

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091045** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.09.01

(22) Дата подачи заявки
2018.11.28

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) **МУТЕИНЫ ИЛ-2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/595,357; 62/675,972; 16/109,875;
16/109,897; 62/721,644

(32) 2017.12.06; 2018.05.24; 2018.08.23;
2018.08.23; 2018.08.23

(33) US

(86) PCT/US2018/062808

(87) WO 2019/112854 2019.06.13

(71) Заявитель:
ПАНДИОН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Хиггинсон-Скотт Нейтан, Вайни
Джоанн Л., Висвесвараях Джиотхсна,
Сэмпсон Эрик Роберт, Оттиоби Кевин
Льюис (US)**

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

(57) В настоящей заявке предложены мутеины ИЛ-2, содержащие их композиции и способы их применения.

Мутеин ИЛ-2



202091045
A1

202091045
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562870EA/011

МУТЕИНЫ IL-2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/721 644, поданной 23 августа 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/675 972, поданной 24 мая 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/595 357, поданной 6 декабря 2017 г., обычной заявке на патент США № 16/109 875, поданной 23 августа 2018 г. и обычной заявке на патент США № 16/109 897, поданной 23 августа 2018 г., содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, относятся к белкам, называемым мутеины IL-2, содержащим их композициям и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

IL-2 связывает три субъединицы трансмембранного рецептора: IL-2R β и IL-2R γ , которые вместе активируют внутриклеточные события передачи сигналов при связывании IL-2, и CD25 (IL-2R α), который служит для представления IL-2 другим 2 субъединицам рецептора. Сигналы, доставляемые IL-2R $\beta\gamma$, включают сигналы путей PI3-киназы, Ras-MAP-киназы и STAT5.

T-клеткам требуется экспрессия CD25 для ответа на низкие концентрации IL-2, которые обычно существуют в тканях. T-клетки, которые экспрессируют CD25, включают как CD4⁺ FOXP3⁺ регуляторные T-клетки (клетки T-reg), которые необходимы для подавления аутоиммунного воспаления, так и FOXP3⁻ T-клетки, которые были активированы для экспрессии CD25. FOXP3⁻ CD4⁺ эффекторные T-клетки (T-eff) могут быть либо CD4⁺, либо CD8⁺ клетками, каждая из которых может быть провоспалительной и могут способствовать развитию аутоиммунного заболевания и других заболеваний, при которых иммунная система субъекта атакует орган или другие ткани. IL-2-стимулированная передача сигналов STAT5 имеет решающее значение для нормального роста и выживания T-reg клеток, а также для высокого уровня экспрессии FOXP3.

По причине низкой аффинности, которой обладает IL-2 к каждой из трех цепей IL-2R, дальнейшее снижение аффинности к IL-2R β и IL-2R γ может быть компенсировано повышенной аффинностью к CD25. Были созданы мутационные варианты IL-2. Данные мутанты IL-2 могут называться мутеинами IL-2 и было обнаружено, что они являются применимыми при лечении различных заболеваний. Однако все еще существует потребность в дополнительных мутеинах IL-2, которые можно использовать в различных применениях и композициях. Настоящие варианты осуществления удовлетворяют эти, а также и другие потребности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления предложены пептиды, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где пептид содержит мутацию в положении 73, 76, 100 или 138.

В некоторых вариантах осуществления предложены пептиды, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где пептид содержит мутацию в положении 53, 56, 80 или 118.

В некоторых вариантах осуществления предложены пептиды, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, где по меньшей мере один из X₁, X₂ и X₃ и X₄ представляет собой I, а остальные представляют собой L или I.

Также предложены содержащие их фармацевтические композиции и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки, описанные в настоящем документе. В настоящем документе также предложены векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложены плазмиды, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую белки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложены клетки, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы или плазмиды, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах предложены способы активации регуляторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение в контакт регуляторной Т-клетки с пептидом, описанным в настоящем документе, или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения воспалительного заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту, включая, без ограничения, субъекта, нуждающегося в этом, пептида (*например*, терапевтически эффективное количество пептида).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы способствования или стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту пептида (*например*, терапевтически эффективное количество пептида).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР:

На фиг. 1 проиллюстрирован неограничивающий вариант осуществления мутеина ПЛ-2, предложенного в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе описаны терапевтические средства, которые способны модулировать (*например*, повышать) пролиферацию, выживание, активацию и/или функцию клеток Т-reg. В некоторых вариантах осуществления модуляция является селективной или специфичной для клеток Т-reg.

В контексте настоящего документа термин «селективный» относится к терапевтическому средству или белку, модулирующему активность в клетках Т-reg, но

который обладает ограниченной или недостаточной способностью стимулировать активность в нерегуляторных Т-клетках.

В некоторых вариантах терапевтическое средство представляет собой мутант IL-2. Мутант IL-2 может называться мутеином IL-2. IL-2 может существовать в двух разных формах: незрелая форма и зрелая форма. Зрелая форма - это форма, в которой была удалена лидерная последовательность. Это осуществляется во время посттрансляционного процесса. Ниже представлена последовательность дикого типа незрелого IL-2:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK
LTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE
LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 1).

Ниже представлена последовательность дикого типа зрелого IL-2:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELK
HLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT (последовательность зрелого IL-2) (SEQ ID NO: 2).

Молекула мутеина IL-2 может быть получена путем мутации одного или более остатков IL-2. Неограничивающие примеры мутеинов IL-2 можно найти в WO2016/164937, US9580486, US7105653, US9616105, US 9428567, US2017/0051029, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428A2, WO2016025385A1 и US20060269515, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления удален аланин в положении 1 приведенной выше последовательности (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит серин, замещенный цистеином в положении 125 последовательности зрелого IL-2. Другие комбинации мутаций и замен, которые представляют собой молекулы мутеина IL-2, описаны в US20060269515, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления цистеин в положении 125 также замещен валином или аланином. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену V91K. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену N88D. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену N88R. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену H16E, D84K, V91N, N88D, V91K или V91R, любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления эти молекулы мутеина IL-2 также содержат замену в положении 125, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из: T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20H, D20I, D20Y, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88I, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R,

E95G и Q126. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность молекулы мутеина IL-2 отличается от аминокислотной последовательности, представленной в последовательности зрелого IL-2 с заменой C125A или C125S и с одной заменой, выбранной из T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88I, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R, E95G, Q126I, Q126L и Q126F. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 отличается от аминокислотной последовательности, представленной в последовательности зрелого IL-2 с заменой C125A или C125S и с одной заменой, выбранной из D20H, D20I, D20Y, D20E, D20G, D20W, D84A, D84S, H16D, H16G, H16K, H16R, H16T, H16V, I92K, I92R, L12K, L19D, L19N, L19T, N88D, N88R, N88S, V91D, V91G, V91K и V91S. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутации N88R и/или D20H.

В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит мутацию в полипептидной последовательности в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислоты 30, аминокислоты 31, аминокислоты 35, аминокислоты 69 и аминокислоты 74. В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 30 представляет собой N30S. В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 31 представляет собой Y31H. В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 35 представляет собой K35R. В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 69 представляет собой V69A. В некоторых вариантах осуществления мутация в положении 74 представляет собой Q74P. В некоторых вариантах осуществления мутеин не содержит мутации в положении 30, 31 и/или 35.

В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену, выбранную из группы, состоящей из: N88R, N88I, N88G, D20H, D109C, Q126L, Q126F, D84G или D84I относительно последовательности зрелого человеческого IL-2, представленной выше. В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 содержит замену D109C и одну или обе из замен N88R и C125S. В некоторых вариантах осуществления цистеин, который расположен в молекуле мутеина IL-2 в положении 109, связан с фрагментом полиэтиленгликоля, где фрагмент полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу от около 5 до около 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления мутеин не содержит мутации в положении 109, 126 или 84.

В некоторых вариантах осуществления любые из описанных в настоящем документе замен объединяются с заменой в положении 125. Замена может представлять собой замену C125S, C125A или C125V. В некоторых вариантах осуществления мутеин не содержит мутации в положении 125.

Представленная в настоящем документе нумерация, если не указано иное для мутеинов IL-2, относится к зрелой последовательности. Если последовательность или

положение относится к SEQ ID NO: 1, это незрелая последовательность. Однако, чтобы транспонировать положения из незрелой последовательности (SEQ ID NO: 1) в зрелую последовательность (SEQ ID NO: 2), все, что нужно сделать, это вычистить 20 из положения, указанной в SEQ ID NO: 1, чтобы получить соответствующее положение в SEQ ID NO: 2.

В дополнение к описанным в настоящем документе заменам или мутациям, в некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 имеет замену/мутацию в одном или более положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или положения в одном или более положений 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию в положениях 73 и 76; 73 и 100; 73 и 138; 76 и 100; 76 и 138; 100 и 138; 73, 76 и 100; 73, 76 и 138; 73, 100 и 138; 76, 100 и 138; или в каждом из 73, 76, 100 и 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию в положениях 53 и 56; 53 и 80; 53 и 118; 56 и 80; 56 и 118; 80 и 118; 53, 56 и 80; 53, 56 и 118; 53, 80 и 118; 56, 80 и 118; или в каждом из 53, 56, 80 и 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. Поскольку IL-2 может быть слит или присоединен к другим белкам в контексте настоящего документа, термин соответствует ссылке на SEQ ID NO: 6 или 15 относится к тому, как последовательности будут выравниваться с настройками по умолчанию для программного обеспечения для выравнивания, например, которые можно использовать на веб-сайте NCBI. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой лейцин или изолейцин. Таким образом, мутеин IL-2 может содержать еще один изолейцин в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или положения в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит мутацию в L53, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит мутацию в L56, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит мутацию в L80, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит мутацию в положении L118, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой лейцин или изолейцин. В некоторых вариантах осуществления мутеин также содержит мутацию в положении 69, 74, 88, 125 или любую их комбинацию в этих мутеинах, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию V69A. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию Q74P. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию N88D или N88R. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию C125A или C125S.

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию в еще одном из положений 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145, которые соответствуют SEQ ID NO: 1 или в еще одном из положений 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 и 125, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. Замены могут использоваться отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит замены в положениях 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9 или в каждом из положений 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145. Неограничивающие примеры таких комбинаций включают, без ограничения, мутацию в положениях 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, и 108; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, и 94; 49, 51, 55, 57, 68, 89, и 91; 49, 51, 55, 57, 68, и 89; 49, 51, 55, 57, и 68; 49, 51, 55, и 57; 49, 51, и 55; 49 и 51; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108, и 145; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, и 108; 51, 55, 57, 68, 89, 91, и 94; 51, 55, 57, 68, 89, и 91; 51, 55, 57, 68, и 89; 55, 57, и 68; 55 и 57; 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108, и 145; 55, 57, 68, 89, 91, 94, и 108; 55, 57, 68, 89, 91, и 94; 55, 57, 68, 89, 91, и 94; 55, 57, 68, 89, и 91; 55, 57, 68, и 89; 55, 57, и 68; 55 и 57; 57, 68, 89, 91, 94, 108, и 145; 57, 68, 89, 91, 94, и 108; 57, 68, 89, 91, и 94; 57, 68, 89, и 91; 57, 68, и 89; 57 и 68; 68, 89, 91, 94, 108, и 145; 68, 89, 91, 94, и 108; 68, 89, 91, и 94; 68, 89, и 91; 68 и 89; 89, 91, 94, 108, и 145; 89, 91, 94, и 108; 89, 91, и 94; 89 и 91; 91, 94, 108, и 145; 91, 94, и 108; 91, и 94; или 94 и 108. Каждая мутация может комбинироваться друг с другом. Те же замены могут быть сделаны в SEQ ID NO: 2, однако нумерация будет соответствующим образом скорректирована, как ясно из настоящего описания (на 20 меньше, чем нумерация для SEQ ID NO: 1 соответствует положениям, представленным в SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1 или эквивалентным положениям в SEQ ID NO: 2 (*например*, положениям 15, 16, 22, 84, 95 и 126). Эти мутации могут сочетаться с другими мутациями лейцина и изолейцина, описанными в настоящем документе, или мутациями в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q или Q146E, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления одна или более из этих замен представляют собой дикий тип. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1 или эквивалентным положениям в SEQ ID NO: 2 (*например*, положениям 15, 16, 22, 84, 95 или 126).

