

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038361**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.13

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

(21) Номер заявки
201790213

(22) Дата подачи заявки
2015.07.20

(54) МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ ИЗБИРАТЕЛЬНО АКТИВИРУЮТ РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 61/999,241

(56) WO-A1-2012107417

(32) 2014.07.21

WO-A2-2011109789

(33) US

US-A1-20060160187

(43) 2017.06.30

CN-A-102174111

(86) PCT/US2015/041177

CN-A-103193887

(87) WO 2016/014428 2016.01.28

KING et al. "Phase I Clinical Trial of the Immunocytokine EMD 273063 in Melanoma Patients," Journal of Clinical Oncology, 15 November 2004 (15.11.2004), Vol. 22, Pgs. 4463-4473, entire document

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

WO-A1-2014145907

(72) Изобретатель:
Грив Джеффри (US)

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

(57) Изобретение относится к слитому белку между белком избирательного агониста IL-2αβγ (избирательны агонист IL-2) и белком Fc IgG. Фрагмент избирательного агониста IL-2 обеспечивает терапевтическую активность посредством избирательной активации IL-2αβγ формы рецептора, таким образом избирательно стимулируя регуляторные Т-клетки. Fc фрагмент обеспечивает пролонгированное время полужизни в циркуляции по сравнению с временем полужизни в циркуляции IL-2 или белка IL-2SA.

B1

038361

038361

B1

Предпосылки изобретения

Иммунная система должна быть способна различать свое и не свое. Когда различие своего/не своего не удастся, иммунная система уничтожает клетки и ткани организма, что в результате ведет к аутоиммунным заболеваниям. Регуляторные Т-клетки активно подавляют активацию иммунной системы и предотвращают патологическую аутореактивность и последующее аутоиммунное заболевание. Разработка лекарственных средств и способов для того, чтобы избирательно активировать регуляторные Т-клетки для лечения аутоиммунного заболевания, является предметом интенсивных исследований и до разработки настоящего изобретения была в основном unsuccessful.

Регуляторные Т-клетки (T_{reg}) представляют собой класс $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, которые подавляют активность других клеток иммунной системы. Регуляторные Т-клетки являются центральными в гомеостазе иммунной системы и играют главную роль в поддержании толерантности к аутоантигенам и в модулировании иммунного ответа на чужеродные антигены. Показано, что множество аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая диабет 1-го типа (T1D), системную красную волчанку (SLE) и реакцию трансплантат против хозяина (GVHD), сопряжены с недостаточностью числа регуляторных Т-клеток или функции регуляторных Т-клеток. Следовательно, существует большой интерес к разработке терапии, которая повышает число и/или функцию регуляторных Т-клеток.

Один исследованный подход к лечению аутоиммунных заболеваний состоит в трансплантации аутологических регуляторных Т-клеток, размноженных *ex vivo* (Tang, Q., et al., 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3:1-15). Хотя показана перспективность этого подхода в лечении заболеваний на животных моделях и в некоторых ранних стадиях клинических исследований у человека, он требует персонализированного лечения с использованием собственных Т-клеток пациента, является инвазивным и технически сложным. Другой подход состоит в лечении низкими дозами интерлейкина-2 (IL-2). Регуляторные Т-клетки характерно экспрессируют высокие конститутивные уровни рецептора IL-2 с высокой аффинностью, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, который состоит из субъединиц IL-2RA (CD25), IL-2RB (CD122) и IL-2RG (CD132), а также показано, что клеточный рост регуляторных Т-клеток зависит от IL-2 (Malek, T.R., et al., 2010, Immunity, 33:153-65). Клинические исследования лечения низкими дозами IL-2 пациентов с хронической GVHD (Koreth, J., et al., 2011, N Engl. J. Med., 365:2055-66) и HCV-ассоциированным аутоиммунным васкулитом (Saadoun, D., et al., 2011, N Engl. J. Med., 365:2067-77) продемонстрировали увеличенные уровни регуляторных Т-клеток и признаки клинического эффекта. Начаты новые клинические исследования, в которых изучают эффект IL-2, оказываемый на множество других аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Пролейкин (представленный на рынке компанией Prometheus Laboratories, San Diego, CA), рекомбинантная форма IL-2, использованная в этих исследованиях, связана с высокой токсичностью. Пролейкин одобрен для лечения метастатической меланомы и метастатической злокачественной опухоли почки, но его побочные эффекты настолько тяжелы, что его использование рекомендовано только в больничных условиях с доступом к интенсивной терапии (<http://www.proleukin.com/assets/pd/proleukin.pdf>). До того, как недавно определили характеристики регуляторных Т-клеток, IL-2 считали стимулятором иммунной системы, активирующим Т-клетки и другие клетки иммунной системы для устранения клеток злокачественной опухоли. В клинических исследованиях IL-2 при аутоиммунных заболеваниях использовали более низкие дозы IL-2 для того, чтобы направленно воздействовать на регуляторных Т-клетки, поскольку регуляторные Т-клетки отвечают на более низкие концентрации IL-2, чем многие другие типы клеток иммунной системы, по той причине, что они экспрессируют IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (Klatzmann D, 2015, Nat. Rev. Immunol. 15:283-94). Однако даже эти более низкие дозы вели к проблемам с безопасностью и переносимостью, и в лечении использовали ежедневные подкожные инъекции, или хронически или периодически курсами лечения по 5 суток. Следовательно, существует потребность в терапии аутоиммунных заболеваний, которая потенцирует число и функцию регуляторных Т-клеток и которая воздействует более конкретно направленно на регуляторных Т-клетки, чем IL-2, т.е. более безопасно и переносимо, и которую вводят менее часто.

