одобрен для лечения метастатической меланомы и метастатического рака почек, но его побочные эффекты являются настолько серьезными, что применение пролейкина рекомендуется только в условиях стационара с доступом к интенсивной терапии ([Web адрес: www.proleukm.com/assets/pdf/proleukin.pdf](http://www.proleukm.com/assets/pdf/proleukin.pdf)). До получения последних характеристик Treg клеток, IL-2 рассматривался в качестве стимулятора иммунной системы, активизирующего Т-клетки и другие клетки иммунной системы для уничтожения раковых клеток. В клинических испытаниях IL-2 при аутоиммунных заболеваниях использовали более низкие дозы IL-2 для нацеливания на Treg клетки, поскольку Treg клетки отвечали на более низкие концентрации IL-2, чем многие другие типы клеток иммунной системы, что связано с их экспрессией IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol. 15:283-94). Тем не менее, даже эти более низкие дозы создавали проблемы, связанные с безопасностью и переносимостью, к тому же используемые методы лечения включали ежедневные подкожные инъекции, вводимые либо постоянно, либо в виде интермиттирующих 5-дневных курсов лечения. Таким образом, существует потребность в терапии аутоиммунных заболеваний, которая стимулирует увеличение количества и усиления функции Treg клеток, более специфично нацелена на Treg клетки по сравнению с IL-2, которая является более безопасной и более переносимой и позволяет снизить частоту введения препаратов.

Один из подходов к улучшению терапевтического индекса метода лечения на основе IL-2 заключается в использовании вариантов IL-2, которые являются селективными по отношению к Treg клеткам по сравнению с другими иммуноцитами. IL-2 рецепторы экспрессируются во множестве различных типов иммуноцитов, в том числе в Т-клетках, НК-клетках, эозинофилах и моноцитах, и такой широкий характер экспрессии, вероятно, вносит свой вклад в их плеiotропное действие на иммунную систему и высокую системную токсичность. Рецептор IL-2 существует в трех формах: (1) рецептор с низкой аффинностью, IL2RA, который не является сигналом; (2) рецептор с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$), состоящий из IL2RB и IL2RG, который широко экспрессируется в обычных Т-клетках (Tcon), НК-клетках, эозинофилах и моноцитах; и (3) рецептор с высокой аффинностью (IL2R $\alpha\beta\gamma$), состоящий из IL2RA, IL2RB и IL2RG, который экспрессируется транзистентно в активированных Т-клетках и конститутивно в Treg клетках. Были разработаны варианты IL-2, которые являются селективными для IL2R $\alpha\beta\gamma$ по отно-

шению к IL2R $\beta\gamma$ (Shanafelt A.B., et al., 2000, Nat Biotechnol.18:1197-202; Cassell D.J., et al., 2002, Curr PharmDes., 8:2171-83). Эти варианты имеют аминокислотные замены, которые снижают их аффинность к IL2RB. Так как IL-2 имеет нерегистрируемую аффинность к IL2RG, эти варианты, следовательно, имеют сниженную аффинность к рецепторному комплексу IL2R $\beta\gamma$ и сниженную способностью активировать IL2R $\beta\gamma$ -экспрессирующие клетки, но сохраняют способность связывать IL2RA и способность связывать и активировать рецепторный комплекс IL2R $\alpha\beta\gamma$. Основываясь на гипотезе, что IL2R $\beta\gamma$ -экспрессирующие НК-клетки являются одной из основных причин токсичности, один из этих вариантов, IL2/N88R (Bay 50-4798), был клинически протестирован как версия с низким уровнем токсичности IL-2 в качестве стимулятора иммунной системы. Было показано что Bay 50-4798 избирательно стимулируют пролиферацию активированных Т-клеток относительно НК-клеток, и это было проверено в клинических испытаниях I/II фазы на онкологических пациентах (Margolin K., et al., 2007, Clin Cancer Res., 13:3312-9) и пациентах с ВИЧ (Davey R.T., et al., 2008, J Interferon Cytokine Res., 28:89-100). Эти клинические испытания показали, что Bay 50-4798 оказался значительно более безопасным и переносимым, чем пролейкин, а также то, что он повышал уровень CD4+CD25+ Т-клеток, популяции клеток, обогащенной Treg клетками. После этих испытаний в результате исследований в данной области была более полно определена природа Treg клеток и было показано, что Treg клетки избирательно экспрессируют IL2R $\alpha\beta\gamma$ (см. Malek, T.R., et al, 2010, Immunity, 33:153-65). На основе этого нового исследования теперь можно понять, что IL2R $\alpha\beta\gamma$ селективные агонисты должны быть селективными по отношению к Treg клеткам.

Второй подход к улучшению терапевтического индекса методов лечения на основе IL-2 заключается в оптимизации фармакокинетики молекулы для максимального стимулирования Treg клеток. Ранние исследования действия IL-2 показали, что *in vitro* стимуляция пролиферации человеческих Т-клеток с помощью IL2 требует по меньшей мере 5-6-часового воздействия эффективных концентраций IL-2 (Cantrell, D.A., et al., 1984, Science, 224: 1312-1316). При введении пациентам (людям) IL-2 имеет очень короткий период полувыведения из плазмы, составляющий 85 мин для внутривенного введения и 3,3 ч для подкожного введения (Kirchmer G.L. et al., 1998, Br J Pharmacol Clin 46: 5-10). Из-за короткого периода полувыведения поддержание циркуляции IL-2 на уровне или выше уровня, необходимого для стимуляции пролиферации Т-клеток в течение необходимого времени, требует больших доз, которые приводят к пиковым уровням IL-2, значительно превышающим EC50 для Treg клеток, или требует частого введения (фиг. 1). Эти высокие пиковые уровни IL-2 могут активировать рецепторы IL2R $\beta\gamma$ и приводить к другим непредвиденным или негативным эффектам. Аналог IL-2 с более длительным периодом полувыведения из кровотока, чем у IL-2, может обеспечивать целевую концентрацию лекарственного вещества в течение определенного периода времени при более низкой дозе, чем IL-2, а также с более низкими пиковыми уровнями. Поэтому для эффективной стимуляции Treg клеток потребуются либо более низкие дозы такого аналога IL-2, либо менее частое его введение по сравнению с IL-2. Менее частое подкожное введение IL-2 лекарственного вещества также будет более переносимым пациентами. Терапевтическое средство с такими характеристиками переведет клинически к улучшенной фармакологической эффективности, пониженной токсичности, а также улучшению соблюдения пациентами режима лечения.

Одним из подходов к увеличению периода полувыведения терапевтических белков является конъюгация терапевтического белка с неиммуногенным водорастворимым полимером, например полиэтиленгликолем (ПЭГ). Химическая конъюгация белка с молекулой ПЭГ (пегилирование) увеличивает период полувыведения из кровотока за счет увеличения эффективного гидродинамического радиуса белка, тем самым снижая скорость, с которой белковый конъюгат отфильтровывается из крови через почки. IL-2 и IL-2 селективные агонисты представляют собой относительно небольшие белки с массой примерно 15000 дальтон (15 кДа) с высокой скоростью почечного клиренса. Период полувыведения молекул ПЭГ из кровотока возрастает пропорционально его молекулярной массе (Yamaoka T., et al., 1994 J Pharm Sci 83: 601-6).

Существует целый ряд факторов, влияющих на успешное получение и производство пегилированных терапевтических белков. Во-первых, поскольку пегилированные белки получают путем химической конъюгации молекулы ПЭГ и белка, из-за дополнительных производственных этапов, связанных с пегилированием, важно получение белка эффективным способом. Во-вторых, ПЭГ-фрагмент должен быть эффективно конъюгирован с белком посредством определенного аминокислотного остатка, что приводит к получению однородного продукта с высоким выходом. В-третьих, сайт пегилирования в белке должен быть выбран таким образом, чтобы это оказывало минимальное влияние на терапевтическую активность белка. Влияние на терапевтическую активность белка может быть связано с конъюгацией ПЭГ с активным участком белка или может быть следствием создаваемым ПЭГ стерически затрудненным доступом к активному центру. В качестве примера можно указать известную форму пегилированного IL-2, в которой молекулы ПЭГ конъюгированы с первичными аминами IL-2, в результате чего получается гетерогенная смесь видов белка, содержащих от одного до четырех ПЭГ полимеров на молекулу IL-2 (Katre N.V. et al., 1987 Proc. Natl Acad Sci U.S.A. 84:1487-91; Knauf, M.J., et al., 1988 J Biol Chem 15; 263:15064-701988), которые обладают в 4-6 раза меньшей биологической активностью по сравнению с IL-2 (Chen, S.A., 2000 J Pharmacol Exp Ther. 293:248-59). Поскольку IL-2 селективный агонист должен связываться и

активировать комплекс из трех субъединиц рецептора на Treg клетках, соответствующий сайт конъюгации у IL-2 должен быть выбран тщательно для обеспечения оптимальной биологической активности.