Мутации в этих положениях могут сочетаться с любыми другими описанными в настоящем документе мутациями, включая, без ограничения, замены в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или положения в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 2, описанной здесь и выше. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N49S, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию Y51S или Y51H, которые соответствуют SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию K55R, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах мутеин IL-2 содержит мутацию T57A, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах мутеин IL-2 содержит мутацию K68E, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию V89A, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах

осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N91R, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию Q94P, которая соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N108D или N108R, которые соответствуют SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию C145A или C145S, которые соответствуют SEQ ID NO: 1.

Эти замены могут использоваться отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит каждую из этих замен. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 из этих мутаций. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1 или эквивалентным положениям в SEQ ID NO: 2 (например, положениям 15, 16, 22, 84, 95, 126 и 126).

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N29S, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию Y31S или Y31H, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию K35R, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах мутеин IL-2 содержит мутацию T37A, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах мутеин IL-2 содержит мутацию K48E, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N71R, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию Q74P, которая соответствует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию N88D или N88R, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию C125A или C125S, которые соответствуют SEQ ID NO: 2. Эти замены могут использоваться отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 из этих мутаций. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит каждую из этих замен. В некоторых вариантах осуществления мутеин содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1 или эквивалентным положениям в SEQ ID NO: 2 (например, положениям 15, 16, 22, 84, 95 и 126).

Для любого из мутеинов IL-2, описанных в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления одно или более положений 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или эквивалентные положения в SEQ ID NO: 2 (например, положения 15, 16, 22, 84, 95 и 126) относятся к дикому типу (например, как показано в SEQ ID NO: 1 или 2). В некоторых вариантах осуществления 2, 3, 4, 5, 6 или каждое из положений 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или

эквивалентные положения в SEQ ID NO: 2 (например, положения 15, 16, 22, 84, 95 и 126) относятся к дикому типу.

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит последовательность:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 3)

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит последовательность:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPKATELKHILQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 4)

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит последовательность:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPKATELKHILQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 5)

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит последовательность:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPKATELKHILQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 6)

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе последовательности мутеина IL-2 не содержат лидерной последовательности IL-2. Лидерная последовательность IL-2 может быть представлена последовательностью MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 7). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления последовательности, проиллюстрированные выше, также могут включать пептиды без лидерной последовательности. Хотя SEQ ID NO: 3-6 проиллюстрированы только с мутацией в одном из положений 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 1, или положениях в одном или более из положений 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO 2, пептиды могут содержать 1, 2, 3 или 4 мутации в этих положениях. В некоторых вариантах осуществления замена в каждом положении представляет собой изолейцин или другой тип консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления лейцин в указанных положениях независимо замещен изолейцином, валином, метионином или глицином, аланином, глутамином или глутаминовой кислотой.

В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 SEQ ID NO: 2 содержит следующие мутации: V69A, Q74P, N88D и C125S или C125A, и одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из L53I, L56I, L80I и L118I. В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 содержит две мутации, выбранные из группы, состоящей из L53I, L56I, L80I и L118I. В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 содержит три мутации или каждую из мутаций, выбранных из группы, состоящей из L53I, L56I, L80I и L118I. В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 содержит L53I и L56I, L53I и L80I, L53I и L118I, L56I и L80I, L56I и L118I, L80I и L118I, L53I, L56I и L80I, L53I, L56I и L118I, L56I,

L80I и L118I или L53I, L56I, L80I и L118I. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 не содержит мутаций L53I, L56I, L80I или L118I. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит мутацию T3A.

В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 с последовательностью SEQ ID NO: 2 содержит следующие мутации: V69A, Q74P, N88D и C125S или C125A и одну или более мутаций, таких как, без ограничения консервативными заменами, в областях 45-55, 50-60, 52-57, 75-85, 100-130, 115-125 SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления молекула мутеина IL-2 слита с Fc-областью или другой линкерной областью, как описано в настоящем документе. Примеры таких слитых белков можно найти в US9580486, US7105653, US9616105, US 9428567, US2017/0051029, WO2016/164937, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428A2, WO2016025385A1, US2017/0037102 и US2006/0269515, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит то, что известно по мутациям LALA. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A и L235A (нумерация EU). В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит G237A (нумерация EU). В некоторых вариантах осуществления Fc-область не содержит мутации в положении G237 (нумерация EU). При использовании нумерации Kabat это будет соответствовать L247A, L248A и/или G250A. В некоторых вариантах осуществления с использованием системы нумерации EU Fc-область содержит мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A. Независимо от используемой системы нумерации, в некоторых вариантах осуществления Fc-часть может содержать мутации, которые соответствуют одному или более из этих остатков. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации N297G или N297A (нумерация Kabat). Нумерация Kabat основана на полноразмерной последовательности, но будет использоваться во фрагменте на основе традиционного выравнивания, используемого специалистом в данной области техники для Fc-области (см., например, Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest," US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91, которая включена в настоящий документ посредством ссылки), которая включена в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG. (SEQ
 ID NO: 8)

В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 15)

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 связан с Fc-областью. Неограничивающими примерами линкеров являются глицин/сериновые линкеры. Например, глицин/сериновый линкер может представлять собой или содержать последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9), представлять собой или содержать последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16). Это просто неограничивающий пример, а линкер может иметь различное количество повторов GGGGS (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторов GGGGS (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 связан с Fc-областью с использованием гибкого, жесткого или расщепляемого линкера. Линкер может быть таким, как описано в настоящем документе или как проиллюстрировано в следующей таблице:

Тип	Последовательность
гибкий	GGGGS
гибкий	(GGGGS) ₃
гибкий	(GGGGS) _n (n=1, 2, 3, 4)
гибкий	(Gly) ₈
гибкий	(Gly) ₆
жесткий	(EAAAK) ₃
жесткий	(EAAK) _n (n=1-3)
жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A
жесткий	AEAAAKEAAKA
жесткий	PAPAP
жесткий	(Ala-Pro) _n (10-34 ак)
расщепляемый	дисульфид
расщепляемый	VSQTSKLTRAETVFPDV
расщепляемый	PLGLWA
расщепляемый	RVLAEA
расщепляемый	EDVVCCSMSY

расщепляемый	GGIEGRGS
расщепляемый	TRHRQPRGWE
расщепляемый	AGNRVRRSVG
расщепляемый	RRRRRRRRR
расщепляемый	GFLG
Дипептид	LE

Таким образом, слияние IL-2/Fc может быть представлено формулой $Z_{IL-2M}-L_{gs}-Z_{Fc}$, где Z_{IL-2M} представляет собой мутеин IL-2, как описано в настоящем документе, L_{gs} представляет собой линкерную последовательность, как описано в настоящем документе (например, глицин/сериновый линкер), а Z_{Fc} представляет собой Fc-область, описанную в настоящем документе или известную специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления формула может иметь обратную ориентацию $Z_{Fc}-L_{gs}-Z_{IL-2M}$.

В некоторых вариантах осуществления слияние IL-2/Fc содержит последовательность:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
 LARMLTFKFYMPEKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
 KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
 HTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 11)

В некоторых вариантах осуществления слияние IL-2/Fc содержит последовательность:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
 LARMLTFKFYMPEKATELKHILQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
 KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
 HTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

В некоторых вариантах осуществления слияние IL-2/Fc содержит последовательность:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
 LARMLTFKFYMPEKATELKHILQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLEL
 KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
 HTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 13)

В некоторых вариантах осуществления слияние IL-2/Fc содержит последовательность:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
HTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область SEQ ID NO: 8 заменена на SEQ ID NO: 15.

Описанные в настоящем документе белки также могут быть слиты с другим белком, таким как антитело или терапевтическая молекула другого типа.

В некоторых вариантах осуществления последовательность мутеина IL-2 или слияния IL-2/Fc является такой, как показано в следующей таблице:

SEQ ID NO:	Краткое описание	Аминокислотная последовательность
17	Человеческий IL-2 с мутацией C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
18	Человеческий IL-2 с мутациями C125S и T3A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
19	Человеческий IL-2 с мутациями N88R и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
20	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
21	Человеческий	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR

	IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88D и C125S	MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
22	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88R и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
23	Человеческий IL-2 с мутациями N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
24	Человеческий IL-2 с мутациями L53I, V69A, Q74P, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATEIKHLQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
25	Человеческий IL-2 с мутациями L56I, V69A, Q74P, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHIQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
26	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, L80I, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHIRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
27	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88D, L118I и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FINRWITFSQSIISTLT

28	Fc человеческого IgG1 (N- концевые слияния) с мутациями L234A, L235A и G237A	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
29	Fc человеческого IgG1 (усеченная) с мутацией N297G	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IL-2 C125S- G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IL-2 T3A, C125S-G4Sx3-Fc	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	IL-2 N88R,	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR

	C125S-G4Sx3-Fc	MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKHTTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
33	IL-2 V69A, Q74P, C125S,- G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKHTTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IL-2 N88D V69A, Q74P, C125S-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKHTTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
35	IL-2 N88R V69A, Q74P, C125S-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKHTTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

		VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IL-2 N88D, C125S-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCP PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	IL-2 L53I, N88D, V69A, Q74P, C125S-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TEIKHLQCLEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	IL-2 L56I N88D, V69A, Q74P, C125S-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHIQCLEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	IL-2 L80I N88D	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR

	V69A, Q74P, C125S-G4Sx4-Fc	MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHIRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	IL-2 L118I N88D V69A, Q74P, C125S-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FINRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
41	IL-2 N88D V69A, Q74P, C125S-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSK NFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
42	Fc-G4S-IL-2 N88D V69A, Q74P	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG

		GGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL KLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEALNL APSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
43	IL-2 N88D V69A, Q74P, C125S-G4Sx4- Fc, где по меньшей мере один из X ₁ , X ₂ и X ₃ и X ₄ представляет собой I, а остальные представляют собой L или I.	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATEX ₁ KHX ₂ QCLEELKPLEEALNLAPS KNFHX ₃ RPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFX ₄ NRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG

Можно также считать, что каждый из белков имеет мутации C125S и LALA и/или G237A, как предложено в настоящем документе. Заменой C125 также может быть C125A, как описано в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления последовательности, показанные в таблице или в настоящей заявке, содержат или не содержат одну или более мутаций, которые соответствуют положениям L53, L56, L80 и L118. В некоторых вариантах осуществления последовательности, показанные в таблице или в настоящей заявке, содержат или не содержат одну или более мутаций, которые соответствуют положениям L59I, L63I, I24L, L94I, L96I или L132I или другим заменам в тех же положениях. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой лейцин или изолейцин. В некоторых вариантах осуществления мутеин не содержит другую мутацию, отличную от показанной или описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления не включена Fc-часть слияния. В некоторых вариантах осуществления пептид состоит по существу из мутеина IL-2, предложенного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления белок не содержит Fc-части.