Один подход к совершенствованию терапевтического индекса терапии, основанной на IL-2, состоит в использовании вариантов IL-2, которые селективны к регуляторным Т-клеткам относительно других клеток иммунной системы. Рецепторы IL-2 экспрессирует множество различных типов клеток иммунной системы, включая Т-клетки, естественные киллерные клетки, эозинофилы и моноциты, и этот широкий профиль экспрессии, вероятно, вносит вклад в плеiotропный эффект, оказываемый на иммунную систему, и высокую системную токсичность. Рецептор IL-2 существует в трех формах: (1) рецептор с низкой аффинностью, IL-2RA, который не передает сигнал; (2) рецептор с промежуточной аффинностью (IL-2R $\beta\gamma$), состоящий из IRB и IL-2RG, который широко экспрессирован на стандартных Т-клетках (Tcons), естественных киллерных клетках, эозинофилах и моноцитах; и (3) рецептор с высокой аффинностью (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), состоящий из IL-2RA, IL-2RB и IL-2RG, который экспрессируют временно активированные Т-клетки и конститутивно регуляторные Т-клетки. Разработаны варианты IL-2, которые избирательны к IL-2R $\alpha\beta\gamma$ относительно IL-2R $\beta\gamma$ (Shanafelt, A.B., et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:1197-202; Cassell, D.J., et al., 2002, Curr Pharm. Des., 8:2171-83). Эти варианты имеют замены аминокислот, которые

снижают их аффинность к IL-2RB. Поскольку IL-2 обладает не поддающейся обнаружению аффинностью к IL-2RG, эти варианты, следовательно, обладают сниженной аффинностью к рецепторному комплексу IL-2R $\beta\gamma$ и сниженной способностью активировать клетки, экспрессирующие IL-2R $\alpha\beta\gamma$, но сохраняют способность связывать IL-2RA и способность связывать и активировать рецепторный комплекс IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Один из этих вариантов, IL-2/N88R (Bay 50-4798), тестировали в клинике в качестве низко токсичной версии IL-2 в качестве стимулятора иммунной системы на основании предположения о том, что экспрессирующие IL-2R $\beta\gamma$ естественные киллерные клетки вносят основной вклад в токсичность. Показано, что Bay 50-4798 избирательно стимулирует пролиферацию активированных Т-клеток относительно естественных киллерных клеток согласно оценкам в фазе III клинических исследований у пациентов со злокачественными опухолями (Margolin, K., et al., 2007, Clin Cancer Res., 13:3312-9) и пациентов с HIV (Davey, R.T., et al., 2008, J Interferon Cytokine Res., 28: 89-100). Эти исследования показали, что Bay 50-4798 значительно безопаснее и лучше переносится, чем пролейкин, а также показали, что не увеличивает уровни CD4⁺ Т-клеток и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток у пациентов. Однако увеличение CD4⁺ Т-клеток и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток не отражало увеличение регуляторных Т-клеток, поскольку идентификация регуляторных Т-клеток требует дополнительных маркеров в дополнение к CD4 и CD25, а также поскольку регуляторные Т-клетки представляют собой минорную фракцию клеток CD4⁺CD25⁺. После этих исследований изыскания в этой области более полно установили отличительные черты регуляторных Т-клеток и продемонстрировали, что регуляторные Т-клетки избирательно экспрессируют IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (см. обзор в Malek, T.R., et al., 2010, Immunity, 33:153-65). На основании этого нового исследования теперь можно понять, что избирательные агонисты IL-2R $\alpha\beta\gamma$ должны быть избирательными к регуляторным Т-клеткам.

Второй подход к усовершенствованию терапевтического индекса терапии, основанной на IL-2, состоит в том, чтобы оптимизировать фармакокинетику молекулы, чтобы максимально стимулировать регуляторные Т-клетки. Ранние исследования действия IL-2 показали, что IL-2 стимуляция пролиферации Т-клеток человека *in vitro* требует минимум 5-6 ч воздействия эффективных концентраций IL-2 (Cantrell, D.A., et al., 1984, Science, 224:1312-1316). При введении пациенту-человеку IL-2 имеет очень короткое время полужизни в плазме 85 мин для внутривенного введения и 3,3 ч для подкожного введения (Kirchner, G.I., et al., 1998, Br. J. Clin. Pharmacol. 46:5-10). По причине этого короткого времени полужизни поддержание циркулирующего IL-2 на или выше уровня, необходимого для того, чтобы стимулировать Т-клеточную пролиферацию в течение необходимой длительности, требует высоких доз, которые ведут к пиковым уровням IL-2 значительно выше EC₅₀ для регуляторных Т-клеток или требует частого введения (фиг. 1). Эти высокие пиковые уровни IL-2 могут активировать рецепторы IL-2R $\beta\gamma$ и имеют другие непредусмотренные или нежелательные эффекты. Аналог IL-2 с более длительным временем полужизни в циркуляции, чем у IL-2, может достигать целевой концентрации лекарственного средства в течение конкретного периода времени при более низкой дозе, чем IL-2, и при более низких пиковых уровнях. Следовательно, для такого аналога IL-2 нужны или более низкие дозы или менее частое введение, чем для IL-2, чтобы эффективно стимулировать регуляторные Т-клетки. В действительности, у яванских макак, получавших дозы слитного белка IgG-IL-2 с временем полужизни в циркуляции 14 ч, стимулировали значительно более устойчивое увеличение регуляторных Т-клеток по сравнению с эквивалентной дозой IL-2 (Bell, et al., 2015, J. Autoimmun. 56:66-80). Менее частое подкожное введение IL-2 лекарственного средства также лучше переносимо пациентами. Терапевтическое средство с этими характеристиками в клинике будет вести к усовершенствованному фармакологическому эффекту, сниженной токсичности и усовершенствованной приверженности пациента терапии.