Настоящее изобретение относится к вариантам IL-2 с единичными аминокислотными заменами в определенных положениях в последовательности IL-2, которые обеспечивают стабильную и специфическую химическую конъюгацию молекул ПЭГ, сохраняя при этом способность IL-2-ПЭГ конъюгата активировать Treg клетки. Указанные положения аминокислот, определенные в качестве сайтов конъюгации ПЭГ, выбирают таким образом, чтобы IL-2-ПЭГ конъюгат в результате конъюгации молекулы ПЭГ и варианта IL-2 имел минимально ослабленную способность связываться и активировать рецептор IL2R $\alpha\beta\gamma$. Настоящее изобретение относится также к вариантам IL-2 с вышеупомянутыми сайтами конъюгации ПЭГ в вариантах IL-2, которые являются селективными в отношении рецептора IL2R $\alpha\beta\gamma$ и, следовательно, имеют высокую селективность по отношению к Treg клеткам.

Разработаны химически активированные ПЭГ с рядом различных химически активных групп для конъюгации с белками, что обеспечивает возможность для конъюгации с аминокислотными остатками, содержащими первичные амины, или тиольными группами. Конечно, тиольные группы, присутствующие исключительно на остатках цистеина, обеспечивают возможность для наиболее селективной конъюгации ПЭГ с белками, при этом ПЭГ с малеинимидными или йодацетамидными реакционными группами реагирует с тиольными группами свободных цистеинов с очень высокой селективностью. Большинство цистеиновых остатков внеклеточных белков участвуют в образовании дисульфидных связей, которые стабилизируют конформацию белка, при этом небольшое количество свободных (непарных) остатков цистеина обычно скрыты во внутренней области белков (Petersen M.T., et al., 1999 Protein Eng. 1999, 12:535-48). Для процесса конъюгации ПЭГ со свободными цистеиновыми остатками в белке требуется либо наличие естественных свободных цистеиновых остатков, либо введение новых свободных цистеиновых остатков. Искусственное введение нового свободного цистеина в белок связано с риском того, что введенный новый цистеин может образовывать неприемлемые внутрицепочечные дисульфидные связи с другими остатками цистеина, таким образом приводя к неправильной свертке белка, или может образовывать межцепочечные дисульфидные связи с другими молекулами, тем самым вызывая агрегацию белка. Варианты IL-2 с мутированными цистеиновыми остатками могут проявлять, демонстрировать существенно более низкую активность из-за наличия неспаренных дисульфидных связей (Wang A., et al., 1984 Science 224:1431-3). Основное внимание в описании настоящего изобретения уделяется разработке новых, содержащих свободные цистеиновые остатки вариантных белков IL-2, которые будут совместимы с правильной сверткой белка, что обеспечивает возможность для сайт-специфической конъюгации с ПЭГ, реагирующим с тиольной группой, с получением IL-2-ПЭГ конъюгатов, которые сохраняют способность связываться и активировать L2R $\alpha\beta\gamma$ на Treg клетках.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию взаимосвязи между периодом полувыведения из кровотока, пиковым уровнем лекарственного вещества, биологически эффективной концентрацией и временем, необходимым для стимуляции пролиферации Treg клеток после однократной дозы IL-2 или IL-2-ПЭГ белка с увеличенным периодом полувыведения. Пунктирной линией показан уровень IL-2 в крови в зависимости от времени после подкожной инъекции, а сплошная линия показывает уровень ПЭГ-IL-2 конъюгата в крови в зависимости от времени. Горизонтальные пунктирные линии указывают концентрации (EC50), необходимые для активации клеток, экспрессирующих IL2R $\alpha\beta\gamma$ и IL2R $\beta\gamma$ соответственно. Двойная стрелка указывает на продолжительность воздействия (5-6 ч) IL-2 при EC50, необходимого для стимуляции пролиферации клеток.

Фиг. 2 представляет стратегию определения сайтов присоединения для ПЭГ или других неиммунногенных полимеров. IL-2 изображен в комплексе с тремя субъединицами рецептора IL-2 с высокой аффинностью. Аминокислотные остатки на поверхности IL-2, открытые воздействию растворителя и не взаимодействующие с субъединицами рецептора IL-2, являются кандидатами на аминокислотные остатки для присоединения ПЭГ полимеров (обведены).

На фиг. 3 показана трехмерная кристаллическая структура комплекса IL-2/TL-2R $\alpha\beta\gamma$ с указанием аминокислотных боковых цепей остатков, которые удовлетворяют критериям для присоединения ПЭГ или других неиммунногенных полимеров. Указанные остатки представляют собой T3C, S6C, K8C, K48C, K49C, T51C, K97C, G98C, F103C, M104C, E106C и D109C. IL-2 показан на первом плане в центре, IL-2RB слева, IL-2RG справа и IL-2RA сверху на заднем плане. Ориентация рецепторного комплекса относительно клеточной мембраны обозначена стрелкой.

На фиг. 4 показана селективная активация pSTAT5 с помощью IL2/N88R/C125S/D109C и пегилированного IL2/N88R/C125S/D109C в субпопуляции T-клеток, обогащенной Treg. Человеческие PBMC инкубировали с образцами, указанными в верхней части каждой диаграммы, в течение 10 мин при 37°C, фиксировали, пермеабилizировали, окрашивали антителами, а затем подвергали проточной цитометрии. Диаграммы FACS представлены в псевдоцветах. Показаны клетки, гейтированные как CD4+, при этом клетки были дополнительно гейтированы, как показано в каждом из 4 квадрантов. Числа в каждом квадранте указывают на процент CD4+ клеток в каждом гейте. Клетки в верхних квадрантах представляют

наибольшие 1-2% CD25-экспрессирующих клеток, популяция, обогащенная Treg клетками. Необработанные клетки инкубировали только в средах, добавляли IL-2 в концентрации 4×10^{-9} М, добавляли образцы IL2/N88R/C125S/D109C и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ с концентрацией 4×10^{-8} М, и ПЭГ-обработанные образцы инкубировали в контрольной реакционной смеси для пегилирования, содержащей такое же количество PEG, как и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ. IL-2 стимулирует STAT5 фосфорилирование в большом количестве как в CD25^{low/-}, так и в CD25^{high} клетках. И IL2/N88R/C125S/D109C, и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ имеют качественно и количественно различный эффект, стимулируя STAT5 фосфорилирование прежде всего в менее 1% клеток и в основном в клетках CD25^{high}.

На фиг. 5 показана селективность белков IL-2 и IL-2 селективного агониста на 7 различных типах иммунных клеток в человеческих PBMC. Как IL2/N88R/C125S/D109C, так и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ обладают высокой селективностью по отношению к Treg по сравнению с IL-2 и демонстрируют более высокую, чем IL-2, селективность ко множеству типов клеток.

Сущность изобретения

Изобретение, описанное в настоящей заявке, предоставляет новый белок IL с селективной агонистической активностью в отношении регуляторных T-клеток и с дополнительной аминокислотной заменой, которая обеспечивает возможность для химической конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ), который удлиняет период полувыведения из кровотока, по сравнению только с IL-2 селективным агонистом. Положения замещенных аминокислот были выбраны, исходя из доступности воздействия растворителя в рецепторном комплексе IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ и прогнозируемой способности конъюгированных с полимером вариантов сохранять способность связываться и активировать рецепторный комплекс IL2R $\alpha\beta\gamma$. Была получена серия рекомбинантных вариантов IL-2, в которые были введены остатки аминокислоты цистеина в отдельные аминокислотные положения, и варианты белки были подвергнуты скринингу на активность. Варианты IL-2, которые были успешно экспрессированы и очищены, подвергали рефолдингу, конъюгировали с малеимидами-ПЭГ полимерами, а затем тестировали на селективную агонистическую активность по отношению к регуляторным T-клеткам. Таким образом был идентифицирован предпочтительный вариант IL-2 селективного агониста, IL2/N88R/C125S/D109C. Этот новый белок и его ПЭГ конъюгат селективно и эффективно повышают уровни и активность регуляторных T-клеток у пациентов, подавляют аутоиммунные патологии и, таким образом, являются безопасным и эффективным терапевтическим веществом для лечения аутоиммунных заболеваний.