В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий SEQ ID NO: 43, где по меньшей мере один из X₁, X₂, X₃ и X₄ представляет собой I, а остальные представляют собой L или I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₂ и X₃ представляют собой L, а X₄ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₂ и X₄ представляют собой L, а X₃ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, а X₁ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₃ и X₄ представляют собой L, а X₂ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁ и X₂ представляют собой L, а X₃ и X₄ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁ и X₃ представляют собой L, а X₂ и X₄ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁ и X₄ представляют собой L, а X₂ и X₃ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₂ и X₃ представляют собой L, а X₁ и X₄ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₂ и X₄ представляют собой L, а X₁ и X₃ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₃ и X₄ представляют собой L, а X₁ и X₂ представляют собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₂ и X₃ представляют собой L, а X₄ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, а X₁ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₃ и X₄ представляют собой L, а X₂ представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления X₁, X₂ и X₄ представляют собой L, а X₃ представляет собой I.

В некоторых вариантах осуществления мутеин П-2 может иметь формат, проиллюстрированный на фиг. 1. Однако, как описано в настоящем документе, мутеин П-2 в некоторых вариантах осуществления может использоваться без Fc-домена, или Fc-домен связан с N-концом мутеина П-2, в отличие от Fc-домена, связываемого с C-концом мутеина П-2. Описанные в настоящем документе полипептиды также охватывают варианты описанных пептидов. В некоторых вариантах осуществления варианты П-2 содержат аминокислотную последовательность по существу по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, 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% аналогичную последовательностям, предложенным в настоящем документе. Варианты включают варианты, которые описаны в настоящем документе с различными заменами, описанными здесь и выше. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных замен. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой замену G на A, L на I, G на S, K на R или другие типы консервативных замен. В некоторых вариантах осуществления консервативная замена выбрана на основании следующих таблиц:

Основные (положительно заряженные R-группы):	аргинин лизин
----------------------------------------------	------------------

	гистидин
Кислотные (отрицательно заряженные R-группы):	глутаминовая кислота аспарагиновая кислота
Полярные (незаряженные R-группы):	глутамин аспарагин серин треонин цистеин пролин
Неполярные (алифатические R-группы):	глицин аланин валин метионин лейцин изолейцин
Неполярные (ароматические R-группы):	фенилаланин триптофан тирозин

Оригинальный остаток	Замены
Ala	Gly; Ser; Thr
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His; Ser
Asp	Glu; Asn
Cys	Ser, Sec
Gln	Asn; Ser; Asp; Glu
Glu	Asp; Gln; Lys
Gly	Ala; Pro; Asn
His	Asn; Gln; Tyr; Phe
Ile	Leu; Val; Met; Phe
Leu	Ile; Val; Met; Phe
Lys	Arg; Gln;
Met	Leu; Tyr; Ile; норлейцин; Val; Phe

Pro	Бета-гомопролин; Ser; Thr; Ala; Gly; альфа-гомопролин
Phe	Met; Leu; Tyr; Trp
Ser	Thr; Gly; Asn; Asp
Thr	Ser; Asn
Trp	Tyr; Phe;
Tyr	Trp; Phe;
Val	Ile; Leu; Met;Phe

Процент идентичности двух аминокислотных или двух нуклеотидных последовательностей может быть определен путем визуального осмотра и математического расчета или, например, сравнение выполняется путем сравнения информации о последовательности с использованием компьютерной программы. Примером компьютерной программы является пакет программ Genetics Computer Group (GCG; Мэдисон, штат Висконсин) Wisconsin package, версия 10.0, GAP (Devereux et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12: 387-95). Предпочтительные параметры по умолчанию для программы GAP включают: (1) внедрение GCG унарной матрицы сравнения (содержащей значение 1 для идентичностей и 0 для неидентичностей) для нуклеотидов и взвешенной матрицы сравнения аминокислот Грибскова и Берджесса ((1986) Nucleic Acids Res. 14: 6745), как описано в Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, Schwartz and Dayhoff, eds., National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) или других сопоставимых матрицах сравнения; (2) штраф 8 за каждый гэп и дополнительный штраф 2 за каждый символ в каждом гэпе для аминокислотных последовательностей, или штраф 50 за каждый гэп и дополнительный штраф 3 за каждый символ в каждом гэпе для нуклеотидных последовательностей; (3) отсутствие штрафа за внесение конечного гэпа; и (4) отсутствие максимального штрафа за длинные гэпы. Также могут быть использованы другие программы, используемые специалистами в области сравнения последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2, предложенные в настоящем документе, включают белки, которые изменили передачу сигналов через определенные пути, активированные IL-2 дикого типа через IL-2R, и приводят к преимущественной пролиферации/выживанию/активации T-reg.

Мутеины IL-2, предложенные в настоящем документе, могут быть получены с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, в том числе описанного в патенте США № 6 955 807 для получения вариантов IL-2, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Такие способы включают конструирование последовательности ДНК, кодирующей вариант IL-2, и экспрессию этих последовательностей в подходящем трансформированном хозяине, таком как клетка-хозяин. Использование этих способов приведет к получению рекомбинантных белков, как предложено в настоящем документе. Белки также могут быть получены синтетически или

комбинацией синтетически и рекомбинантно продуцируемых фрагментов в клетке, а затем объединением фрагментов с получением целого белка, представляющего интерес.

В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты (*например*, ДНК или РНК) получают путем выделения или синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок. Альтернативно, последовательность П-2 дикого типа может быть выделена и мутирована с использованием рутинных методов, таких как сайт-специфический мутагенез.

Другим способом конструирования последовательности ДНК, кодирующей вариант П-2, может быть химический синтез. Он включает, например, прямой синтез химическим путем пептида последовательности белка, кодирующей вариант П-2, проявляющий свойства, описанные в настоящем документе. Данный способ может включать как природные, так и неприродные аминокислоты в различных положениях. Альтернативно, молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует желаемый белок, может быть синтезирована химическим путем с использованием олигонуклеотидного синтезатора. Олигонуклеотиды конструируют на основе аминокислотной последовательности желаемого белка, которая также может быть выбрана с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в клетке, в которой будет продуцироваться рекомбинантный вариант. Хорошо известно, что генетический код является вырожденным, аминокислота может кодироваться более чем одним кодоном. Соответственно, следует понимать, что для данной последовательности ДНК, кодирующей конкретный белок П-2, будет много вырожденных последовательностей ДНК, которые будут кодировать этот вариант П-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует белки, описанные в настоящем документе. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты будет кодировать сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность может быть выбрана на основании клетки, в которой она будет экспрессирована. В некоторых вариантах осуществления, если клетка-хозяин является прокариотической, молекула нуклеиновой кислоты не содержит сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, если клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, может использоваться сигнальная последовательность. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность П-2.

Молекула нуклеиновой кислоты «кодирует» белок, как подразумевается в данном документе, если молекула нуклеиновой кислоты или ее комплемент содержит кодоны, кодирующие белок.

Термин «рекомбинантный», если он применяется к полипептидам или белкам, означает, что продукция белка зависит по меньшей мере от одного этапа, на котором нуклеиновые кислоты, которые могут кодировать или могут не кодировать белок, вводятся в клетку, в которой они не обнаруживаются в природе.

Различные хозяева (животные или клеточные системы) могут быть использованы для продуцирования белков, описанных в настоящем документе. Примеры подходящих клеток-хозяев включают, без ограничения, бактерии, грибы (включая дрожжи), растения, насекомые, млекопитающие или другие подходящие клетки или клеточные линии животных, а также трансгенных животных или растений. В некоторых вариантах осуществления эти хозяева могут включать хорошо известных эукариотических и прокариотических хозяев, таких как штаммы *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибы, дрожжи, клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), клетки животных, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) и мышинные клетки, такие как NS/O, клетки африканской зеленой мартышки, такие как COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 и BNT 10, и клетки человека, а также клетки растений в тканевой культуре. Для экспрессии в клетках животных можно использовать клетки CHO и клетки COS 7 в культурах, в частности, линию клеток CHO (DHFR-) или линию НКВ.

Конечно, следует понимать, что не все векторы и регулирующие экспрессию последовательности будут функционировать одинаково хорошо в отношении экспрессии последовательностей ДНК, описанных в настоящем документе. Ни один из хозяев не будет одинаково хорошо функционировать с одной и той же системой экспрессии. Однако специалист в данной области техники может выбрать среди этих векторов, регулирующих экспрессию последовательностей и хозяев без проведения ненужных экспериментов. Например, при выборе вектора необходимо учитывать хозяина, поскольку вектор должен реплицироваться в нем. Также следует учитывать количество копий векторов, возможность контролировать это количество копий и экспрессию любых других белков, кодируемых вектором, таких как маркеры антибиотиков. Например, предпочтительные векторы для использования в данном изобретении включают те, которые позволяют ДНК, кодирующей варианты IL-2, амплифицироваться в количестве копий. Такие амплифицируемые векторы хорошо известны в данной области техники.

Векторы и клетки-хозяева

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложены векторы, кодирующие описанные в настоящем документе белки, а также клетки-хозяева, трансформированные такими векторами. Любые нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в настоящем документе белки, могут содержаться в векторе, который может, например, содержать селективируемый маркер и источник репликации для размножения в хозяине. В некоторых вариантах осуществления векторы дополнительно включают подходящие транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, такие как последовательности, полученные из генов млекопитающих, микробов, вирусов или насекомых, функционально связанные с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. Примеры таких регуляторных последовательностей включают промоторы, операторы или энхансеры транскрипции, мРНК-сайты связывания рибосомы и соответствующие последовательности, которые регулируют транскрипцию и трансляцию. Нуклеотидные последовательности функционально связаны, когда регуляторная

последовательность функционально относится к ДНК, кодирующей белок-мишень. Таким образом, нуклеотидная последовательность промотора функционально связана с молекулой нуклеиновой кислоты, если нуклеотидная последовательность промотора направляет транскрипцию молекулы нуклеиновой кислоты.

Клетки-хозяева, которые можно использовать здесь, описаны в настоящем документе.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

В другом аспекте в настоящих вариантах осуществления предложены композиции, например, фармацевтически приемлемые композиции, которые включают терапевтическое соединение (мутеин П-2), описанное в настоящем документе, приготовленное в составе вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Носитель может быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, локального, местного, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композиции по настоящему изобретению могут иметь различные формы. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. В одном варианте осуществления способ введения является парентеральным (например, внутривенный, подкожный, внутривентриальный, внутримышечный). В другом варианте осуществления терапевтическую молекулу вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом варианте осуществления терапевтическую молекулу вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления терапевтическую молекулу вводят локально, например, путем инъекции или местного применения в участок-мишень.

Фразы «парентеральное введение» и «путем парентерального введения» в контексте настоящего документа означают способы введения, отличные от энтерального введения и местного применения, как правило путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриаартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутривентриальные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутриспинальные, эпидуральные и интратеральные инъекции и инфузии.

Терапевтические композиции как правило должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной

структуры, подходящей для высокой концентрации терапевтической молекулы. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения (то есть терапевтической молекулы) в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, при которой получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Продленное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. В определенных вариантах осуществления активное соединение может быть получено с носителем, который защищает соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полилактидная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В определенных вариантах осуществления терапевтическое соединение можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или усваиваемым пищевым носителем. Соединение (и другие ингредиенты, если желательно) также может быть заключено в желатиновую капсулу с твердой или мягкой оболочкой, спрессовано в таблетки или включено непосредственно в рацион субъекта. Для перорального терапевтического введения соединение можно соединять с одним или более вспомогательными веществами и применять в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, капсул-имплантатов и тому подобного. Для введения соединения по настоящему изобретению посредством способов введения, отличных от парентерального, может быть необходимо покрытие соединения или совместное введение соединения с материалом,

предотвращающим его инактивацию. Терапевтические композиции также можно вводить с помощью медицинского устройства, известного в данной области техники.