Один подход к увеличению времени полужизни терапевтических белков состоит в том, чтобы сливать терапевтические активную часть молекулы с другим белком, таким как Fc-область IgG, чтобы увеличивать время полужизни в циркуляции. Слияние терапевтических белков с Fc IgG ведет к этому посредством увеличения гидродинамического радиуса белка, таким образом снижая почечный клиренс, и опосредованно через неонатальный Fc-рецептор (FcRn), возвращая слитый белок в циркуляцию, таким образом продлевая время полужизни в циркуляции. Слияние терапевтических белков с альбумином (Sleep, D., et al., 2013, Biochem. Biophys. Acta., 1830:5526-34) и белками из неиммуногенных полимеров аминокислот (Schlupschy, M., et al., 2007, Protein Eng. Des. Sel. 20:273-84; Schellenberger, V., et al., 2009, Nat. Biotechnol. 27:1186-90) также используют для увеличения времени полужизни в циркуляции. Однако конструирование слитых белков таким образом, который обеспечивает устойчивую биологическую активность партнера слияния избирательного агониста IL-2, может быть непредсказуемым, в частности, в случае избирательного агониста IL-2, который представляет собой небольшой белок, который обладает недостаточностью связывания с одной из рецепторных субъединиц и который должен собирать комплекс из трех рецепторных субъединиц для того, чтобы активировать рецептор (Wang, X., et al., 2005, Science, 310:1159-63).

Другие исследователи создали различные IL-2 слитные белки, используя IL-2 дикого типа или IL-2 с заменой C125S, чтобы содействовать стабильности. Morrison с коллегами (Penichet, M. L., et al., 1997, Hum Antibodies. 8:106-18) создали слитый белок из IgG, слитого с IL-2 дикого типа, чтобы увеличивать время полужизни IL-2 в циркуляции и направлять IL-2 на конкретные антигены с целью потенцирования

иммунного ответа на антиген. Этот слитый белок состоял из интактной молекулы антитела, состоящего из тяжелой (H) и легкой (L) цепей, в котором N-концевой фрагмент тяжелой цепи сливали с C-концевым фрагментом белка IL-2. Этот слитый белок IgG-IL-2 обладал Fc-эффекторными функциями. Ключевые эффекторные функции Fc белков IgG представляют собой комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Слитый белок IgG-IL-2 обладал высокой активностью в биологическом анализе IL-2, и показано, что он обладал CDC активностью. Таким образом, Penichet et. al. говорили об использовании слитых белков антитело-IL-2 для того, чтобы направлять активность IL-2 на антигены, распознаваемые с помощью антитела, с целью потенцирования гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа на антиген. Схожим образом, Gillies с коллегами конструировали множество слитых белков IgG-IL-2 для иммунотерапии злокачественных опухолей, используя антительную часть слитного белка для направленного воздействия на опухолевые антигены, и IL-2 часть для того, чтобы стимулировать иммунный ответ на опухолевые клетки (рассмотрено в Sondel, P.M., et al., 2012, *Antibodies*, 1:149-71). Эти положения достаточно сильно отличаются от данной патентоспособной технологии, в которой избирательный агонист IL-2, который способствует росту и активности иммуносупрессорных регуляторных T-клеток, сливают с фрагментом Fc белка с недостаточностью эффекторной функции с целью увеличения системной экспозиции.