Настоящее изобретение также относится к вариантным белкам IL-2, имеющим по меньшей мере от 95 до 98% и до 100% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1, содержащим замену D109C и обладающим способностью активировать T-клетки. Белки по настоящему изобретению могут быть связаны с полиэтиленгликолевым фрагментом, связанным с цистеином в положении 109. Полиэтиленгликолевый фрагмент необязательно имеет молекулярную массу в интервале от 5 до 40 кДа. Вариантные белки IL-2 по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере одну из замен, выбранных из группы, состоящей из N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L и Q126F. Помимо этого варианты белки IL-2 по изобретению могут необязательно включать замену C125S. Более предпочтительным является вариантный белок IL-2, в котором последовательность белка IL-2 содержит замену N88R и замену C125S. Белки по настоящему изобретению необязательно предоставляются в фармацевтической композиции, содержащей белки по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способам увеличения периода полувыведения вариантного человеческого белка IL-2 по настоящему изобретению из кровотока, в котором способ включает связывание полиэтиленгликолевого фрагмента с цистеиновым остатком в положении 109, причем полиэтиленгликолевый фрагмент имеет длину, достаточную для увеличения периода полувыведения белка из кровотока по сравнению с тем же белком без полиэтиленгликолевого фрагмента. Способы по изобретению дополнительно предусматривают введение вариантного белка в терапевтически эффективной дозе, достаточной для стимуляции увеличения уровня человеческих регуляторных T-клеток.

Подробное описание изобретения

Введение

Настоящее изобретение представляет собой новый вариантный белок IL-2, который содержит аминокислотную замену, обеспечивающую возможность для специфической и эффективной химической конъюгации ПЭГ полимера с указанным вариантным белком IL-2, сохраняя при этом его высокую аффинность к IL-2 рецептору, высокую биологическую активность и увеличенный период полувыведения из кровотока по сравнению с исходным IL-2. Этот вариантный белок был обнаружен в ходе процесса определения аминокислотных положений-кандидатов в последовательности IL-2, которую подвергали воздействию растворителя в опубликованной кристаллической структуре рецепторного комплекса IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$, и были созданы варианты белки, в которых в выбранных положениях заменяли цистеиновые остатки. Эти варианты IL-2 экспрессировали и очищали, варианты белки, продуцируемые на достаточно высоком уровне, конъюгировали с ПЭГ-малеимидом, и затем IL2/N88R/D109C-ПЭГ тестировали на биоактивность в Treg клетках, которые, как было показано, являются активными.

Молекула, определенная в настоящем изобретении, позволяет осуществлять безопасное и эффек-

тивное лечение аутоиммунных заболеваний с помощью нового механизма стимулирования продуцирования небольшой субпопуляции Т-клеток, которые подавляют аутоиммунные и воспалительные патологии. Это терапевтическое средство, разрушающее парадигму, способно лечить ряд различных аутоиммунных заболеваний.

Определения

Когда речь идет о вариантах белка дикого типа, ссылки на аминокислотные замены, такие как "D109C" означают исходный остаток аспарагиновой кислоты (D) в положении под номером (109) с последующим указанием замещенного цистеинового остатка (C).

"По меньшей мере, процентная (например, 97%) идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1", используемая в настоящем описании, означает степень совпадения последовательности из двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов. Процент идентичности между представляющей интерес последовательностью и второй последовательностью в пределах интервала оценки, например в пределах длины представляющей интерес последовательности может быть вычислен путем выравнивания последовательностей, определения числа остатков (нуклеотидов или аминокислот) в пределах интервала оценки, которые противоположны идентичному остатку, что позволяет ввести разрыв, чтобы максимизировать идентичность, деления на общее количество остатков в представляющей интерес последовательности или второй последовательности (в зависимости от того, которая из них длиннее), которые находятся в пределах интервала, и умножения на 100. При вычислении количества идентичных остатков, необходимых для получения конкретного процента идентичности, фракции должны быть округлены до ближайшего целого числа. Процент идентичности может быть вычислен с помощью различных компьютерных программ. Например, компьютерные программы, такие как BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST и т.д., осуществляют выравнивание и обеспечивают процент идентичности между представляющими интерес последовательностями. Алгоритм Karlin и Altschul (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:22264-2268, 1990), модифицированный, как описано в Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:5873-5877, 1993, включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные в Altschul et al. (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Чтобы получить выравнивание с разрывами с целью сравнения, используется программа Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (Altschul et al. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). В случае применения программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию для соответствующих программ. Может быть использована матрица PAM250 или BLOSUM62. Программное обеспечение для осуществления анализа BLAST можно приобрести через Национальный центр биотехнологической информации (NCBI). См. на веб-сайте с URL: "ncbi.nlm.nih.gov". В конкретном варианте осуществления изобретения процент идентичности вычисляется с помощью программы BLAST2 с параметрами по умолчанию, представленными в NCBI.

"IL-2 селективный агонист" по настоящему изобретению представляет собой IL-2 $\alpha\beta\gamma$ селективный агонист. Функционально он селективно активирует рецепторный комплекс IL-2 $\alpha\beta\gamma$ относительно рецепторного комплекса IL-2 $\beta\gamma$. Он происходит от IL-2 белка дикого типа и может быть структурно определен как имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности по отношению к последовательности IL-2 дикого типа SEQ ID NO: 1, а функционально - как способный активировать предпочтительно Treg клетки. Белок также может также быть функционально определен по его способности селективно активировать передачу сигналов от рецепторов IL-2 в Treg, измеряемую по уровню фосфорилированного белка STAT5 в Treg клетках по сравнению с CD4+CD25-/low Т-клетками или NK клетками, или по селективной активации стимулируемых фитогемагглютинином Т клеток относительно NK клеток.

"Treg" или "Treg клетки" означает регуляторные Т клетки. Регуляторные Т-клетки представляют собой класс Т-клеток, которые подавляют активность других иммунных клеток и которые определяются методом проточной цитометрии с использованием клеток с маркерным фенотипом CD4+CD25+FOXP3+. Поскольку FOXP3 является внутриклеточным белком и требует фиксации клеток и проницаемости мембран для окрашивания, фенотип клеточной поверхности CD4+CD25+CD127- может быть использован для определения живых Treg. Treg также включают в себя различные подклассы Treg, такие как tTreg (тимусного происхождения) и pTreg (полученные из периферической крови, дифференцированные из нативных Т клеток в периферической крови). Все Treg экспрессируют рецептор IL2R $\alpha\beta\gamma$, не продуцируют свой собственный IL-2 и их рост зависит от IL-2, и специалисту в данной области техники должно быть понятно, что оба класса селективно активируются IL2R $\alpha\beta\gamma$ селективным агонистом.

"ПЭГ" представляет собой молекулу поли(этиленгликоля), которая является водорастворимым полимером этиленгликоля. Молекулы ПЭГ могут быть химически конъюгированы с белками для увеличения их периода полувыведения из кровотока. Могут быть получены ПЭГ любого размера, а также они могут быть приобретены на рынке в химически активных формах, которые дериватизированы с использованием химически реакционных групп для обеспечения возможности образования конъюгатов с белком через ковалентные связи. Активированные ПЭГ могут быть приобретены в коммерческих компаниях, таких как NOP America (White Plains, NY) и Celares GmbH (Berlin, Germany). Производимые линейные ПЭГ имеют разную молекулярную массу, например ПЭГ полимеры со средней молекулярной массой 5000, 10000, 20000, 30000 и 40000 Да. Также были разработаны разветвленные ПЭГ полимеры.

Обычно используемые активированные ПЭГ полимеры представляют собой дериватизированные N-гидроксисукцинимидные группы (для конъюгации с первичными аминами, такими как остатки лизина и N-концами белка), альдегидные группы (для конъюгации с N-концами) и малеимидные или йодацетамидные группы (для связывания с тиолами, такими как остатки цистеина).