Схемы дозировки подбираются так, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, может быть введена одноразовая доза, несколько разделенных доз могут вводиться с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как указано в зависимости от терапевтической ситуации. В частности, может быть выгодным приготовление парентеральных композиций в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозировки. В контексте данного документа единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимое терапевтическое действие, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для единичных дозированных форм согласно изобретению обусловлены и напрямую зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического действия, и (b) ограничений, свойственных области техники составления соединений, например, активного соединения для лечения чувствительности у индивидов.

Иллюстративный неограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективного количества терапевтического соединения составляет 0,1-30 мг/кг, более предпочтительно 1-25 мг/кг. Дозировки и терапевтические схемы для терапевтического соединения могут быть определены специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение вводят путем инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе от около 1 до 40 мг/кг, например, от 1 до 30 мг/кг, например, от около 5 до 25 мг/кг, от около 10 до 20 мг/кг, от около 1 до 5 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 5 до 15 мг/кг, от 10 до 20 мг/кг, от 15 до 25 мг/кг или около 3 мг/кг. График дозирования может варьироваться, например, один раз в неделю, один раз каждые 2, 3 или 4 недели, или, в некоторых вариантах осуществления график дозирования может составлять один раз в месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца или каждые 6 месяцев. В одном варианте осуществления терапевтическое соединение вводят в дозе от около 10 до 20 мг/кг каждую вторую неделю. Терапевтическое соединение может быть введено путем внутривенной инфузии со скоростью более 20 мг/мин, например, 20-40 мг/мин, и, как правило, более или равной 40 мг/мин для достижения дозы от около 35 до 440 мг/м², как правило от около 70 до 310 мг/м² и более типично от около 110 до 130 мг/м². В вариантах осуществления скорость инфузии от около 110 до 130 мг/м² достигает уровня около 3 мг/кг. В других вариантах осуществления терапевтическое соединение можно вводить путем внутривенной инфузии со скоростью менее 10 мг/мин, например, менее или равной 5 мг/мин для достижения дозы от около 1 до 100 мг/м², например, от около 5 до 50 мг/м², от около 7 до 25 мг/м² или около 10 мг/м². В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение вводят в течение периода, составляющего около 30 минут. Следует отметить, что значения доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести

состояния, которое должно быть облегчено. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением лица, управляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны дозировок, указанных в настоящем документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» терапевтической молекулы по изобретению. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы может варьироваться в зависимости от таких факторов, как статус заболевания, возраст, пол и вес индивидуума и способность терапевтического соединения вызывать желательный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также является таким, в котором любые токсичные или вредные эффекты терапевтической молекулы перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Терапевтически эффективная дозировка» предпочтительно ингибирует измеримый параметр, например, иммунную атаку, по меньшей мере на около 20%, более предпочтительно по меньшей мере на около 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на около 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере на около 80% по отношению к субъектам, не получавшим лечение. Способность соединения ингибировать измеримый параметр, например иммунную атаку, может быть оценена на системе животных моделей, которая может предсказать эффективность при отторжении трансплантата или аутоиммунных заболеваниях. Альтернативно, данное свойство композиции может быть оценено путем тестирования способности соединения ингибировать такое ингибирование *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в данной области техники.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше чем терапевтически эффективное количество.

Также в объем изобретения входит набор, содержащий терапевтическое соединение, описанное в настоящем документе. В набор могут входить один или более других элементов, в том числе: инструкция по применению; другие реагенты, например, метка, терапевтический агент или агент, пригодный для хелатирования или иного связывания терапевтической молекулы с меткой или другим терапевтическим агентом или противолучевой композицией; устройства или другие материалы для получения

терапевтической молекулы для введения; фармацевтически приемлемые носители; и устройства или другие материалы для введения субъекту.

Комбинации

Описанные в настоящем документе белки также можно вводить в сочетании с другими агентами, применимыми для лечения состояния, от которого страдает пациент. Примеры таких агентов включают как белковые, так и небелковые препараты. При совместном введении нескольких терапевтических средств дозировки могут быть соответствующим образом скорректированы, как это известно в соответствующей области техники. «Совместное введение» и комбинированная терапия не ограничиваются одновременным введением, но также включают схемы лечения, в которых T-reg-селективный белок IL-2 вводят по меньшей мере один раз в течение курса лечения, который включает введение пациенту по меньшей мере одного другого терапевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления T-reg-селективный белок IL-2 вводят в комбинации с ингибитором пути PI3-K/AKT/mTOR, например, рапамицином (рапамун, сиролимус). Ингибиторы этого пути в комбинации с IL-2 способствуют обогащению T-reg. В некоторых вариантах осуществления белок IL-2 вводят без другого терапевтического средства, которое напрямую не слито с или не присоединено к белку IL-2.

Терапевтические методы

«Лечение» любого заболевания, упомянутого в настоящем документе, охватывает ослабление по меньшей мере одного симптома заболевания, снижение тяжести заболевания или задержку или предотвращение прогрессирования заболевания до развития более серьезных симптомов, которые могут в некоторых случаях сопровождать заболевание или по меньшей мере до развития еще одного заболевания. Лечение не обязательно означает, что заболевание полностью излечено. Используемое терапевтическое средство необходимо только для снижения тяжести заболевания, снижения тяжести симптома(-ов), связанных с заболеванием или его лечением, или для отсрочки проявления более серьезных симптомов или развития более серьезного заболевания, которое может возникать с некоторой частотой после пролеченного состояния. Например, если заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, терапевтическое средство может уменьшить количество различных очагов воспаления в кишечнике, общий объем поражения кишечника, снизить степень боли и/или отека, снизить такие симптомы, как диарея, запор или рвота, и/или предотвратить перфорацию кишечника. Состояние пациента может быть оценено с помощью стандартных методов, таких как рентген, выполняемый после бариевой клизмы или энтероклизиса, эндоскопия, колоноскопия и/или биопсия. Подходящие процедуры варьируются в зависимости от состояния и симптомов пациента.

В некоторых вариантах осуществления белки используются для лечения воспалительных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит (например, активный), ювенильный артрит, ювенильный

ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, системное проявление ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, системное проявление ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, обратный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, герпетиформный дерматит, болезнь Бехчета, включая, без ограничения, воздействия на кожу, алопецию, очаговую алопецию, тотальная алопецию, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ) (*например*, активную форму), миастению, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофогит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (*например*, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, болезнь «трансплантат против хозяина», хроническую стероид-рефрактерную болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата (*например*, почки, легкого, сердца, кожи и т. п.), поражение почек, васкулит, вызванный гепатитом С, самопроизвольный аборт, алопецию, витилиго, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), болезнь минимальных изменений, мембранную нефропатию, ANCA-ассоциированную гломерулонефропатию, мембранопролиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатию, волчаночный нефрит и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления белки используются для лечения хронической стероид-рефрактерной болезни «трансплантат против хозяина». В некоторых вариантах осуществления белки используются для лечения активной формы системной красной волчанки. В некоторых вариантах осуществления белки используются для лечения активной формы ревматоидного артрита.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей белки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом, нуждающимся в этом. Любой из описанных выше терапевтических белков может быть введен в форме композиций (*например*, фармацевтических композиций), которые описаны в настоящем документе. Например, композиция может содержать белок IL-2, как описано в настоящем

документе, плюс буфер, антиоксидант, такой как аскорбиновая кислота, низкомолекулярный полипептид (такой как полипептид, содержащий менее 10 аминокислот), белок, аминокислоты, углеводы такие как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующий агент, такой как ЭДТА, глутатион и или другие стабилизаторы, наполнители и/или консерванты. Композиция может быть составлена в виде жидкости или лиофилизата. Дополнительные примеры компонентов, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, представлены в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. sup.th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1980) и других источниках, как описано в настоящем документе.

Для лечения представляющего интерес заболевания композиции, содержащие терапевтические молекулы, описанные в настоящем документе, можно вводить любым подходящим способом, включая, без ограничения, парентеральное, местное, пероральное, назальное, вагинальное, ректальное или легочное (путем ингаляции) введение. В случае инъекции композицию(и) можно вводить внутрисуставно, внутривенно, внутриаартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно или подкожно путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Предполагается локализованное введение, то есть в месте заболевания, а также трансдермальная доставка и замедленное высвобождение из имплантатов, кожных пластырей или суппозиториях. Доставка путем ингаляции включает, например, ингаляцию через нос или через рот, использование небулайзера, ингаляцию в форме аэрозоля и тому подобное. Введение через суппозиторий, вставленный в полость тела, может быть осуществлено, например, путем введения твердой формы композиции в выбранную полость тела и обеспечения ее растворения. Другие альтернативы включают глазные капли, пероральные препараты, такие как пилюли, таблетки, сиропы и жевательную резинку, а также препараты для местного применения, такие как лосьоны, гели, спреи и мази. В большинстве случаев терапевтические молекулы, которые являются полипептидами, можно применять местно или вводить путем инъекции или ингаляции.

При выполнении способов лечения терапевтические молекулы, описанные выше, можно вводить, как описано здесь и выше. Например, композицию можно вводить в любой дозировке, с любой частотой и продолжительностью, которые могут быть эффективными для лечения состояния, подлежащего лечению. Дозировка зависит от молекулярной природы терапевтической молекулы и природы заболевания, подлежащего лечению. Лечение может продолжаться на протяжении периода времени, необходимого для достижения желаемых результатов. Терапевтические молекулы по изобретению, среди других возможных схем дозирования, можно вводить в виде одной дозы или в виде серии доз, вводимых периодически, включая несколько раз в сутки, ежедневно, через сутки, два раза в неделю, три раза в неделю, еженедельно, каждую вторую неделю и ежемесячно. Периодичность лечения может быть постоянной или может не быть постоянной на протяжении всего курса лечения. Например, лечение может первоначально происходить с недельными интервалами, а позже - через неделю. В рамки изобретения входит лечение, охватывающее сутки, недели, месяцы или годы. Лечение может быть прекращено, а затем

возобновлено. Поддерживающие дозы могут быть введены или могут не быть введены после первоначального лечения.

Дозировка может быть измерена в миллиграммах на килограмм массы тела (мг/кг) или в миллиграммах на квадратный метр поверхности кожи (мг/м²) или может быть в виде фиксированной дозы, независимо от роста или веса. Все они являются стандартными единицами дозирования в данной области техники. Площадь поверхности кожи человека рассчитывается по росту и весу человека по стандартной формуле.

В настоящем документе также предложены способы способствования стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества пептида, описанного в настоящем документе, или содержащей его фармацевтической композиции.

В контексте настоящего документа выражение «нуждающийся в этом» означает, что субъект (животное или млекопитающее) был идентифицирован как имеющий потребность в конкретном способе или лечении. В некоторых вариантах осуществления идентификация может проводиться путем применения любого диагностического средства. В любом из способов и вариантов лечения, описанных в настоящем документе, животное или млекопитающее могут нуждаться в этом. В некоторых вариантах осуществления животное или млекопитающее находятся в среде или будут переведены в среду, в которой преобладает конкретное заболевание, расстройство или состояние.

Если не определено иное, все технические и научные термины имеют такое же значение, которое как правило понятно специалисту в области техники, к которой относятся варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе.

В контексте настоящего документа формы единственного числа означают «по меньшей мере один» или «один или более», если из контекста явно не следует иное.