Strom со своими коллегами сконструировали слитные белки с IL-2, слитым с N-концом Fc белка, с целью элиминации активирующих T-клеток, экспрессирующих рецептор IL-2 с высокой аффинностью (Zheng, X.X., et al., 1999, *J. Immunol.* 1999, 163:4041-8). Показано, что этот слитый белок ингибирует развитие аутоиммунного диабета в модели T1D на мышах, которым переносили T-клетки. Показано, что IL-2-Fc слитый белок ингибирует функцию T-клеток, способствующих заболеванию, от восприимчивых к T1D самок мышей NOD, когда их трансплантируют менее восприимчивым к заболеванию самцам мышей NOD. Они также демонстрировали, что IL-2-Fc слитый белок может уничтожать клетки, экспрессирующие рецептор IL-2 с высокой аффинностью *in vitro*. Эти исследователи дополнительно сравнивали IL-2-Fc слитные белки, сконструированные из Fc, полученного из Fc IgG2b, способного к эффекторной функции, и мутантного Fc IgG2b с недостаточностью эффекторной функции. Только IL-2-Fc слитый белок, содержащий Fc, способный к эффекторной функции, эффективно предотвращает начало заболевания. Таким образом, эти исследователи говорят, что IL-2-Fc слитый белок с эффекторными функциями может устранять активированные T-клетки, вызывающие заболевание, и что эффекторные функции Fc необходимы для его терапевтической активности. Эти положения достаточно отличны от данной патентоспособной технологии, в которой избирательный агонист IL-2, который содействует росту и активности иммуносупрессорных регуляторных T-клеток, сливают с фрагментом белка Fc с недостаточностью эффекторной функции с целью увеличения системной экспозиции и оптимизации размножения регуляторных T-клеток. В другой работе Strom с коллегами говорят об использовании IL-2-Fc слитного белка для содействия толерантности к трансплантату (Zheng, X.X., et al., 2003, *Immunity*, 19:503-14). В этой работе IL-2-Fc слитый белок используют в "тройной терапии", в которой его объединяют с антагонистом рецептора IL15-Fc и рапамицином. Также эти исследователи говорят о том, что IL-2-Fc слитый белок должен обладать Fc эффекторными функциями, чтобы быть эффективным, и также говорят, что этот IL-2-Fc слитый белок следует комбинировать с двумя другими молекулами для того, чтобы он был эффективным.

Это изобретение относится к новому терапевтическому средству, слитому белку из избирательного агониста IL-2 и Fc, который объединяет высокую клеточную избирательность избирательного агониста IL-2 к регуляторным T-клеткам с длительным временем полужизни в циркуляции. В ходе разработки этой молекулы сделаны удивительные и неожиданные находки, которые раскрыли структурные элементы и конструктивные признаки белка, которые важны для биологической активности и которые привели к открытию нескольких новых белков, которые воплощают желаемые терапевтические характеристики.

Краткое изложение сущности изобретения

Это изобретение относится к слитому белку между белком избирательного агониста $K2\alpha\beta\gamma$ (избирательный агонист IL-2) и белком Fc IgG. Фрагмент избирательного агониста IL-2 обеспечивает терапевтическую активность посредством избирательной активации формы рецептора $IL2\alpha\beta\gamma$, таким образом избирательно стимулируя регуляторные T-клетки. Fc фрагмент обеспечивает пролонгированное время полужизни в циркуляции по сравнению с временем полужизни в циркуляции для IL-2 или белка избирательного агониста IL-2. Fc фрагмент увеличивает время полужизни в циркуляции посредством увеличения размера молекулы слитного белка до больше чем 60000 Да, что составляет приблизительный порог для клубочковой фильтрации макромолекул в почках, и посредством возврата слитого белка в циркуляцию через белок неонатального Fc рецептора (FcRn), который связывает и возвращает IgG в циркуляцию, таким образом продлевая его время полужизни в циркуляции. Fc фрагмент также должен иметь недостаточность Fc эффекторных функций, таких как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), что позволяет слитому белку избирательно активировать регуляторные T-клетки, чтобы потенцировать функцию регуляторных T-клеток и увеличивать число регуляторных T-клеток. Два белковых фрагмента сливают таким образом, чтобы сохранить устойчивую

биологическую активность фрагмента избирательного агониста IL-2, что позволяет Fc фрагменту способствовать пролонгированному времени полужизни в циркуляции и, таким образом, эффективно потенцировать функцию и число регуляторных Т-клеток. Это потенцирование регуляторных Т-клеток должно подавлять чрезмерные аутоиммунные или воспалительные реакции и принесет пользу в лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Белки по данному изобретению могут быть мономерными или димерными, образуя димеры через остатки цистеина в Fc фрагментах или доменах.

Более конкретно, это изобретение относится к слитому белку, который содержит: N-концевой белковый фрагмент варианта IL-2 человека и C-концевой белковый фрагмент Fc IgG, в котором указанный IL-2 слитый белок обладает способностью избирательно активировать рецептор IL-2 с высокой аффинностью и, таким образом, избирательно активировать регуляторные Т-клетки человека. Варианты IL-2 включают те, которые содержат замены, выбранные из группы, состоящей из N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L и Q126F относительно белка IL-2 человека (SEQ ID NO: 1). Вдобавок, вариант белка IL-2 необязательно содержит IL-2 человека с заменой C125S. Предпочтительно белки по этому изобретению являются слитыми, где как вариант белка IL-2, так и белок Fc IgG имеют N-конец и C-конец, и указанный вариант белка IL-2 человека сливаются на его C-конец с N-концом белка Fc IgG. Кроме того, предпочтительно домен варианта IL-2 и Fc домен соединяют или сливают через линкерный пептид, расположенный между белком варианта IL-2 и белковыми фрагментами Fc IgG. Белковый фрагмент Fc IgG или домен предпочтительно обладает недостаточностью Fc эффекторных функций или содержит одну или несколько замен аминокислот, которые снижают эффекторные функции Fc части слитого белка.