Термин "IL-2-ПЭГ конъюгат" представляет собой белок IL-2, с которым ковалентно конъюгирован ПЭГ. IL-2 фрагмент может представлять собой IL-2 дикого типа (wtIL-2), IL-2 с C125S заменой, один из предыдущих белков с заменами в N88, D20 или Q126, которые обеспечивают избирательность по отношению к рецептору IL2R $\alpha\beta\gamma$, или один из предыдущих белков с дополнительной заменой, которая обеспечивает возможность для сайт-специфической конъюгации молекулы ПЭГ.

"Биоактивность" относится к измерению биологической активности в количественном *in vitro* анализе, проводимом на клетках.

"Функциональная активация Treg клеток" определяется как IL-2-опосредованный ответ в Treg. Данные анализа для функциональной активации клеток Treg включают стимуляцию pSTAT5, пролиферацию клеток Treg и стимуляцию уровней Treg эффекторных белков.

Разработка и конструирование фрагментов IL-2 для получения ПЭГ-конъюгатов

При разработке фрагмента IL-2, который наилучшим образом соответствует необходимым требованиям, исходили из следующих положений:

(1) Вводили в IL-2 свободные (неспаренные) остатки цистеина в связи с очень специфической реактивностью тиолов с алемид- и йодацетамид-активированными реагентами ПЭГ.

(2) Все конструкции получали на основе человеческих IL-2 дикого типа, содержащих замену C125S для удаления только неспаренных остатков цистеина в IL-2 и замену N88R, которая уменьшает аффинность по отношению к IL2RB и, таким образом, обеспечивает селективность по отношению к IL2R $\alpha\beta\gamma$, C125 непосредственно примыкает к Q126, основному контакту с IL2RG.

(3) Вводили единичные дополнительные цистеиновые замены на выходящих на поверхность участках на IL-2 для обеспечения эффективной конъюгации с водорастворимыми ПЭГ.

(4) Участки конъюгации с ПЭГ также выбирали таким образом, чтобы они были подвержены воздействию растворителя внутри рецепторного комплекса IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Wang X., et al., 2005 Science. 310:1159-63) и, таким образом, уменьшали вероятность ухудшения связывания и активации IL2R $\alpha\beta\gamma$.

(5) Вариантные белки должны хорошо экспрессироваться и быть правильно свернутыми. Наличие нового свободного цистеина может привести к ненадлежащему образованию внутримолекулярных дисульфидных связей и неправильной сборке или к образованию межмолекулярных дисульфидных связей с другими молекулами, что приводит к агрегации.

Общие методы

Как правило, варианты белки IL-2 по настоящему изобретению могут быть получены с помощью процедур, описанных в настоящем описании, и признанных методов рекомбинантной ДНК, включающих, например, метод амплификации с помощью полимеразной цепной (ПЦР), получения плазмидной ДНК, расщепления ДНК рестрикционными ферментами, получения олигонуклеотидов, лигирования ДНК, выделения мРНК, введения ДНК в подходящую клетку, трансформации или трансфекции хозяина, культивирования хозяина. Кроме того, слитые молекулы могут быть выделены и очищены с помощью хаотропных агентов и хорошо известных электрофоретических методов, методов центрифугирования и хроматографических методов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. (1989)); и Ausubei et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989), в которых раскрыты аналогичные методы.

Гены, кодирующие варианты белки по настоящему изобретению, подвергают расщеплению рестрикционными ферментами и лигированию в качестве основных этапов, используемых для получения ДНК, кодирующей желаемые варианты слияния. Перед лигированием может потребоваться модификация концов фрагмента ДНК, которая может быть достигнута путем заполнения липких концов, удаления концевых частей фрагмента(ов) с помощью нуклеаз (например, EhoIII), сайт-направленного мутагенеза или путем добавления новых пар оснований с помощью ПЦР. Для облегчения соединения выбранных фрагментов могут быть использованы полилинкеры и адаптеры. Экспрессирующую конструкцию, как правило, собирают в несколько этапов, включающих циклы рестрикции, лигирования и трансформации *E.coli*. Многочисленные клонирующие векторы, пригодные для создания экспрессирующей конструкции, известны в данной области (λ .ZAP, Agilent; pET, EMD Millipore), и конкретный выбор не имеет решающего значения для изобретения. Выбор вектора клонирования будет зависеть от системы переноса генов, выбранной для введения экспрессирующей конструкции в клетку-хозяина. В конце каждого этапа полученную конструкцию можно анализировать методом рестрикции, определения последовательности ДНК, методами гибридизации и анализа ПЦР.

Сайт-направленный мутагенез, как правило, используют для введения специфических мутаций в гены, кодирующие варианты белки IL-2 по настоящему изобретению, способами, известными в данной области техники (См., например, публикацию заявки на патент США 2004/0171154; Storicic et al., 2001, *Nature Biotechnology* 19:773-776; Kren et al., 1998, *Nat. Med.* 4:285-290 и Calissano and Macino, 1996, *Fun-*

gal Genet. Newslett. 43:15-16). В настоящем изобретении можно использовать любую процедуру сайт-направленного мутагенеза. Имеется большое количество коммерческих наборов, которые могут быть использованы для получения вариантов по настоящему изобретению.

Различные промоторы (регуляторные участки инициации транскрипции) могут быть использованы в соответствии с изобретением. Выбор соответствующего промотора зависит от предлагаемого экспрессирующего хозяина. Промоторы из гетерологичных источников могут быть использованы при условии, что они функционируют в выбранном хозяине.

IL-2 белки могут быть экспрессированы в *E.coli* без сигнальной последовательности, и белки могут быть извлечены из внутриклеточных телец и подвергнуты рефолдингу в активную форму. Такая экспрессирующая система описана в патенте США 7105653 В2.

Для облегчения экспрессии описанных в настоящем документе белков можно использовать различные сигнальные последовательности. Сигнальную последовательность выбирают или разрабатывают для эффективной секреции; также может быть использован процессинг в экспрессирующем хозяине. Для клеток млекопитающих может быть использована нативная сигнальная последовательность человеческого IL-2, сигнальная последовательность, которая является гомологичной последовательности, кодирующей TCR, или сигнальная последовательность, гомологичная последовательности, кодирующей мышинный IL-2. Другие подходящие пары сигнальная последовательность/клетка-хозяин включают сигнальную последовательность *sacB* *B. subtilis*, сигнальную последовательность для секреции в *B. subtilis* и α -фактор спаривания *Saccharomyces cerevisiae* или сигнальные последовательности *rhoI* кислой фосфатазы *P. pastoris* для секреции *P. pastoris*. Сигнальная последовательность может быть соединена непосредственно через последовательность, кодирующую сайт расщепления сигнальной пептидазой, к последовательности, кодирующей белок, или через короткий нуклеотидный мостик.

Для эукариотических систем, экспрессирующих белок, были определены элементы усиления транскрипции и трансляции. Например, размещение промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) длиной 1000 п.о. с любой стороны гетерологичного промотора может повышать уровни транскрипции в растительных клетках в 10-400-раз. Экспрессирующая конструкция должна также включать соответствующие последовательности инициации транскрипции. Модификация экспрессирующей конструкции путем включения консенсусной последовательности Козак для правильной инициации трансляции может увеличить уровень трансляции в 10 раз.

Экспрессирующие кассеты соединяют с соответствующими векторами, совместимыми с используемым хозяином. Вектор должен иметь возможность приведения последовательности ДНК, кодирующей слитые белки, в состояние экспрессии. Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические и прокариотические клетки, предпочтительно клетки, которые могут быть легко трансформированы и которые демонстрируют быстрый рост в культуральной среде. В частности, предпочтительные клетки-хозяева включают клетки прокариот, таких как *E.coli*, *Bacillus subtilis* и т.д., и эукариот, такие как клетки животных и штаммов дрожжей, например *S. cerevisiae*. Как правило, клетки млекопитающих являются предпочтительными, в частности, НЕК, J558, NSO, SP2-О или СНО. Другие подходящие носители включают, например, клетки насекомых, такие как Sf9. Используются обычные условия культивирования. См. Sambrook, выше. Могут быть выбраны стабильные трансформированные или трансфицированные линии клеток. В качестве экспрессирующих систем также можно использовать системы *in vitro* транскрипции-трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая желаемый вариантный белок IL-2, может быть введена в клетку-хозяина с помощью стандартных методов трансфекции клеток. Термин "трансфицирующий" или "трансфекция" охватывает все обычные способы введения нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева, включая кальций-фосфатную преципитацию, ДЭАЭ-декстран-опосредованную трансфекцию, липофекцию, электропорацию, микроинъекцию, вирусную трансдукцию и/или интеграцию. Подходящие способы трансфицирования клеток-хозяев можно найти у Sambrook et al. (см. выше) и в других учебниках для лабораторных работ.