В контексте настоящего документа термин «около» означает, что числовое значение является приблизительным, и небольшие изменения не окажут существенного влияния на практику раскрытых вариантов осуществления. При использовании числового ограничения, если контекст не указывает на иное, «около» означает, что числовое значение может варьироваться на $\pm 10\%$ и оставаться в пределах объема раскрытых вариантов осуществления.

В контексте настоящего документа термин «индивидуум» или «субъект», или «пациент», используемые взаимозаменяемо, означает любое животное, включая млекопитающих, таких как мыши, крысы, другие грызуны, кролики, собаки, кошки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, лошади или приматы, такие как люди.

В контексте настоящего документа термины «содержащий» (и любая форма слова «содержащий», такая как «содержат», «содержит» и «состоящий»), «имеющий» (и любая форма слова «имеющий», такая как «имеют» и «имеет»), «включая» (и любая форма слова «включая», такая как «включает» и «включают») или «охватывающий» (и любая форма слова «охватывающий», такая как «охватывает» и «охватывают») являются включающими

или неограничивающими, и не исключают дополнительные не перечисленные элементы и/или этапы способов. Можно также сказать, что любой этап или композиция, в которых используется переходная фраза «содержать» или «содержащий», описывает то же самое, что и переходная фаза «состоит из» или «состоит».

В контексте настоящего документа термин «приведение в контакт» означает объединение двух элементов в системе *in vitro* или системе *in vivo*. Например, «приведение в контакт» пептида или композиции, описанных в настоящем документе, с клеткой T-reg или с индивидуумом, или пациентом, или клеткой включает введение соединения индивидууму или пациенту, такому как человек, а также, например, введение соединения в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий клетку T-reg.

В контексте настоящего документа термин «слитый» или «связанный» при использовании в отношении белка, имеющего разные домены или гетерологичные последовательности, означает, что белковые домены являются частью одной и той же пептидной цепи, которые связаны друг с другом либо посредством пептидных связей, либо посредством другого ковалентного связывания. Домены или секции могут быть связаны или слиты напрямую друг с другом, или другая последовательность доменов или пептидов может находиться между двумя доменами или последовательностями, а такие последовательности все же будут считаться слитыми или связанными друг с другом. В некоторых вариантах осуществления различные домены или белки, представленные настоящим документе, связаны или слиты напрямую друг с другом, или линкерные последовательности, такие как глицин/сериновые последовательности, описанные в настоящем документе, связывают два домена вместе.

В некоторых вариантах осуществления варианты осуществления, предложенные в данном документе, также включают, без ограничения, следующие:

1. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где пептид содержит мутацию в положении 73, 76, 100 или 138.
2. Пептид по варианту осуществления 1, где мутация представляет собой мутацию L-I в положении 73, 76, 100 или 138.
3. Пептид по варианту осуществления 1, где пептид дополнительно содержит мутацию в одном или более положениях 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145.
4. Пептид по варианту осуществления 1, дополнительно содержащий мутацию в одном или более положениях E35, H36, Q42, D104, E115 или Q146 или 1, 2, 3, 4, 5 или каждый из E35, H36, Q42, D104, E115 или Q146 относится к дикому типу.
5. Пептид по варианту осуществления 4, где мутация представляет собой одну или более из E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q или Q146E.
6. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-5, где пептид содержит мутацию N49S.
7. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-6, где пептид содержит мутацию Y51S или Y51H.
8. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-7, где пептид содержит

мутацию K55R.

9. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-8, где пептид содержит мутацию T57A.

10. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-9, где пептид содержит мутацию K68E.

11. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-10, где пептид содержит мутацию V89A.

12. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-11, где пептид содержит мутацию N91R.

13. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-12, где пептид содержит мутацию Q94P.

14. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-13, где пептид содержит мутацию N108D или N108R.

15. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-14, где пептид содержит мутацию C145A или C145S.

15.1. Пептид по любому из вариантов осуществления 1-15, где пептид содержит мутацию V89A, Q94P, N108R или N108D и одну или более из мутаций L73I, L76I, L100I, L118I и необязательно мутацию C145A или C145S.

16. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где пептид содержит мутацию в положении 53, 56, 80 или 118.

17. Пептид по варианту осуществления 16, где мутация представляет собой мутацию L-I в положении 53, 56, 80 или 118.

18. Пептид по вариантам осуществления 16-17, где пептид дополнительно содержит мутацию в одном или более из положений 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 и 125.

19. Пептид по варианту осуществления 16, дополнительно содержащий мутацию в одном или более из положений E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 или 1, 2, 3, 4, 5 или каждое из положений E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 относится к дикому типу.

20. Пептид по варианту осуществления 19, где мутация представляет собой одну или более из E15Q, H16N, Q22E, D84N, E95Q или Q126E.

21. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-20, где пептид содержит мутацию N29S.

22. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-21, где пептид содержит мутацию Y31S или Y51H.

23. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-22, где пептид содержит мутацию K35R.

24. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-23, где пептид содержит мутацию T37A.

25. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-24, где пептид содержит мутацию K48E.

26. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-25, где пептид содержит

мутацию V69A.

27. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-26, где пептид содержит мутацию N71R.

28. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-27, где пептид содержит мутацию Q74P.

29. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-28, где пептид содержит мутацию N88D или N88R.

30. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-29, где пептид содержит мутацию C125A или C125S.

31. Пептид по любому из вариантов осуществления 16-30, где пептид содержит мутацию V69A, Q74P, N88R или N88D и одну или более из мутаций L53I, L56I, L80I, L118I и необязательно мутацию C125A или C125S.

32. Пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, где пептид не содержит мутации, которая соответствует положениям 30, 31 и/или 35.

33. Пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, дополнительно содержащий Fc-пептид.

33A. Пептид по варианту осуществления 33, где Fc-пептид содержит мутацию в положении с использованием нумерации Kabat L247, L248 и G250 или с использованием нумерации EU в положениях L234, L235 и G237.

33B. Пептид по варианту осуществления 33, где Fc-пептид содержит следующие мутации: L247A, L248A и G250A (нумерация по Kabat) или L234A, L235A и G237A (нумерация EU).

34. Пептид по варианту осуществления 33, где Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.

35. Пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, дополнительно содержащий линкерный пептид, который связывает пептид SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 и Fc-пептид.

36. Пептид по варианту осуществления 35, в котором линкер содержит последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS или GGGGSGGGGSGGGGS.

37. Пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, где пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17-43.

38. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ. ID. NO: 27.

39. Пептид по варианту осуществления 38, дополнительно содержащий N-концевой лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7.

40. Пептид по варианту осуществления 1, дополнительно содержащий линкерный пептид на C-конце.

41. Пептид по варианту осуществления 40, где линкерный пептид содержит последовательность (GGGGS)_n, где n равно 1, 2, 3 или 4.

42. Пептид по варианту осуществления 41, где n равно 1.

43. Пептид по варианту осуществления 41, где n равно 2.

44. Пептид по варианту осуществления 41, где n равно 3.
45. Пептид по варианту осуществления 41, где n равно 4.
46. Пептид по любому из вариантов осуществления 48-45, дополнительно содержащий Fc-пептид.
47. Пептид по варианту осуществления 46, где Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
48. Пептид по варианту осуществления 47, дополнительно содержащий лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7 на N-конце.
49. Пептид по варианту осуществления 46, где Fc-пептид расположен на C-конце пептида, содержащего SEQ ID NO: 27.
50. Пептид по варианту осуществления 46, где Fc-пептид расположен на N-конце пептида, содержащего SEQ ID NO: 27.
51. Пептид по варианту осуществления 1, дополнительно содержащий линкерный пептид, который связывает пептид SEQ ID NO: 27 и Fc-пептид.
52. Пептид по варианту осуществления 51, где линкерный пептид представляет собой (GGGS)_n, где n равно 1, 2, 3 или 4.
53. Пептид по варианту осуществления 52, где n равно 4.
54. Пептид по вариантам осуществления 51-53, где Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
55. Пептид по вариантам осуществления 51-54, где Fc-пептид расположен на C-конце пептида, содержащего SEQ ID NO: 27.
56. Пептид по вариантам осуществления 51-54, где Fc-пептид расположен на N-конце пептида, содержащего SEQ ID NO: 27.
57. Пептид по варианту осуществления 14, где пептид содержит пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40.
58. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления.
59. Способ активации регуляторных Т-клеток, причем способ включает приведение в контакт регуляторной Т-клетки с пептидом по любому из вариантов осуществления 1-57 или фармацевтической композицией по варианту осуществления 58.
60. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества пептида по любому из вариантов осуществления 1-57 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 58.
61. Способ по варианту осуществления 60, в котором воспалительное заболевание представляет собой воспаление, аутоиммунное заболевание, atopические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, системное проявление ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный

анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, системное проявление ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, обратный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофогит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), хроническую стероид-рефрактерную болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата (*например*, почки, легкого, сердца, кожи и т. п.), поражение почек, васкулит, вызванный гепатитом С, самопроизвольный аборт, алопецию, витилиго, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), болезнь минимальных изменений, мембранную нефропатию, ANCA-ассоциированную гломерулонефропатию, мембранопролиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатию, волчаночный нефрит и тому подобное.

62. Способ способствования или стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества пептида по любому из вариантов осуществления 1-57 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 58.

63. Применение пептида по любому из вариантов осуществления 1-57 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 58 в приготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

64. Применение по варианту осуществления 63, в котором воспалительное заболевание представляет собой воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, системное проявление ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный

анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, системное проявление ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, обратный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофогит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), хроническую стероид-рефрактерную болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата (например, почки, легкого, сердца, кожи и т. п.), поражение почек, васкулит, вызванный гепатитом С, самопроизвольный аборт, алопецию, витилиго, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), болезнь минимальных изменений, мембранную нефропатию, ANCA-ассоциированную гломерулонефропатию, мембранопролиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатию, волчаночный нефрит и тому подобное.

65. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-57.

66. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 65.

67. Плазмида, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 65.

68. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 65.

69. Клетка, содержащая плазмиду по варианту осуществления 67.

70. Клетка, содержащая вектор по варианту осуществления 66.

71. Клетка, содержащая или экспрессирующая пептид по любому из вариантов осуществления 1-57 или пептид, описанный в настоящем документе.

Следующие примеры являются иллюстративными, но не ограничивающими примерами соединений, композиций и способов, описанных в настоящем документе.

Другие подходящие модификации и адаптации, известные специалистам в данной области техники, находятся в пределах объема следующих вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Пример 1.

Терапевтическую композицию, содержащую белок SEQ ID NO: 11, 12, 13 или 14, вводят субъекту, страдающему ВЗК. Иммунная система субъекта подавлена, а симптомы ВЗК облегчены.

Пример 2.

Терапевтическую композицию, содержащую белок SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6, с лидерной последовательностью или без нее, вводят субъекту, страдающему ВЗК. Иммунная система субъекта подавлена, а симптомы ВЗК облегчены.

Пример 3. Получение IL-мутеинов

Вектор рТТ5, содержащий один ген, кодирующий полипептид человеческого IL-2M, слитый на N-конце (SEQ ID NO: 40) или C-конце (SEQ ID NO: 41) с Fc-доменом человеческого IgG1, трансфицировали в клетки HEK293 Expi. Через 5-7 суток супернатанты клеточных культур, экспрессирующие IL-2M, собирали, осветляли центрифугированием и фильтровали через фильтрующее устройство с размером пор 0,22 мкм. IL-2M были захвачены на смоле proA. Смолу промывали ФСБ, pH 7,4, и элюировали захваченный белок, используя 0,25% уксусную кислоту, pH 3,5, с нейтрализацией десятикратным объемом 1M Tris, pH 8,0. Белок переносили в буфер 30 mM HEPES 150 mM NaCl с pH 7 и анализировали методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 \times 3,2/300. Был проведен анализ 5 мкг очищенного материала методом восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза на 4-12% бис-трис-геле. IL-2M экспрессировались при концентрации более 10 мг/л и более 95% было монодисперсным после очистки, как показано методом эксклюзионной хроматографии и восстанавливающего/невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза.