Примером этого изобретения является белок, который содержит белок варианта IL-2, имеющий замены аминокислот N88R и C125S относительно IL-2 человека (SEQ ID NO: 1), линкерный пептид, как приведено в SEQ ID NO: 15, и белок Fc IgG1 человека, как приведено в SEQ ID NO: 2, где указанный слитый белок обладает способностью избирательно активировать рецептор IL-2 с высокой аффинностью и, таким образом, избирательно активировать регуляторные Т-клетки человека. Альтернативные белки по этому изобретению включают: вариант белка IL-2, который содержит замены аминокислот N88R и C125S относительно IL-2 человека (SEQ ID NO: 1), линкерный пептид, как приведено в SEQ ID NO: 15, и белок Fc IgG2 человека, как приведено в SEQ ID NO: 3.

Более конкретный вариант осуществления по этому изобретению представляет собой димерный белок, который содержит две идентичные цепи, где каждая цепь содержит N-концевой белковый фрагмент варианта IL-2 человека и C-концевой белковый фрагмент Fc IgG, где N-концевой белковый фрагмент варианта IL-2 человека имеет N-конец и C-конец отличается от IL-2 человека дикого типа, как в SEQ ID NO: 1, по меньшей мере одной из замен, выбранных из группы, состоящей из N88R, N88L, N88G, D20H, Q126L и Q126F, обладает по меньшей мере 97% идентичностью последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 1; и обладает способностью активировать регуляторные Т-клетки посредством связывания с IL-2R $\alpha\beta\gamma$ на таких клетках; N-концевой белок варианта IL-2 человека соединяют его C-концом с N-концом аминокислотного линкера между 6 и 20 аминокислотными остатками, где указанный линкер также имеет C-конец; и C-конец аминокислотного линкера соединяют с N-концом белкового фрагмента Fc IgG, обладающего 97% идентичностью последовательностей, например, с SEQ ID NO: 3 (IgG2) или SEQ ID NO: 2 (IgG1N297A) и содержащего остатки цистеина; и где две цепи соединяют друг с другом через остатки цистеина, которые образуют межцепные дисульфидные связи белкового фрагмента Fc IgG. В димеры по этому изобретению дополнительно можно вводить замены C125S во фрагменте IL-2. Белки по этому изобретению предпочтительно содержат аминокислотные линкеры, содержащие группу из остатков глицина, остатков серина и смеси остатков глицина и серина. Линкеры могут содержать смесь между 12 и 17 остатками серина и глицина предпочтительно с соотношением остатков глицина и остатков серина в диапазоне 3:1-5:1, например в соотношении 4:1.

Это изобретение дополнительно относится к вышеупомянутым композициям в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

Это изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки, описанные в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты или предпочтительно функционально связывают с экспрессирующими кассетами, которые можно или конструировать для рекомбинации с геномом клетки-хозяина, или вводить в независимо реплицируемую плазмиду или внехромосомную нуклеиновую кислоту.

Это изобретение дополнительно относится к способам избирательной активации регуляторных Т-клеток человека у пациента, включающим введение фармацевтической композиции, которая содержит описанные композиции, которую вводят в терапевтически эффективных дозах до тех пор, пока концентрации регуляторных Т-клеток человека не достигают желаемых уровней.

Способ измерения числа регуляторных Т-клеток в образце крови человека осуществляется посредством контакта клеток крови человека со слитым белком по п.1 в концентрации между 1 и 0,01 нМ, и затем обнаружение клеток, которые связываются с белком, посредством проточной цитометрии.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схематическая иллюстрация зависимости между временем полужизни в циркуляции, пиковым уровнем лекарственного средства, биологически эффективной концентрацией и

длительностью, необходимой для того, чтобы стимулировать клеточную пролиферацию регуляторных Т-клеток после однократной дозы IL-2 или IL-2-Fc слитого белка с увеличенным временем полужизни. Штриховая линия представляет уровень IL-2 в крови с течением времени после подкожной инъекции, а сплошная линия представляет уровень IL-2-Fc слитого белка в крови с течением времени. Горизонтальные пунктирные линии показывают концентрации (значения EC_{50}), необходимые для того, чтобы активировать клетки, экспрессирующие IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и IL-2R $\beta\gamma$ соответственно. Двухнаправленная стрелка показывает длительность экспозиции (5-6 ч) IL-2 при EC_{50} , необходимой для того, чтобы стимулировать клеточную пролиферацию.

На фиг. 2 представлены конфигурации конструкций Fc слитых белков. Партнер слияния (X) может быть слит с N-концом (X-Fc) или C-концом (Fc-X) Fc белка. Линкерные пептиды можно вставлять между X и Fc.