В качестве альтернативы можно использовать синтетическую генную конструкцию или часть конструкции белков, описанных в настоящем документе. Это подразумевает *in vitro* синтез разработанной полинуклеотидной молекулы, предназначенной для кодирования представляющей интерес полипептидной молекулы. Синтез гена может быть осуществлен с помощью нескольких методов, таких как мультиплексный метод с использованием микрочипов, описанный Tian, et al., (Tian et. al., Nature 432:1050-1054), и аналогичных методов, с помощью которых олигонуклеотиды синтезируют и собирают на фотограммируемых микрофлюидных чипах.

Вариантные белки IL-2 по настоящему изобретению выделяют из собранных клеток-хозяев или из культуральной среды. Для выделения представляющих интерес белков используют стандартные методы очистки от среды или из собранных клеток. В частности, способы очистки могут быть использованы для экспрессии и очистки желаемого вариантного белка IL-2 в больших количествах (то есть, по меньшей мере в миллиграммовых количествах), используя различные подходы, включая роллер-флаконы, вращающиеся колбы, культуральные планшеты, биореакторы или ферментеры.

Была разработана экспрессирующая белки система, позволяющие включать ненатуральные аминокислоты.

кислоты в рекомбинантные белки (Kim C. H., et al. *Curr Opin Chem Biol.* 2013 S1367-5931(13)00071-9). Эти экспрессирующие системы могут включать неприродные аминокислоты, которые имеют химическую реакционную способность, позволяющую осуществлять сайт-специфическое пегилирование белков в этих положениях. В качестве альтернативы использованию свободных цистеиновых остатков специалисту в данной области техники должно быть понятно, что положения аминокислот в IL-2, определенные в данном описании, также могут быть заменены ненатуральными аминокислотами вместо цистеина с достижением аналогичной цели, заключающейся в присоединении ПЭГ или другого неиммуногенного полимера к IL-2 для увеличения периода полувыведения из кровотока.

Специалисту в данной области также будет понятно, что фрагмент селективного агониста IL-2 по данному изобретению также может быть конъюгирован с другими неиммуногенными полимерами. Два таких полимера являются рекомбинантными неиммуногенными аминокислотными полимерами, такие как XTEN полимеры, цепи аминокислот A, E, G, P, S и T (Schellenberger V., et. al., 2009, *Nat Biotechnol.* 27:1186-90)), и PAS полимеры, цепи P, A и S аминокислотных остатков (Schlapschy M., et. al., 2007, *Protein Eng Des Sel.* 20:273-84).

Фрагмент IL2 селективного агониста

IL-2 с заменой N88R является иллюстративным случаем IL2 селективного агониста для рецептора IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Shanafelt, A. B., et al., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:1197-202). IL2/N88R является дефектным в отношении связывания с субъединицей рецептора IL2RB и рецепторным комплексом IL2R $\beta\gamma$, но способен связываться с рецепторным комплексом IL2R $\alpha\beta\gamma$ и стимулировать пролиферацию РНА-активированных Т-клеток, экспрессирующих IL2R $\alpha\beta\gamma$, так же эффективно, как и wtIL-2, при этом демонстрируя 3000 кратное снижение способности стимулировать пролиферацию NK клеток, экспрессирующих IL2R $\beta\gamma$. Другие IL2R $\alpha\beta\gamma$ селективные агонисты с подобными профилями активности включают IL-2 с заменами N881, N88G и D20H; варианты IL2 с заменами Q126L и Q126F (остатки, контактирующие с субъединицей IL2RG) также обладают IL2R $\alpha\beta\gamma$ -селективной агонистической активностью (Casseli, D.J., et. al, 2002, *Curr Pharm Des.*, 8:2171-83). Практикующему специалисту в данной области будет понятно, что любая из этих IL2-селективных агонистических молекул может быть заменена фрагментом IL2/N88R с ожиданием того, что Fc-слитый белок будет иметь такую же активность. Все из указанных выше мутаций могут быть сделаны на основе wtIL-2, или wtIL-2 с заменой C125S, которая представляет собой замену, улучшающую стабильность IL-2 путем удаления неспаренных цистеиновых остатков. В настоящем изобретении также могут быть использованы другие мутации или укорочение, которые улучшают продуцирование или стабильность без существенного влияния на активность по активации рецептора IL-2.

Варианты настоящего изобретения необязательно включают варианты с заменами по консервативному типу, которые применимы к аминокислотным последовательностям и последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или в которых нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность в, по существу, идентичных последовательностях. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем создания последовательностей, в которых третье положение позиция одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяется на смешанное основание и/или дезоксиинозиновые остатки (Batzet et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют любой заданный белок. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом в каждом положении, где аланин задается кодоном, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие изменения нуклеиновых кислот являются "немыми" изменениями, которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных изменений. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный "немой" вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый "немой" вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Что касается консервативной замены аминокислотных последовательностей, специалист поймет, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые приводят к изменению, добавлению или делеции одной аминокислоты или небольшой доли аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой консервативно модифицированный вариант, в котором изменение приводит к замене аминокислоты химически аналогичной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, обеспечивающие функционально аналогичные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют, а не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологии и аллели по

изобретению.

Каждая из приведенных ниже групп содержит аминокислоту, которая является консервативной заменой для другой:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) серин (S), треонин (T);
- 3) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 4) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 5) цистеин (C), метионин (M);
- 6) аргинин (R), лизин (K), гистидин (H);
- 7) изолейцин (I), лейцин (L), валин (V); и
- 8) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Примеры консервативных замен, которые допускаются в IL-2, включают 31F, T51S, Q57N, E100D и T111S.

Методы биоанализа

Надежные количественные методы биоанализа необходимы для характеристики биологической активности белков-кандидатов. Эти методы анализа (оценки) должны измерять активацию рецептора IL2, функциональные последствия активации в Treg и терапевтически релевантные результаты и функции активированного Treg. Они могут быть использованы для измерения терапевтической активности и потенции молекул IL-2-ПЭГ конъюгатов, а также могут быть использованы для измерения фармакодинамики IL-2-ПЭГ конъюгата у животных или у человека. В одном из методов анализа измеряют фосфорилирование сигнального белка STAT5 трансдукции методом проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного для фосфорилированного белка (pSTAT5). Фосфорилирование STAT5 является важным этапом в пути передачи сигнала IL-2. STAT5 имеет важное значение для развития Treg, и конститутивно активированная форма STAT5, экспрессируемая в CD4+CD25+ клетках, является достаточной для продуцирования клеток Treg в отсутствие IL-2 (Mahmud S. A., et al., 2013, JAKSTAT 2:e23154). Таким образом, измерение фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) в клетках Treg будет признано специалистом в данной области техники как отражающее активацию IL-2 в этих клетках, и является показателем других биологических последствий обработки с помощью IL-2 в течение соответствующего времени экспозиции и в соответствующих условиях. В другом методе анализа функциональной активации измеряют IL-2-стимулированную пролиферацию клеток Treg. Специалисту в данной области техники будет понятно, что пролиферация Treg может быть измерена путем введения меченого тритием тимидина в очищенные клетки Treg, увеличения численности Treg клеток в смешанной популяции клеток, измеренных с помощью проточной цитометрии, и частоты CD4+CD25+FOXP3+ или CD4+CD25+CD127-маркерных фенотипов, путем увеличенной экспрессии в Treg клетках белков клеточного цикла, ассоциированных с пролиферацией, например, Ki-67, или путем измерения ассоциированного с делением клеток разбавления жизненно важного флуоресцентного красителя, такого как сукцинимидный сложный эфир карбоксифлуоресцеина (CFSE), методом проточной цитометрии в Treg клетках. Другой метод оценки функциональной активации Treg с помощью IL-2 представляет собой повышенную устойчивость Treg. Клетки pTreg считаются нестабильными и могут дифференцировать в эффекторные T-клетки Th1 и Th17. IL-2 активация Treg может стабилизировать Treg и предотвратить эту дифференцировку (Chen Q., et al., 2011, J Immunol 186:6329-37). Другим результатом стимуляции Treg с помощью IL-2 является стимуляция увеличения количества молекул функциональных эффекторов Treg, таких как CTLA4, GITR, LAG3, TIGIT, IL-10, CD39 и CD73, которые способствуют иммуносупрессивной активности Treg.