Пример 4. Молекулы IL-2M могут связывать CD25

Планшет для ИФА покрывали CD25 в концентрации 0,5 мкг/мл в ФСБ с pH 7,4, 75 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Лунки три раза промывали ФСБ с pH 7,4, содержащим 0,05% Tween-20 (промывочный буфер), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% БСА в ФСБ с pH 7,4 (блокирующий буфер) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером молекулы IL-2M разводили до одиннадцати двукратных серийных разведений в ФСБ, содержащем 1% БСА и 0,05% Tween-20 (аналитический буфер) с 2 нМ, что являлось самой высокой концентрацией. Разведенный материал добавляли в планшет с покрытием CD25 при концентрации 75 мкл/лунку, и оставляли в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером к планшету добавляли козье биотинилированное поликлональное антитело к IL-2, разведенное до 0,05 μ г/мл в аналитическом буфере, при концентрации 75 мкл/лунку и оставляли в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером к планшету

добавляли стрептавидин HRP, разведенный в аналитическом буфере в соотношении 1:5000, при концентрации 75 мкл/лунку и оставляли в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и 1 промывки промывочным буфером (без Tween-20) анализ проявляли с использованием ТМБ и останавливали с помощью 1 н HCL. ОП измеряли при 450 нм. Эксперимент включал соответствующие контроли для определения неспецифичного связывания молекул IL-2M с планшетом/блоком в отсутствие CD25 и молекулы отрицательного контроля, которая не способна связывать CD25.

Результаты показывают, что при концентрации 2 нМ-1,9 пМ молекулы IL-2M способны связывать CD25 с субнаномолярными EC50. Кроме того, не было обнаружено какого-либо соединения при любой тестируемой концентрации в отсутствие CD25 на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений не взаимодействовало неспецифично с поверхностью планшета (данные не показаны).

Пример 5. Анализ P-STAT5 *in vitro* для определения эффективности и селективности молекул IL-2M. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием пробирок FICOLL-PAQUE Premium и Sepmate из свежевыделенной гепаринизированной цельной крови человека. МКПК культивировали в среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки в присутствии IL-2 или IL-2M дикого типа из примера 12 в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 10 минут с помощью BD Cytotfix.

Фиксированные клетки последовательно пермеабилizировали с помощью BD Perm III, а затем с помощью пермеабилizующего буфера BioLegend FOXP3. После блокирования сывороткой человека в течение 10 минут клетки окрашивали в течение 30 минут антителами к фосфо-STAT5 FITC, CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5, а затем считывали данные на Attune NXT с помощью считывателя планшетов. IL-2M SEQ ID NO: 23 эффективно и селективно индуцирует фосфорилирование STAT5 в T-reg, но не в T-eff.

Пример 6. Иммуногенность мутеинов IL-2

Мутантные последовательности мутеина IL-2 анализировали с использованием программного обеспечения NetMHCIIpan 3.2, которое можно найти по ссылке [www "dot" cbs "dot" dtu "dot" dk/services/NetMHCIIpan/](http://www.dot.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/). Искусственные нейронные сети были использованы для определения аффинности пептидов к аллелям МНС класса II. В этом анализе 9-членные пептиды с потенциально прямым взаимодействием с молекулами МНС класса II были признаны связующими ядрами. Остатки, прилегающие к связующим ядрам, которые могут опосредованно влиять на связывание, также были исследованы как маскирующие остатки. Пептиды, содержащие как связующие ядра, так и маскирующие остатки, были помечены как мощные связующие, когда их прогнозируемое значение K_D для молекулы МНС класса II было ниже 50 нМ. Мощные связующие имеют большую вероятность введения T-клеточной иммуногенности.

Всего в анализ *in silico* было включено 9 аллелей МНСII, которые широко представлены в Северной Америке и Европе. Панель протестированных молекул IL-2M

(мутеинов IL-2) включала мутеины IL-2 с мутациями L53I, L56I, L80I или L118I. Только аллели MHCII DRB1_1101, DRB1_1501, DRB1_0701 и DRB1_0101 дали совпадения с любой из оцененных молекул. Совпадения пептидов для DRB_1501 были идентичны между всеми протестированными конструкциями, включая IL-2 дикого типа с мутацией C125S. Добавление L80I удаляет 1 Т-клеточный эпитоп в случае DRB1-0101 [ALNLAPSKNFHLRPR] и незначительно снижает аффинность двух других Т-клеточных эпитопов [EEALNLAPSKNFHLR и EALNLAPSKNFHLRP]. В случае аллеля MHCII DRB1-0701 L80I удаляет 1 Т-клеточный эпитоп [EEALNLAPSKNFHLR]. Таким образом, данные демонстрируют, что мутеин IL-2, содержащий мутацию L80I, должен быть менее иммуногенным, что является удивительным и неожиданным результатом анализа *in silico*.

Пример 7. Получение дополнительных мутеинов IL-2

Вектор pTT5, содержащий один ген, кодирующий один полипептид IL-2M (мутеин IL-2) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 (и контроль IL-2M; SEQ ID NO: 34) с человеческим IL-2M или IL-2M, слитым на N-конце Fc-домена человеческого IgG1, трансфицировали в клетки HEK293 Expi. Через 5-7 дней собирали супернатанты клеточных культур, экспрессирующие SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 (и контроль IL-2M; SEQ ID NO: 34), и осветляли центрифугированием и фильтрацией через фильтрующее устройство с размером пор 0,22 мкм. SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 (и контроль IL-2M; SEQ ID NO: 34) были захвачены на смоле proA. Смолу промывали ФСБ, pH 7,4, и элюировали захваченный белок, используя 0,25% уксусную кислоту, pH 3,5, с нейтрализацией десятикратным объемом 1M Tris, pH 8,0. Белок переносили в буфер 30 mM HEPES 150 mM NaCl с pH 7 и анализировали методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 3,2/300. Был проведен анализ 5 мкг очищенного материала методом восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза на 4-12% бис-трис-геле.

IL-2M SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 (и контроль IL-2M; SEQ ID NO: 34) экспрессировали при концентрации более 45 мг/л и более 95% было монодисперсным после очистки, как показано методом эксклюзионной хроматографии и восстанавливающего/невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза.

Пример 8. IL-2M могут связывать CD25

Планшет для ИФА покрывали CD25 в концентрации 0,5 мкг/мл в ФСБ с pH 7,4, 75 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Лунки три раза промывали ФСБ с pH 7,4, содержащим 0,05% Tween-20 (промывочный буфер), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% БСА в ФСБ с pH 7,4 (блокирующий буфер) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером IL-2M SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 разводили до одиннадцати двукратных серийных разведений в ФСБ, содержащем 1% БСА и 0,05% Tween-20 (аналитический буфер) с 2 нМ, что являлось самой высокой концентрацией. Разведенный материал добавляли в планшет с покрытием CD25 при концентрации 75 мкл/лунку, и оставляли в

течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером к планшету добавляли козье биотинилированное поликлональное антитело к IL-2, разведенное до 0,05 мкг/мл в аналитическом буфере, при концентрации 75 мкл/лунку и оставляли в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером к планшету добавляли высокочувствительный стрептавидин HRP, разведенный в аналитическом буфере в соотношении 1:5000, при концентрации 75 мкл/лунку и оставляли в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и 1 промывки промывочным буфером (без Tween-20) анализ проявляли с использованием ТМБ и останавливали с помощью 1 н HCL. ОП измеряли при 450 нм. Эксперимент включал соответствующие контроли для определения неспецифичного связывания молекул с планшетом/блоком в отсутствие CD25. Результаты показывают, что при концентрациях 2 нМ-1,9 мкМ мутеины из примера 7 были способны связывать CD25 с субнанолярными EC50. Кроме того, не было обнаружено какого-либо соединения при любой тестируемой концентрации в отсутствие CD25 на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений не взаимодействовало неспецифично с поверхностью планшета. Таким образом, мутеины из примера 7 могут связываться с CD25.

Пример 9. Мутеины IL-2 из примера 7 являются эффективными и селективными.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием пробирок FICOLL-PAQUE Premium и Sepmate из свежевыделенной гепаринизированной цельной крови человека. МКПК культивировали в среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки в присутствии IL-2 дикого типа или мутеинов из примера 7 в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 10 минут с помощью BD Cytotfix. Фиксированные клетки последовательно пермеабелизировали с помощью BD Perm III, а затем с помощью пермеабелизирующего буфера BioLegend FOXP3. После блокирования сывороткой человека в течение 10 минут клетки окрашивали в течение 30 минут антителами к фосфо-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5 (все BD), а затем считывали данные на Attune NXT с помощью считывателя планшетов. Было обнаружено, что мутеины IL-2 из примера 7 являются эффективными и обладают селективностью в отношении T-reg против T-eff. Было обнаружено, что мутеин, содержащий мутацию L118I, обладает повышенной активностью и селективностью по сравнению с другими мутеинами.

Пример 10. Мутеины IL-2 расширяют T-reg у гуманизированных мышей

Мыши линии NSG, гуманизированные человеческими гематопозитическими стволовыми клетками CD34+, были приобретены у Jackson Labs. На 0 и 7 сутки мышам подкожно вводили 1 мкг мутеина IL-2 SEQ ID NO: 34 или других мутеинов IL-2 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40. На 7-е сутки мышам умерщвляли и отбирали цельную кровь и селезенку. Цельную кровь разделяли на аликвоты в 96-луночный планшет с глубокими лунками и фиксировали в течение 10 минут с использованием BD Fix Lyse. Спленциты выделяли с использованием фильтров с

размером пор 70 мкм (BD), а эритроциты лизировали с использованием буфера для лизиса RBC от компании BioLegend. После промывки ФСБ с 2% фетальной бычьей сыворотки спленоциты окрашивали с помощью набора для окрашивания живых/мертвых клеток в ближнем ИК-диапазоне (Invitrogen) в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 20 минут с использованием фиксирующего буфера BioLegend. Затем клетки цельной крови и спленоциты пермеабилizировали с помощью пермеабилizирующего буфера BioLegend FOXP3, блокировали человеческой сывороткой и окрашивали в течение 30 минут антителами к человеческому CD8a FITC (BL), человеческому CD25 PE (BD), человеческому FOXP3 AF647 (BD) CD4 PerCP Cy5.5 (BD), человеческому Siglec-8 PE Cy7 (BL), человеческий CD3 BV421 (BL), человеческий CD45 BV605 (BL), человеческому CD56 BV785 (BL) и мышинному CD45 (BV711) и получали на Attune NXT с использованием устройства для загрузки планшетов.

По сравнению с контролем носителем IL-2M SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, а также SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 избирательно индуцировали человеческие T-reg в селезенке мыши и цельной крови у гуманизированных мышей. Не наблюдалось значительных изменений в частотах человеческих NK-клеток CD56+, T-клеток CD3+, цитотоксических T-лимфоцитов CD8+, хелперных T-клеток CD4+ или эффекторных T-клеток CD25lo/FOXP3-. Эти результаты показывают, что мутеины IL-2 увеличивают частоту регуляторных T-клеток.