На фиг. 3 представлен дозозависимый эффект стимулированного IL-2 и N88RL9AG1 фосфорилирования STAT5 в CD4⁺ Т-клетках, как измеряют посредством проточной цитометрии. Клетки обрабатывали с использованием IL-2 или N88RFc в концентрациях, указанных сверху, в течение 10 мин при 37°C, фиксировали, пермеабелизовали, окрашивали антителами и затем подвергали анализу проточной цитометрии, как описано в примере 3. Показаны клетки, отсортированные как CD4⁺, и дополнительно клетки, отсортированные в отношении CD25 и pSTAT5, как показано в каждом из 4 квадрантов. Число в каждом квадранте указывает процентную долю CD4⁺ клеток в каждой субпопуляции. Клетки в верхних квадрантах представляют наивысшие 1-2% CD25-экспрессирующих клеток, популяции, обогащенной регуляторными Т-клетками, и клетки в правых квадрантах представляют собой pSTAT5⁺. А. N88RL9AG1 стимулирует только CD25^{high} клетки с высокой избирательностью, тогда как IL-2 массово стимулирует как CD25^{low}, так и CD25^{high} клетки вплоть до пиколярных концентраций. В. D20HL0G2 не обладает pSTAT5 стимулирующей активностью. В двух независимых экспериментах не наблюдали активацию pSTAT5. С. Контроль показывает, что D20H/IL-2 стимулирует pSTAT5 в CD25^{high} клетках, тогда как D20HL0G2 не стимулирует. Графики представлены в псевдоцветном режиме. Оба белка тестировали в концентрации 10⁻⁸ М.

На фиг. 4 показано, что CD4⁺ Т-клетки, которые обрабатывали с использованием N88RL9AG1, демонстрировали стимуляцию уровней pSTAT5 в клетках, экспрессирующих высокие уровни FOXP3. Клетки обрабатывали с использованием 4×10⁻⁹ М IL-2 или N88RL9AG1 и затем анализировали, как описано в примере 3. Большинство pSTAT5⁺ клеток, которые обрабатывали с использованием N88RL9AG1, также представляли собой FOXP3⁺, тогда как pSTAT5⁺ клетки, которые обрабатывали с использованием IL-2, представляли собой как FOXP3⁻, так и FOXP3⁺, причем большинство представляло собой FOXP3⁻.

На фиг. 5 представлен выход белка для различных Fc слитых конструкций, полученных в клетках HEK293. Белки экспрессировали параллельно в оптимизированной системе временной экспрессии и очищали, как описано в примере 1. Результаты выражены в виде конечного выхода очищенного белка из 30 мл культуры. А. Выход белка для N88R/IL-2-Fc слитых белков возрастает с увеличением длины пептидного линкера. В. Выход для wt IL-2-Fc слитых белков только слегка увеличен при использовании пептидного линкера из 15 остатков. Более высокий выход для D20H/IL-2-Fc слитых белков получали в конфигурации X-Fc вместо Fc-X.

На фиг. 6 представлена зависимость биологической активности IL-2 от длины пептидного линкера в N88R/IL-2-Fc слитых белках. (А) сигналы pSTAT5 в CD25^{high} CD4⁺ Т-клетках (регуляторных Т-клетках) возрастает с увеличением длины пептидного линкера. (В) Не наблюдали значимый сигнал pSTAT5 при использовании любого из N88R/IL-2-Fc белков в CD25^{low} клетках. Сигнал pSTAT5 внутреннего контроля 10⁻⁸ М IL-2 показан на обеих диаграммах черным треугольником.

На фиг. 7 представлена биологическая активность D20H/IL-2-Fc слитых белков в регуляторных Т-клетках человека. Активность D20HL15AG1 по существу меньше, чем у N88RL15AG1, а D20HL15AG1 (конфигурация X-Fc) и AG1L15D20H (конфигурация Fc-X) имеют схожие активности. Все 3 белка имеют пептидный линкер из 15 остатков.

На фиг. 8 представлена биологическая активность для активности wt IL-2-Fc pSTAT5 с использованием и без использования пептидного линкера из 15 остатков. Пептидный линкер из 15 остатков только умеренно увеличивает IL-2 биологическую активность как в регуляторных Т-клетках (А), так и в CD25^{low} клетках (В).

На фиг. 9. представлена избирательность IL-2 и белков избирательных агонистов IL-2 к клеткам иммунной системы 7 различных типов в PBMC человека. N88RL15AG1 обладает высокой избирательностью к регуляторным Т-клеткам по сравнению с wt IL-2 и WTL15AG1 и демонстрирует более высокую избирательность к клеткам многих типов, чем N88R/IL-2.

Подробное описание изобретения

Введение.

Это изобретение представляет собой новый терапевтический слитый белок, который содержит три ключевых белковых элемента: (1) сконструированный цитокин IL-2, который модифицировали, чтобы он был высокоизбирательным к регуляторным Т-клеткам, (2) Fc белок с недостаточностью эффекторной

функции, который увеличивает время полужизни белка в циркуляции, и (3) линкерный пептид между двумя фрагментами, который необходим для высокой биологической активности слитого белка. Слитые белки, которые составляют это изобретение, обнаружены посредством изначально непредвиденных находок, которые противоречили положениям известного уровня техники в отношении IL-2 слитых белков, и исследование, которое привело к этим молекулам, имеет определенные ключевые зависимости структура-активность, важные для их биологической и терапевтической активности. Молекулы, которые определены с помощью этого изобретения, делают возможным безопасное и эффективное лечение аутоиммунных заболеваний посредством нового механизма стимулирования образования небольшой субпопуляции Т-клеток, которые подавляют аутоиммунные и воспалительные патологии. Это терапевтическое средство, нарушающее парадигму, потенциально позволяет лечить множество различных аутоиммунных заболеваний.