Лекарственная форма

Фармацевтические композиции слитых белков по настоящему изобретению используют для получения лекарственных форм для парентеральной (в частности, внутривенной или подкожной) доставки в соответствии с обычными способами. В общем, фармацевтические композиции включают слитые белки по настоящему изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как физиологический раствор, забуференный солевой раствор, 5%-ный раствор декстрозы в воде или т.п. Лекарственные формы могут дополнительно включать один или более из следующего: наполнители, консерванты, солибиллизаторы, буферные агенты, альбумин для предотвращения потери белка на поверхности флакона и т.д. Способы составления лекарственных форм хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19.sup.th ed., 1995.

В качестве иллюстрации, фармацевтические лекарственные формы могут поставляться в виде набора, включающего контейнер, который содержит слитые белки по настоящему изобретению. Терапевтические белки могут быть представлены в форме инъеклируемого раствора для одной или нескольких доз, в виде стерильного порошка, который восстанавливают перед инъекцией, или в виде предварительно заполненного шприца. Такой набор может дополнительно включать письменную информацию о показаниях и использовании фармацевтической композиции. Кроме того, такая информация может содержать указание, что слитые белки по настоящему изобретению противопоказаны пациентам с известной гиперчувствительностью к слитым белкам по настоящему изобретению.

II-2-ПЭГ конъюгат по настоящему изобретению может быть введен в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции, как правило, включают белок и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, без ограничения, солевой раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения (например, антибиотики) могут также быть включены в композиции.

Фармацевтическую композицию составляют таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. II-2-ПЭГ конъюгат по изобретению может быть введен парентерально. Примеры парентеральных путей введения включают, например, внутривенное, интрадермальное и подкожное. Растворы или суспензии, используемые для парентерального введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфат натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиамин тетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетатный, цитратный или фосфатный, и регулирующие тоничность агенты, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как моно- и/или динатрия фосфат, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до pH примерно 7,2-7,8, например, 7,5). Препарат для парентерального введения может быть помещен в ампулы, одноразовые шприцы или дозированные флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатический, воду или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Поддержание требуемого размера частиц в случае дисперсии может быть облегчено путем использования поверхностно-активных веществ, например, полисорбата или твина. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеозала, и т.п., во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка замораживанием, в результате которых получается порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора

В одном из вариантов осуществления II-2-ПЭГ конъюгат готовят с носителями, которые будут защищать II-2-ПЭГ конъюгат от быстрого удаления из организма, например, в виде лекарственного средства с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Такие препараты могут быть получены с использованием стандартных методов.

Фармацевтические композиции могут быть помещены в контейнер, пакет или диспенсер вместе с инструкцией по введению.

Введение

II-2-ПЭГ конъюгаты по настоящему изобретению предпочтительно вводят парентерально. Подкожный путь является предпочтительным путем введения, но также можно использовать внутривенный, внутримышечный и субдермальный пути введения. Для подкожного или внутримышечного путей введения могут быть использованы депо и депо-формы. Для некоторых заболеваний могут быть использованы специализированные способы введения. Например, при воспалительных заболеваниях глаз можно использовать внутриглазную инъекцию. Слитые белки могут быть использованы в концентрациях от примерно 0,1 до 10 мкг/мл от общего объема, хотя могут быть использованы концентрации в пределах от 0,01 до 100 мкг/мл.

Определение дозы находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области тех-

ники. Дозирование осуществляется ежедневно или еженедельно в течение всего периода лечения, или может осуществляться с другой периодичностью. Внутривенное введение можно осуществлять в виде болюсной инъекции или инфузии в течение типичного периода времени от одного до нескольких часов. Также могут быть использованы лекарственные формы с замедленным высвобождением. Как правило, терапевтически эффективное количество IL-2-ПЭГ конъюгата по настоящему изобретению представляет собой количество, достаточное для получения клинически значимого изменения в предназначенном для лечения состоянии, такого как клинически значимого изменения циркулирующих клеток Treg, клинически значимого изменения Treg клеток, присутствующих в пораженной ткани, или клинически значимого изменения симптомов заболевания.

Данные, полученные из анализа на культурах клеток и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для применения людьми. Дозировка таких соединений находится предпочтительно в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают половину максимально эффективной концентрации (EC50, т.е. концентрацию испытуемого соединения, которая позволяет достичь половины от максимальной стимуляции клеток Treg), токсичных в незначительной степени или совсем нетоксичных. Дозировка может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для любого соединения, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективная доза может быть оценена первоначально, исходя из результатов анализа клеточных культур. Доза может быть приготовлена с использованием животных моделей для получения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает EC50, как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения доз для человека. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Как определено в данном описании, терапевтически эффективное количество IL-2-ПЭГ конъюгата (т.е. эффективная доза) зависит от выбранного полипептида и частоты дозирования. Например, можно вводить единичные дозы в количестве от примерно 0,001 до 0,1 мг/кг веса тела пациента; в некоторых вариантах осуществления можно вводить от примерно 0,005, 0,01, 0,05 мг/кг. Композиции можно вводить от одного раза в день до одного или нескольких раз в неделю или один или более раз в месяц; в том числе один раз в день. Специалисту будет понятно, что некоторые факторы могут влиять на дозировку и время, необходимое для эффективного лечения субъекта, включая, без ограничения, тяжесть заболевания или расстройства, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, уровень Treg клеток, присутствующих в организме пациента, а также другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством ПЭГ конъюгата IL-2 селективного агониста по изобретению, вероятно, будет включать несколько курсов лечения.

Аутоиммунные заболевания

Отмечены некоторые заболевания, которые можно излечить с помощью метода лечения по настоящему изобретению. Тем не менее, роль клеток Treg при аутоиммунных заболеваниях представляет собой достаточно активную область исследований, и, следовательно, могут быть идентифицированы дополнительные заболевания, которые можно излечить с помощью настоящего изобретения. Аутоиммунные заболевания определяются как заболевания человека, при которых иммунная система атакует свои собственные белки, клетки и ткани. Полный перечень и обзор аутоиммунных заболеваний можно найти в *The Autoimmune Diseases* (Rose and Mackay, 2014, Academic Press).

Все публикации и заявки на патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в виде ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана как включенная в виде ссылки.

Хотя настоящее изобретение было подробно описано с использованием иллюстраций и примеров для более ясного понимания, специалист в данной области легко поймет в свете идей настоящего изобретения, что определенные изменения и модификации могут быть сделаны в нем без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Следующие примеры приведены исключительно в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Специалисты легко поймут, что многочисленные некритические параметры могут быть изменены или модифицированы, приводя по существу к таким же результатам.

1. Предсказание возможных участков прикрепления ПЭГ в IL-2

Для выбора участков-кандидатов для конъюгации ПЭГ с IL-2 идентифицировали аминокислотные остатки, которые подвергаются воздействию растворителей и не мешают непосредственно или стерически связыванию IL-2 с IL2R $\alpha\beta\gamma$. Стратегия схематично показана на фиг. 2. Проверка опубликованной кристаллической структуры IL-2 в комплексе с внеклеточными доменами рецептора IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Wang X., et al., 2005, *Science* 310:1159-63, Stauber, D. J., et al., 2006, *Proc Natl Acad Sci* 103:2788-93) выявила следующие остатки: S6, K8, K48, K49, T51, E52, K54, K97, G98, F103, M104, E106, D109 и T133 (фиг. 3). Дополнительные аминокислотные остатки, которые не видны в кристаллической структуре, но, исходя из информации о соседних остатках, скорее всего, отвечают критериям, представляют собой A1, P2, T3,

S4, S5, S99, E100, T101 и T102. На основании этого списка кандидатов было сконструировано и продуцировано 12 вариантов (Т3С, S6С, К8С, К48С, К49С, Т51С, К97С, G98С, F103С, M104С, E106С и D109С) с цистеиновыми заменами в указанных положениях (табл. 1).

2. Клонирование, экспрессия и очистка вариантных белков, IL2 селективного агонистов, в *E.coli*.