Пример 11. Длительность передачи сигналов, индуцированных мутеинами IL-2

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием пробирок FICOLL-PAQUE Premium и Sepmate из свежесывороточной гепаринизированной цельной крови человека. МКПК культивировали в среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки в присутствии IL-2M в течение 60 минут. Затем клетки промывали 3 раза и инкубировали в течение дополнительных 3 часов. Затем клетки фиксировали в течение 10 минут с помощью BD Cytotfix. Фиксированные клетки последовательно пермеабилizировали с помощью BD Perm III, а затем с помощью пермеабилizирующего буфера BioLegend FOXP3. После блокирования сывороткой человека в течение 10 минут клетки окрашивали в течение 30 минут антителами к фосфо-STAT5 FITC, CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5, а затем считывали данные на Attune NXT с помощью считывателя планшетов. Все четыре мутеина IL-2 из примера 19 индуцировали длительную передачу сигналов в T-reg, но не в T-eff по сравнению с контролем. SEQ ID NO: 40 превосходит SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 37. Эти результаты демонстрируют, что IL-2 может индуцировать длительную и селективную передачу сигналов в T-reg, что должно приводить к большей экспансии T-reg in vivo и позволяет осуществлять менее частое введение доз для достижения экспансии T-reg.

Приведенные в настоящем документе примеры демонстрируют удивительный и неожиданный результат, согласно которому мутеин IL-2 может функционировать для селективной и эффективной активации T-reg по сравнению с T-eff, что демонстрирует, что молекулы могут быть использованы для лечения или ослабления состояний, описанных в

настоящем документе. Мутеины IL-2, как предложено в настоящем документе, также могут быть получены и использованы с или без слияния с Fc-доменом или линкером, как предложено в настоящем документе.

Варианты осуществления были описаны со ссылкой на конкретные примеры. Эти примеры никоим образом не предназначены для ограничения вариантов осуществления. Для целей настоящего описания понятно, что могут быть внесены различные изменения и модификации, которые находятся в пределах объема настоящего описания. Могут быть внесены многочисленные другие изменения, которые легко могут быть предложены специалистам в данной области техники и, которые охватываются объемом данного изобретения, раскрытого в настоящем документе и как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Пример 12. Мутеины демонстрируют общий POI и более низкую агрегацию.

Мутеины IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88D и C125S и одной из следующих мутаций L53I, L56I, L80I или L118I, связанных с Fc-областью, содержащей мутации L234A, L235A и G237A, как предложено в настоящем документе, были экспрессированы в вектор рТТ5 путем трансфекции вектора в клетки HEK293 Expi. Мутеин IL-2 был связан с N-концом Fc-области с помощью 4 повторов GGGGS. Через 5-7 суток супернатанты клеточных культур, экспрессирующие различные мутеины IL-2, собирали и осветляли центрифугированием и фильтрацией через фильтрующее устройство с размером пор 0,22 мкм. Мутеины IL-2 были захвачены на смоле proA. Смолу промывали ФСБ, pH 7,4, и элюировали захваченный белок, используя 0,25% уксусную кислоту, pH 3,5, с нейтрализацией десятикратным объемом 1M Tris, pH 8,0. Белок переносили в буфер 30 mM HEPES 150 mM NaCl с pH 7 и анализировали методом эксклюзионной хроматографии на колонке AdvanceBio SEC с получением процента представляющего интерес пика (POI). Результаты показали, что различные мутеины экспрессировались при концентрации более 60 мг/л. Однако неожиданно было обнаружено, что мутеины с мутацией L80I или L118I были более чем на 90% монодисперсными, тогда как мутеины с мутациями L53I или L56I не были такими, как было показано при анализе методом эксклюзионной хроматографии. Таким образом, мутеины с заменой L80I или L118I имели меньшую степень агрегации. Различия в степени агрегации среди четырех молекул (мутеинов IL-2, содержащих L80I, L118I, L53I и L56I) были удивительными из-за типа мутации, которая была выполнена. Следовательно, мутеины с мутацией L80I или L118I имеют удивительное преимущество над другими мутеинами в том, что они не так сильно агрегируют, как другие мутеины.

Пример 13. Мутеины IL-2 имеют неожиданное повышение эффективности

Мутеины, описанные в примере 12, анализировали на предмет эффективности в анализе *in vitro*. Вкратце, МКПК выделяли из гепаринизированной цельной крови человека и стимулировали различными мутеинами в концентрации в течение 30 мин при температуре 37°C. Стимуляцию прекращали путем фиксации. После пермеабиллизации МКПК окрашивали на предмет внутриклеточного уровня FoxP3 и фосфо-STAT5 и поверхностной экспрессии CD4 и CD25, и анализировали методом проточной цитометрии. Проводили

гейтирование регуляторных Т-клеток (T-reg) и эффекторных Т-клеток (T-eff) как CD4+CD25^{hi}FoxP3⁺ или CD4+CD25^{lo}FoxP3⁻, соответственно. Показан процент положительно окрашенных клеток на фосфо-STAT5. Данный анализ измеряет способность мутеинов специфично стимулировать T-reg без стимуляции T-eff. Для расчета значения EC₅₀ была использована наилучшая кривая зависимости доза-ответ для каждого испытуемого вещества.

Удивительно, но мутеины с мутациями L118I, L80I, L56I или L53I имели повышенную эффективность (стимулирующие T-reg) по сравнению с мутеином IL-2 без какой-либо из этих мутаций. Мутеин IL-2 не имеющий мутации L118I, L80I, L56I или L53I, но имеющий мутации V69A, Q74P и N88D, составил около 51 пМ. Каждое из значений EC₅₀ для мутеинов, содержащих один из L118I, L80I, L56I или L53I, соответствовало значению EC₅₀, равному около 30, 40, 41 и 45, соответственно. Различия в EC₅₀ для стимулирующих T-reg (без изменений в стимуляции T-eff) были удивительными и не могли быть предсказаны для мутеинов, имеющих одну из мутаций, описанных в этом примере. Данные также могут быть оценены путем сравнения соотношения родительских мутеинов IL-2 (содержащих V69A, Q74P, N88D и C125S) с мутеинами, которые также содержат одну из мутаций L118I, L80I, L56I или L53I. Использование данного соотношения нормализует различные клеточные популяции, которые используются для разных экспериментов. При использовании данного соотношения наблюдалось повышение эффективности L118I в среднем на около 25% (стандартная ошибка среднего значения 0,16) по сравнению с родительским контролем, причем другие мутации имели снижение активности по сравнению с родительским контролем при использовании данного соотношения.

Данные *in vitro* были подтверждены *in vivo* для мутеинов, имеющих одну из мутаций L118I, L80I, L56I или L53I. Было обнаружено, что L118I является более эффективным *in vivo*, чем мутеин без мутации L118I. Вкратце, Nod-Scid-IL-2R γ -дефицитным (NSG) мышам, которым были пересаженные человеческие CD34⁺ гемопоэтические стволовые клетки, подкожно вводили 1 микрограмм указанного испытуемого вещества или носителя в сутки 0 и 7. На 11-е сутки мышей умерщвляли, а кровь отбирали путем пункции сердца в пробирки, содержащие гепарин. Лейкоциты периферической крови (ЛПК) выделяли путем лизиса эритроцитов и окрашивали антителами, вступающими в реакцию с человеческими маркерами CD45, CD3, CD8, CD4, FoxP3, CD25 и CD56. Процент человеческих регуляторных Т-клеток (T-reg, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3⁺), активированных эффекторных Т-клеток (aact Teff, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3⁻) и NK-клеток (CD45+CD56⁺) определяли методом проточной цитометрии. Частота общего количества клеток CD45⁺, общего количества клеток CD4⁺ и общего количества клеток CD8⁺ не изменилась. Аналогичные результаты наблюдались в селезенке мышей. Эффективность *in vivo*, измеренная в этом анализе мутеина IL-2 с мутацией L80I, была незначительно повышена по сравнению с мутеином без мутации L80I, а эффективность *in vivo*, измеренная в этом анализе мутеинов с мутацией L56I или L53I была примерно такой же, как у мутеина без мутаций. Мутеины были связаны на N-конце с Fc-областью, как описано в настоящем

документе, с линкером (GGGGS)₄ из 20 аминокислот. То есть линкер соединял С-конец мутеина IL-2 с N-концом Fc-области.

Пример 14. N-концевая ориентация Fc с линкером из 20 аминокислот наиболее эффективна при стимуляции T-reg. Мутеин IL-2 с V69A, Q74P и N88D был слит с Fc-областью, содержащей мутации L234A, L235A и G237A с использованием повторов GGGGS различной длины. Молекулы IL2-мутеина, слитые С-концом мутеина с N-концом Fc человеческого IgG1 с помощью линкеров, содержащих 3 и 4 повтора GGGGS, были протестированы, чтобы определить, влияет ли длина линкера на эффективность мутеина IL-2. Также был протестирован мутеин, слитый его N-концом с С-концом Fc человеческого IgG1 с одним повтором GGGGS. Вкратце, Nod-Scid-IL-2Rгамма-дефицитным (NSG) мышам, которым были пересаженные человеческие CD34+ гемопоэтические стволовые клетки, подкожно вводили 1 микрограмм различных мутеинов IL-2 с различной длиной линкера или плацебо на 0 сутки. На 7-е сутки мышам умерщвляли, а кровь отбирали путем пункции сердца в пробирки, содержащие гепарин. Лейкоциты периферической крови (ЛПК) выделяли путем лизиса эритроцитов и окрашивали антителами, вступающими в реакцию с человеческими маркерами CD45, CD3, CD8, CD4, FoxP3, CD25 и CD56. Процент человеческих регуляторных Т-клеток (T-reg, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+), активированных эффекторных Т-клеток (aact Teff, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3-) и NK-клеток (CD45+CD56+) определяли методом проточной цитометрии. Частота общего количества клеток CD45+, общего количества клеток CD4+ и общего количества клеток CD8+ не изменилась. Аналогичные результаты наблюдались в селезенке мышам.

Было обнаружено, что мутеин, слитый на N-конце Fc человеческого IgG1 с линкером, содержащим 4 повтора GGGGS, является наиболее эффективным по сравнению с мутеином с линкером, который имеет только 3 повтора GGGGS, или мутеином, слитым на С-конце Fc человеческого IgG1 с одним повтором GGGGS. Кроме того, хотя белок с 4 повторами GGGGS был более эффективен при экспансии T-reg, конфигурация не вызывала дифференциальной экспансии CD56+ NK-клеток. Невозможно было предсказать, что белок со слитым на N-конце Fc мутеином с более длинным линкером будет наиболее эффективным, а также не будет вызывать дифференциальной экспансии CD56+ NK-клеток.

Пример 15. Лечение пациентов с активной формой ревматоидного артрита.

Фармацевтическую композицию, содержащую белок мутеина IL-2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40, вводят пациентам с активной формой ревматоидного артрита. Обнаружено, что мутеины IL-2 эффективны при лечении активного ревматоидного артрита у пациентов.

Пример 16. Лечение пациентов с активной формой системной красной волчанки.

Фармацевтическую композицию, содержащую белок мутеина IL-2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40, вводят пациентам с активной формой системной красной волчанки. Обнаружено, что мутеины IL-2 эффективны при лечении активной формы системной красной волчанки.

Пример 17. Лечение пациентов с хронической стероид-рефрактерной болезнью «трансплантат против хозяина».

Фармацевтическую композицию, содержащую белок мутеина IL-2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40, вводят пациентам с хронической стероид-рефрактерной болезнью «трансплантат против хозяина». Обнаружено, что мутеины IL-2 эффективны при лечении хронической стероид-рефрактерной болезни «трансплантат против хозяина».