Определения.

"По меньшей мере определенный процент (например, 97%) идентичности последовательностей с последовательностью SEQ ID NO: 1", как используют в настоящем документе, относится к степени, в которой схожи последовательности из двух или больше нуклеиновых кислот или полипептидов. Процент идентичности между последовательностью, представляющей интерес, и второй последовательностью в пределах окна оценки, например в пределах длины последовательности, представляющей интерес, можно вычислять, выравнивая последовательности, посредством определения числа остатков (нуклеотидов или аминокислот) в пределах окна оценки, которые стоят напротив идентичного остатка, допуская введение пропусков для того, чтобы максимизировать идентичность, деления на общее число остатков последовательности, представляющей интерес, или второй последовательности (в зависимости от того, какая больше), которая попадает в окно, и умножения на 100. При вычислении числа идентичных остатков, необходимых для достижения конкретного процента идентичности, доли подлежат округлению до ближайшего целого числа. Процент идентичности можно вычислять с использованием различных компьютерных программ, например таких компьютерных программ, как BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST и т.д., генерировать выравнивания и предоставлять процент идентичности между последовательностями, представляющими интерес. Алгоритм Karlin and Altschul (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:22264-2268, 1990), модифицированный согласно Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993. Встроен в программы NBLAST и XBLAST авторства Altschul et al. (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Чтобы получать выравнивания с пропусками для целей сравнения, используют Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). При использовании программ BLAST и Gapped BLAST в соответствующих программах можно использовать параметры по умолчанию. Можно использовать матрицы PAM250 или BLOSUM62.

Программное обеспечение для осуществления анализа BLAST общедоступно через National Center for Biotechnology Information (NCBI). Эти программы см. на веб-сайте, имеющем URL адрес в World Wide Web: "ncbi.nlm.nih.gov". В конкретном варианте осуществления процент идентичности вычисляют с использованием BLAST2 с параметрами по умолчанию, как предоставлено в NCBI.

"N-конец" относится к концу пептида или полипептида, который несет аминокислотную группу, в отличие от карбоксильного конца, несущего карбоксильную кислотную группу.

"С-конец" относится к концу пептида или полипептида, который несет карбоксильную кислотную группу, в отличие от аминоконца, несущего аминокислотную группу.

"С-концевой белковый фрагмент Fc IgG" относится к части слитого белка, которая происходит из двух идентичных белковых фрагментов, каждый имеет шарнирную область, второй константный домен и третий константные домены двух тяжелых цепей молекулы IgG, и содержит карбоксиконцевых тяжелых цепей, связанных дисульфидными связями друг с другом через шарнирную область. Это функционально определено в качестве той части молекулы IgG, которая взаимодействует с белком комплемента C1q и IgG-Fc рецепторами (FcγR), опосредуя эффекторные функции комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Последовательность можно модифицировать для снижения эффекторных функций, увеличения времени полужизни в циркуляции и устранения участков гликозилирования.

Варианты IL-2.

Белки вариантов IL-2 по этому изобретению представляют собой избирательные агонисты IL-2αβγ.

Функционально они избирательно активируют рецепторный комплекс IL-2Rαβγ по сравнению с рецепторным комплексом IL-2Rβγ. Его получили из белка IL-2 дикого типа, который структурно определяют как обладающий по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с последовательностью SEQ ID NO: 1 IL-2 дикого типа и функционально определяют по способности предпочтительно активировать регуляторные Т-клетки. Белок также можно функционально определять по его способности избирательно активировать передачу сигнала рецептора IL-2 в регуляторных Т-клетках, как измеряют посредством уровней фосфорилированного белка STAT5 в регуляторных Т-клетках по сравнению с CD4⁺CD25^{-/низк} Т-клетками или естественными киллерными клетками или посредством избирательной активации стимулируемых фитогемагглютинином Т-клеток в сравнении с естественными киллерными

клетками.

"N-концевой белковый фрагмент варианта IL-2 человека" относится к N-концевому домену слитого белка, который получают из белка IL-2 дикого типа, структурно и функционально определяемого, как указано выше.

"С-конец" относится к концу пептида или полипептида, которые несет карбоксильную кислотную группу, в отличие от amino-конца, несущего аминогруппу.

Регуляторные Т-клетки.

"T_{reg}" или "клетки T_{reg}" относятся к регуляторным Т-клеткам. Регуляторные Т-клетки представляют собой класс Т-клеток, которые подавляют активность других клеток иммунной системы, и их определяют с использованием проточной цитометрии с помощью маркерного фенотипа клеток CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Поскольку FOXP3 представляет собой внутриклеточный белок и требует фиксации клеток и пермеабилзации для окрашивания, фенотип клеточной поверхности CD4⁺CD25⁺CD127⁻ можно использовать для определения живых регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки также включают различные подклассы регуляторных Т-клеток, такие как тимусные регуляторные Т-клетки (получаемые из тимуса) и периферические регуляторные Т-клетки (которые дифференцируются из наивных Т-клеток на периферии). Все регуляторные Т-клетки экспрессируют рецептор IL-2Rαβγ, не продуцируют свой собственный IL-2 и зависят от IL-2 для роста, и некоторые специалисты в данной области признают, что оба класса избирательно активирует избирательный агонист IL-2Rαβγ.