кДНК, кодирующую белки с каждой из замен, перечисленных в табл. 1, полученную, используя человеческий IL-2 (SEQ ID NO: 1), содержащий замены N88R и C126S, получали путем синтеза ДНК (Genescript, Piscataway, NJ), содержащей рестрикционные сайты NcoI и Bam HI на 5' и 3'-концах, соответственно, и клонировали в рUC57. Вставки кДНК затем клонировали в вектор рЕТ3d (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) с помощью сайтов NcoI и Bam HI. Конструкты трансформировали в BL21(DE3) и отобраны на устойчивость к ампициллину. Трансформированные клетки выращивали в LB-среде, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 0,1% глюкозы при 37°C в 0,5 л культур в ABS280 между 0,6 и 1,0. Затем добавляли IPTG до 0,5 mM концентрации, чтобы индуцировать экспрессию белка, и культуры собирали через 3 ч после индукции.

Клетки осаждали центрифугированием при 10000×g в течение 10 мин. Внутриклеточные тельца (IB) выделяли и очищали от клеточных гранул с использованием Bugbuster (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) в соответствии с инструкциями производителя, а также отбирали пробы для анализа с помощью SDS-PAGE. IB растворяли и денатурировали в 8M гуанидин гидрохлорида в 0,1 M Трис/HCl (pH 8,0), содержащем 0,1% (об/об) 2-меркаптоэтанола, в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем белки ренатурировали путем диализа против 20 объемов 10 mM Трис/HCl (pH 8,0)/л mM ЭДТА в течение 12 ч при комнатной температуре. После чего добавляли к образцам трифторуксусную кислоту (ТФК) до 0,1%, образцы осветляли центрифугированием для удаления осадка, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и очищали с помощью обращенной фазовой хроматографии. Варианты IL-2 загружали в C-8 колонку Vydac 208TP54 в 0,1% ТФК при скорости потока 1 мл/мин и элюировали 45 мин градиентом 0-75% ацетонитрила в 0,1% ТФК. Фракции с вариантными белками IL-2 подвергали скринингу с помощью SDS-PAGE, как правило, элюируя при примерно 60% ацетонитрила.

Результаты изучения продуцирования приведены в таб. 1. Из 12 вариантов, выбранных для продуцирования, только 7 дали обнаруживаемые пики белка IL-2 после обращенной фазовой хроматографии. Из этих 7 белков, 5 показали выход, который был очень низким, и продуцировали недостаточно материала для дальнейших исследований в рамках выполняемых исследований. Из оставшихся 2-х белков, один вариант D.109С, который был продуцирован на самом высоком уровне, пегилировали и тестировали. Эти результаты указывают на то, что способность продуцировать эти вариантные белки с остатками одиночного неспаренного цистеина, варьирует в широких пределах, и что многие из них не могут быть легко получены. Это может быть связано со множеством различных факторов, таких как токсичность рекомбинантного белка для хозяина *E.coli*, неспособность формировать внеклеточные тельца или низкая эффективность рефолдинга. Модификация процесса продуцирования или экспрессии белков в других экспрессирующих системах, например в клетках млекопитающих, может повысить продуктивность некоторых других вариантов в качестве секретируемого белка. Тем не менее, в этой экспрессирующей системе вариант D109С демонстрирует явное превосходство в уровнях продуцирования.

Таблица 1. Результаты продуцирования вариантных белков IL-2 в *E.coli*.

Вариант IL-2 селективного агониста	Высота пика, mUA (280 нм)
-	1
Т3С	nd
S6С	nd
К8С	nd
К48С	1
К49С	11
Т51С	nd
К97С	1
G98С	1
F103С	nd
M104С	2
E106С	nd
D109С	26

Высота пика представляет относительный конечный выход вариантного белка на обращенной фазовой хроматографии, nd=пик не обнаружен

3. Пегилирование IL2/N88R/C125S/D109С.

Очищенный IL2/N88R/C125S/D109С конъюгировали с 20 кДа ПЭГ, чтобы проверить биологическую активность конъюгата. IL2/N88R/C125S/D109С диализовали в 0,1 M MES (pH 6,0), концентрацию белка определяли OD280, используя коэффициент экстинкции 0,655 (Abs 280 нм на уровне 0,1%) и подвергали взаимодействию с малеинимид-ПЭГ, взятому с 50-кратным молярным избытком (20000 г/М;

NOF America, White Plains, NY) в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали путем добавления L-цистеина до 2-кратного молярного избытка по отношению к малеимид-ПЭГ. Анализ 10 мкг реакционной смеси с помощью SDS-PAGE не показал обнаруживаемого остаточного непрореагировавшего белка IL-2.

4. Активность пегелированного IL2/N88R/C125S/D109C в Т-клетках

Активность пегелированного IL2/N88R/C125S/D109C в Т-клетках определяли путем измерения стимуляции уровней фосфо-STAT5 (pSTAT5) в подмножестве CD4+ Т-клеток. Активация рецептора IL-2 через связывание IL-2 с гетеродимером IL2RB и IL2RG способствует взаимодействию белков JAK1 и JAK3 с цитоплазматическими доменами IL2RB и IL2RG соответственно, стимулируя фосфорилирование STAT5 белка (pSTAT5), который затем трансдуцирует сигнал IL-2 в ядро; STAT5 необходим для развития клеток Treg, и искусственная активация STAT5 в CD4+ Т-клетках является достаточной для продуцирования клеток Treg в отсутствие IL-2 (Mahmud S. A., et al., 2013, JAKSTAT 2:e23154). Уровни pSTAT5 измеряли с помощью антитела к фосфорилированному пептиду STAT5 методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) в пермеабилizированных клетках. Клетки Treg конститутивно экспрессируют CD25, и клетки, которые входят в верхний 1% по уровням экспрессии CD25 являются высоко обогащенными клетками Treg (Jailwala P., et al., 2009, PLoS One. 2009; 4:e6527; Long, S. A. et al., 2010, Diabetes 59:407-15). Таким образом, данные FACS были гейтированы на группы CD25^{high} (верхние 1-2% от клеток, экспрессирующих CD25) и CD25^{low/-}.

Криоконсервированные человеческие PBMC (Astarte Biologies, Seattle, WA) размораживали, промывали в среде X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ), содержащей 1% человеческой сыворотки АВ (Mediated!, Manassas, VA), и оставляли для восстановления на 2 ч при 37°C. Затем клетки распределяли по 0,1 мл в 15×75 мм пробирки с концентрацией 5×10⁶ клеток/мл. Клетки обрабатывали 4 нМ IL-2, 40 нМ ПЭГ-IL2/N88R/D109C или IL2/N88R/D109C, или эквивалентное количество малеимидо-ПЭГ подвергали взаимодействию с L-цистеином в течение 10 мин при 37°C, а затем фиксировали фиксирующим буфером Cytofix при 37°C в течение 10 мин. Фиксированные клетки пермеабилizировали буфером Perm (BD Biosciences, Santa Clara, CA) в течение 30 мин на льду, промывали и затем окрашивали смесью антител анти-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA), анти-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) и анти-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) в течение 30 мин при 20°C, промывали и анализировали с помощью FACS на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences).

Результаты этого эксперимента показали, что оба варианта IL2/N88R/C125S/D109C и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ селективно активировали небольшую субпопуляцию клеток CD4 + CD25^{high}, обогащенных Treg клетками, по сравнению с IL-2 (фиг. 2). IL-2 активировали более 80% CD4+ Т-клеток при 4 нМ IL-2, с высокой долей активированных клеток, экспрессирующих низкие уровни или совсем не экспрессирующих CD25. Эти результаты указывают на то, что пегелированный IL2/N88R/C125S/D109C сохраняет селективную способность активировать Treg.

5. Избирательность белка конъюгата IL2 селективный агонист-ПЭГ в человеческих PBMC

Для определения селективности IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ в более широком биологическом контексте был разработан анализ для измерения активации STAT5 во всех основных типах иммунцитов в необработанных нефракционированных человеческих PBMC. Человеческие PBMC, полученные от нормальных добровольцев, выделяли центрифугированием на центрифуге Ficoll-Нураque. 10⁶ PBMC суспендировали в средах X-VIVO15 с глюкозой (Lonza) и 10% FBS (Omega), и обрабатывали 10⁻⁸М тестируемыми белками в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки обрабатывали набором буферов для окрашивания Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (EBIO) в соответствии с инструкциями изготовителя. После чего клетки фиксировали буфером Cytofix и пермеабилizировали буфером Perm Buffer III, как описано в примере 3.