Пример 18. Мутеины IL-2 индуцируют pSTAT5 в человеческих T-reg. Очищенные МКПК из гепаринизированной цельной крови, отобранной у шести здоровых доноров, обрабатывали серийными разведениями белка мутеина IL-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 39 или 40 при температуре 37C в течение 30 минут. Клетки фиксировали, промывали, пермеабилizировали и промывали. Клетки окрашивали антителами, которые обнаруживают как поверхностные маркеры, так и внутриклеточные/ядерные маркеры (pSTAT5 и FOXP3). Данные были собраны на цитометре Attune NxT. Проводили гейтирование T-reg как одноядерных, синглетных, CD3+, CD4+, CD25hi, FoxP3+. Был измерен % гейтированных T-reg, которые экспрессируют фосфорилированный STAT5. Наилучшие кривые соответствовали зависимости доза-ответ pSTAT5 и были определены значения EC50. Средние значения EC50 для всех 6 доноров были определены для IL-2 SEQ ID NO 39 ($37,26 \pm 7,30$; n=16) и для IL-2 SEQ ID NO: 40 ($23,11 \pm 5,35$; n=15). Данные показывают, что мутеины IL-2 могут индуцировать pSTAT5 в T-reg человека. IL-2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40, является более эффективным, чем IL-2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 39, но оба являются активными в нескольких популяциях клеток.

Пример 19. Мутеины IL-2 индуцируют pSTAT5 в МКПК обезьян *in vitro*. Очищенные МКПК из гепаринизированной цельной крови, отобранной у трех здоровых обезьян, обрабатывали серийными разведениями белка мутеина IL-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 39 или 40 при температуре 37C в течение 60 минут. Конъюгированные с флуорохромом анти-CD25 и анти-CD4 добавляли в течение последних 30 минут обработки мутеина IL-2. Клетки фиксировали, промывали, пермеабилizировали и промывали. Клетки окрашивали оставшимися антителами, которые обнаруживают как поверхностные маркеры, так и внутриклеточные/ядерные маркеры (pSTAT5 и FOXP3). Данные были собраны на цитометре Attune NxT. Проводили гейтирование T-reg как одноядерных, синглетных, CD4+, CD25hi, FoxP3+. Был измерен % гейтированных T-reg, которые экспрессируют фосфорилированный STAT5. Было обнаружено, что мутеины IL-2 индуцируют pSTAT5 у обезьян.

Пример 20. Мутеины IL-2 индуцируют экспансию клеток T-reg и индуцируют пролиферацию T-reg *in vivo*. Цельную венозную кровь отбирали в пробирки K2EDTA у обезьян (яванского макака) до введения мутеинов IL-2 SEQ ID NO: 39 или 40 (2 временные точки/яванский макак, 5 яванских макаков) и после введения любой из SEQ ID NO: 39 (5 временных точек/яванский макак, 2 яванских макаков) или SEQ ID NO: 40 (5 временных

точек/яванский макак, 3 яванских макака). Образцы были разделены на две части и окрашены для двух панелей FACS отдельно. Один из них представлял собой «панель T-reg», а другой - панель общего иммунофенотипирования. Эритроциты лизировали, а клетки окрашивали на поверхностные и внутриклеточные маркеры после фиксации и пермеабиллизации. Для анализа FACS определяли общее количество клеток/мкл с помощью ADVIA. Затем рассчитывали количество клеток указанной субпопуляции/мкл по общему количеству/мкл и % от общего количества. Для каждой обезьяны усредняли среднее количество указанного типа клеток/мкл двух образцов, взятых методом кровопускания до введения дозы, и использовали для нормализации образцов, взятых методом кровопускания после введения дозы, таким образом определяли «кратное изменение по сравнению с уровнем до введения дозы». Для анализа сывороточных цитокинов и хемокинов плазму из цельной крови K2EDTA замораживали до завершения исследования. Количества хемокинов и цитокинов определяли мультиплексным MSD-анализом с использованием серийных разведений стандартного контроля. Среднее значение и диапазон MCP-1 и IP-10 были определены в образцах, взятых методом кровопускания до введения дозы. Было обнаружено, что оба мутеина индуцируют экспансию T-reg и индуцируют пролиферацию T-reg у обезьян. Эти результаты демонстрируют, что мутеины IL-2 функционируют на животной модели *in vivo*, которая аналогична на человеческой модели. Также было обнаружено, что ни одна молекула не индуцирует значительную экспансию клеток Tconv, клеток CD4 (Tnaive) или клеток CD8 (цитотоксических T-клеток), NK-клеток у обезьян (приматов, не являющихся человеком). Также было обнаружено, что ни одна молекула в значимой степени не индуцирует сывороточные хемокины. Эти данные демонстрируют, что мутеины IL-2 могут индуцировать экспансию клеток T-reg и индуцировать пролиферацию клеток T-reg без нежелательной экспансии или активации других путей. Таким образом, мутеины IL-2 являются неожиданно мощными, эффективными и селективными в отношении экспансии и пролиферации T-reg.

Таким образом, варианты осуществления и примеры, приведенные в настоящем документе, демонстрируют, что мутеины IL-2 могут функционировать, как предполагалось, и могут быть использованы для лечения заболеваний и состояний, описанных в настоящем документе.

Данное описание содержит многочисленные ссылки на патенты, заявки на патенты и патентные публикации. Каждый из этих документов включен в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ. ID. NO: 27.
2. Пептид по п. 1, дополнительно содержащий N-концевой лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7.
3. Пептид по п. 1, дополнительно содержащий линкерный пептид на С-конце.
4. Пептид по п. 3, отличающийся тем, что линкерный пептид содержит последовательность (GGGGS)_n, где n равно 1, 2, 3 или 4.
5. Пептид по п. 4, отличающийся тем, что n равно 1.
6. Пептид по п. 4, отличающийся тем, что n равно 2.
7. Пептид по п. 4, отличающийся тем, что n равно 3.
8. Пептид по п. 4, отличающийся тем, что n равно 4.
9. Пептид по п. 1, дополнительно содержащий Fc-пептид.
10. Пептид по п. 9, отличающийся тем, что Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
11. Пептид по п. 9, дополнительно содержащий лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7 на N-конце.
12. Пептид по п. 9, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на С-конце.
13. Пептид по п. 9, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на N-конце.
14. Пептид по п. 1, дополнительно содержащий линкерный пептид, который связывает пептид SEQ ID NO: 27 и Fc-пептид.
15. Пептид по п. 14, дополнительно содержащий лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7 на N-конце.
16. Пептид по п. 14, отличающийся тем, что линкерный пептид представляет собой (GGGGS)_n, n равно 1, 2, 3 или 4.
17. Пептид по п. 16, отличающийся тем, что n равно 4.
18. Пептид по п. 14, отличающийся тем, что Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
19. Пептид по п. 14, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на С-конце.
20. Пептид по п. 14, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на N-конце.
21. Пептид по п. 14, отличающийся тем, что пептид содержит пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40.
22. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 1.
23. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 14.
24. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 19.
25. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 24.
26. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ. ID. NO: 26.
27. Пептид по п. 16, дополнительно содержащий N-концевой лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7.
28. Пептид по п. 26, дополнительно содержащий линкерный пептид на С-конце.
29. Пептид по п. 28, отличающийся тем, что линкерный пептид содержит

последовательность (GGGGS) n , где n равно 1, 2, 3 или 4.

30. Пептид по п. 29, отличающийся тем, что n равно 1.
31. Пептид по п. 29, отличающийся тем, что n равно 2.
32. Пептид по п. 29, отличающийся тем, что n равно 3.
33. Пептид по п. 29, отличающийся тем, что n равно 4.
34. Пептид по п. 26, дополнительно содержащий Fc-пептид.
35. Пептид по п. 34, отличающийся тем, что Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
36. Пептид по п. 34, дополнительно содержащий лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7 на N-конце.
37. Пептид по п. 34, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на C-конце.
38. Пептид по п. 34, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на N-конце.
39. Пептид по п. 26, дополнительно содержащий линкерный пептид, который связывает пептид SEQ ID NO: 26 и Fc-пептид.
40. Пептид по п. 39, дополнительно содержащий лидерный пептид, имеющий последовательность SEQ. ID. No: 7 на N-конце.
41. Пептид по п. 49, отличающийся тем, что линкерный пептид представляет собой (GGGGS) n , n равно 1, 2, 3 или 4.
42. Пептид по п. 42, отличающийся тем, что n равно 4.
43. Пептид по п. 39, отличающийся тем, что Fc-пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15.
44. Пептид по п. 39, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на C-конце.
45. Пептид по п. 39, отличающийся тем, что Fc-пептид расположен на N-конце.
46. Пептид по п. 39, отличающийся тем, что пептид содержит пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 39.
47. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 25.
48. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 39.
49. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 43.
50. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п. 46.
51. Способ активации регуляторных Т-клеток, причем способ включает приведение в контакт регуляторной Т-клетки с пептидом по любому из пп. 1-47 или фармацевтической композицией по любому из пп. 47-50.
52. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества пептида по любому из пп. 1-47 или фармацевтической композиции по любому из пп. 48-50.
53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что воспалительное заболевание представляет собой очаговую алопецию, атопический дерматит, герпетиформный дерматит, псориаз, волчанку, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, паранеопластические аутоиммунные

заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоартикулярный ювенильный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, системное проявление ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, системное проявление ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, обратный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атеросклероз, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофогит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, хроническую стероид-рефрактерную болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата (например, почки, легкого, сердца, кожи и т. п.), поражение почек, васкулит, вызванный гепатитом С, самопроизвольный аборт, алопецию, витилиго, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), болезнь минимальных изменений, мембранную нефропатию, ANCA-ассоциированную гломерулонефропатию, мембранопролиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатию, волчаночный нефрит и тому подобное.

54. Способ способствования или стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества пептида по любому из пп. 1-47 или фармацевтической композиции по любому из пп. 48-50.

55. Применение пептида по любому из пп. 1-47 или фармацевтической композиции по любому из пп. 48-50 в приготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

56. Применение по п. 55, в котором воспалительное заболевание представляет собой очаговую алопецию, atopический дерматит, герпетиформный дерматит, псориаз, волчанку, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), воспаление, аутоиммунное заболевание, atopические заболевания, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный

артрит, олигоартикулярный ювенильный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, системное проявление ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориаз, ювенильный склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, системное проявление ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, синдром SEA (синдром серонегативности, энтезопатии, артропатии), дерматомиозит, псориаз, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, обратный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атеросклероз, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (РС), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофогит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, хроническую стероид-рефрактерную болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата (например, почки, легкого, сердца, кожи и т. п.), поражение почек, васкулит, вызванный гепатитом С, самопроизвольный аборт, алопецию, витилиго, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), болезнь минимальных изменений, мембранную нефропатию, ANCA-ассоциированную гломерулонефропатию, мембранопрлиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатию, волчаночный нефрит и тому подобное.

57. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-47.

58. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57.

59. Плазмида, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57.

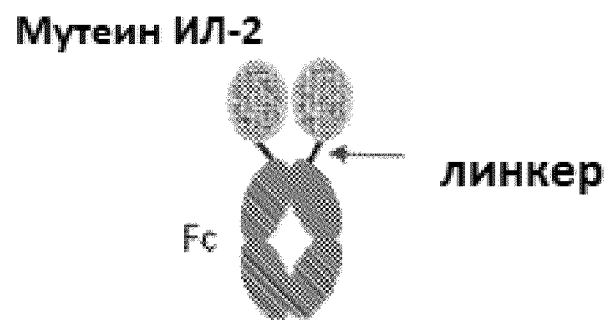
60. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57.

61. Клетка, содержащая плазмиду по п. 59.

62. Клетка, содержащая вектор по п. 58.

63. Клетка, содержащая или экспрессирующая пептид по любому из пп. 1-47 или пептид, описанный в настоящем документе.

По доверенности



ФИГ. 1