Фиксированные и пермеабилizированные клетки затем промывали 1% FBS/PBS и окрашивали смесью антител в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. Окрашенные клетки промывали в 1% FBS/PBS, ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном цитометре Fortessa (BD Biosciences). Смесью антител состояла из: анти-CD4-PerCP-Cy5.5 (BD, #560650), анти-pSTAT5-AF-488 (BD, #612598), анти-CD25-PE (BD, #560989), анти-CD56-PE-CF594 (BD, #562328), анти-FOXP3-AF647 (BD, #560889), анти-CD3-V450 (BD, #560366), и анти-CD8-BV650 (BioLegend, #301041). Эта процедура окрашивания позволила отслеживать уровни pSTAT5 в 7 основных типах иммунцитов.

Фенотипы клеток определяли следующим образом: Treg клетки: CD3+, CD4+, Foxp3+, CD25^{high}, CD8-, CD56-; активированные CD4 Teff клетки: CD3+, CD4+, Foxp3-, CD25^{high}, CD8-, CD56-; CD4 Teff клетки: CD3+, CD4+, Foxp3-, CD25^{low}, CD8-, CD56-; NKT клетки: CD3+, CD4-, Foxp3-, CD25^{low}, CD8-, CD56+; NK-клетки: CD3-, CD4-, Foxp3-, CD25^{low}, CD8-, CD56+; В клетки: CD3-, CD4-, Foxp3-, CD25^{low}, CD8-, CD56-.

Белки были протестированы в данном анализе при концентрации 10⁻⁵ М. Результаты, приведенные на фиг. 5, показывают, что оба варианта IL2/N88R/C125S/D109C и IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ показали хорошую селективность по сравнению с wtIL2, которые активировали pSTAT5 в крупных фракциях всех популяций клеток; IL-2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ стимулировали сигнал pSTAT5 в популяции Treg, по существу, на том же уровне, что и wtIL-2. Дополнительный анализ (не показан) показал, что pSTAT5+

NK клетки были CD25^{high}, что характерно для NK-CD56^{high} клеток, субпопуляции NK-клеток, которая также имеет иммунорегуляторную активность (Poli A, et al., 2009 Immunology. 126(4):458-65). Эти результаты демонстрируют активность и высокую селективность IL2/N88R/C125S/D109C-ПЭГ по отношению к Treg в сложной биологической среде.

Список последовательности

```

<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 133
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<400> SEQUENCE: 1
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариантный белок IL-2, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1 и содержащей замену D109C и обладающий способностью активировать Т-клетки.

2. Белок по п.1, имеющий более чем 98% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

3. Белок по п.1, имеющий полиэтиленгликолевый фрагмент, соединенный с цистеином в положении 109, причем полиэтиленгликолевый фрагмент имеет молекулярную массу от 5 до 40 кДа.

4. Вариантный белок IL-2 по п.1, где белок IL-2 содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L и Q126F.

5. Вариантный белок IL-2 по п.4, дополнительно содержащий замену C125S.

6. Вариантный белок IL-2 по п.3, где последовательность белка IL-2 содержит замену N88R и замену C125S.

7. Вариантный белок IL-2 по п.6, имеющий по меньшей мере 98% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

8. Фармацевтическая композиция для активации Т-клеток, содержащая пегилированный белок по п.3 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ увеличения периода полувыведения из кровотока человеческого вариантного белка IL-2, включающий связывание белка по п.1 с полиэтиленгликолевым фрагментом на цистеиновом остатке в положении 109, причем полиэтиленгликолевый фрагмент имеет длину, достаточную для увеличения периода полувыведения из кровотока белка по сравнению с тем же самым белком, который не связан с полиэтиленгликолевым фрагментом.

10. Способ по п.9, где белок имеет более чем 98% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

11. Способ по п.9, где белок имеет полиэтиленгликолевый фрагмент, соединенный с цистеином в положении 109 и имеющий молекулярную массу от 5 до 40 кДа.

12. Способ по п.9, где белок содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, со-

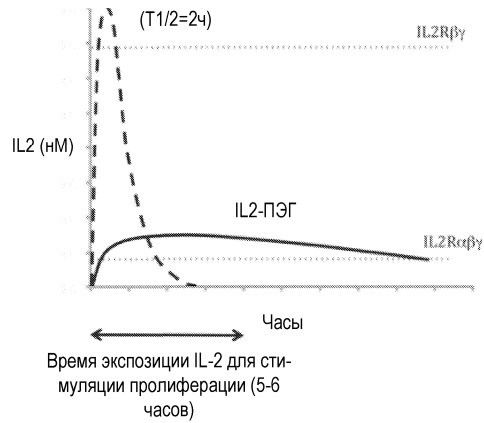
стоящей из: N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L и Q126F.

13. Способ по п.12, где белок дополнительно содержит замену С125S.

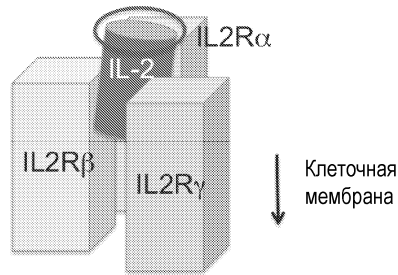
14. Способ по п.12, где белок содержит замену N88R и замену С125S.

15. Способ по п.12, где белок имеет по меньшей мере 98% идентичность последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

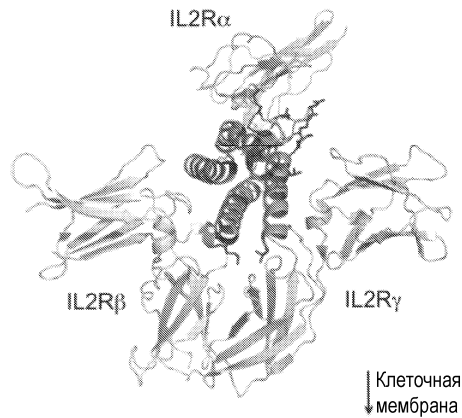
16. Способ по п.9, где белок, связанный с полиэтиленгликолевым фрагментом, вводят в фармацевтически эффективной дозе, достаточной для стимуляции концентраций человеческих регуляторных Т-клеток.



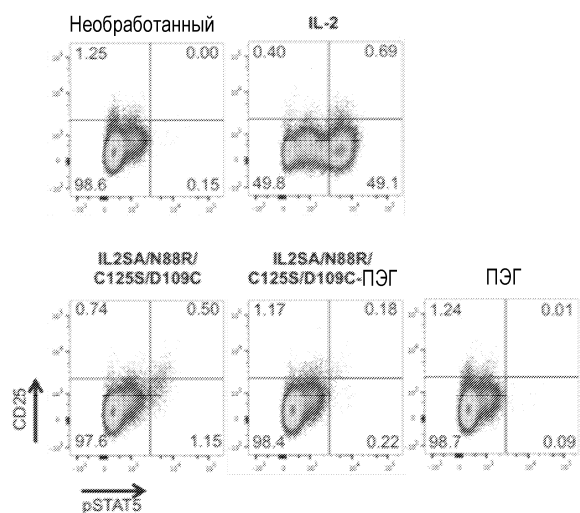
Фиг. 1



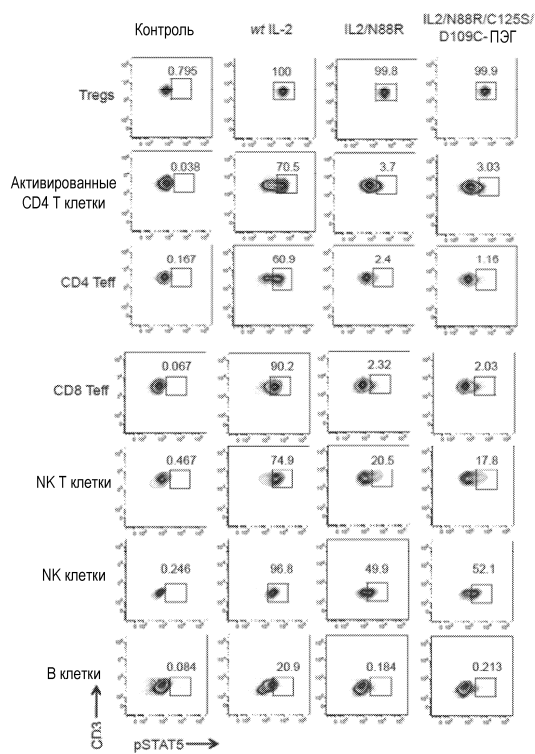
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5