Пептидные линкеры.

"Пептидный линкер" определяют как аминокислотную последовательность, расположенную между двумя белками, содержащимися в слитом белке, так что линкерную пептидную последовательность не получить из любого из родительских белков. Пептидные линкеры встраивают в слитые белки в качестве разделителей для того, чтобы содействовать надлежащей укладке белка и стабильности составляющих белковых фрагментов, чтобы усовершенствовать экспрессию белка или сделать возможной более хорошую биологическую активность двух партнеров слияния (Chen, et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-69). Пептидные линкеры можно разделить на категории неструктурированных гибких пептидов или жестко структурированных пептидов.

Fc слитые белки.

"Fc слитый белок" представляет собой белок, выполненный посредством технологии рекомбинантных ДНК, в котором трансляционную рамку считывания Fc домена белка IgG млекопитающего сливают с таковой из другого белка ("партнера слияния с Fc"), чтобы получать новый единый рекомбинантный полипептид. Слитые белки типично получают в виде димеров с дисульфидными связями, которые соединены вместе посредством дисульфидных связей, расположенных в шарнирной области.

Функциональная активация.

"Биологическая активность" относится к измерению биологической активности в количественном анализе *in vitro*, основанном на клетках.

"Функциональную активацию регуляторных Т-клеток" определяют как IL-2-опосредованный ответ в регуляторных Т-клетках. Показания анализа функциональной активации регуляторных Т-клеток включают стимуляцию pSTAT5, клеточную пролиферацию регуляторных Т-клеток и стимуляцию уровней эффекторных белков регуляторных Т-клеток.

Разработка и конструирование.

Существует множество возможностей для разработки и конструирования Fc слитого белка, и выбор, сделанный среди этих возможностей разработки, представлен далее, чтобы позволить создание молекулы с желаемой биологической активностью и фармацевтическими характеристиками. Ключевые возможности конструирования представляют собой (1) свойства избирательного агониста IL-2, (2) выбор Fc белкового фрагмента, (3) конфигурацию партнеров слияния в слитом белке и (4) аминокислотную последовательность в сочленении между Fc и белком партнера слияния.

Основные способы.

В целом, получение слитых белков по изобретению можно выполнять посредством процедур, описанных в настоящем документе, и посредством известных способов рекомбинантной ДНК, которые включают, например, амплификацию полимеразной цепной реакцией (PCR), получение плазмидной ДНК, расщепление ДНК с использованием рестрикционных ферментов, получение олигонуклеотидов, лигирование ДНК, выделение мРНК, введение ДНК в подходящую клетку, трансформацию или трансфекцию организма-хозяина, культивирование организма-хозяина. Дополнительно, слитые молекулы можно выделять и очищать с использованием хаотропных средств и хорошо известных способов электрофореза, центрифугирования и хроматографии. Раскрытие, связанное с этими способами, в целом, см. в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е изд. (1989)); и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989).

Для генов, кодирующих слитые белки по этому изобретению, используют расщепление рестрикционными ферментами и лигирование в качестве основных стадий, используемых для получения ДНК, кодирующей желаемые слитые конструкции. Концы фрагмента ДНК могут требовать модификации перед

лигированием, и это можно выполнять посредством достройки липких концов, удаления концевых частей фрагментов) с использованием нуклеаз (например, *Eco*III), сайт-специфический мутагенез, или посредством добавления новых пар оснований посредством ПЦР. Полилинкеры и адаптеры можно использовать для того, чтобы содействовать соединению выбранных фрагментов. Экспрессионную конструкцию типично собирают поэтапно, с использованием раундов рестрикции, лигирования и трансформации *E. coli*. В данной области известно множество клонирующих векторов, подходящих для конструирования экспрессионной конструкции (*lambda*.ZAP и pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, LaJolla, Calif, pET, Novagen Inc., Madison, Wis. - упомянуты в Ausubel et al., 1999) и конкретный выбор не критичен для изобретения. На выбор клонирующего вектора влияет система переноса генов, выбранная для введения экспрессионной конструкции в клетку-хозяина. В конце каждого этапа получаемую конструкцию можно анализировать посредством анализа рестрикции, последовательности ДНК, гибридизации и ПЦР.

Сайт-специфический мутагенез типично используют для того, чтобы вводить конкретные мутации в гены, кодирующие слитые белки по этому изобретению, посредством известных в данной области способов. См., например, публикацию патентной заявки США 2004/0171154; Storici et al., 2001, *Nature Biotechnology*, 19:773-776; Kren et al., 1998, *Nat. Med.* 4:285-290; и Calissano and Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43:15-16. В настоящем изобретении можно использовать любую процедуру сайт-специфического мутагенеза. Существует множество доступных коммерческих наборов, которые можно использовать для того, чтобы получать варианты по этому изобретению.

Различные промоторы (регуляторные области инициации транскрипции) можно использовать в соответствии с изобретением. Выбор подходящего промотора зависит от предложенного экспрессирующего организма-хозяина. Промоторы из гетерологичных источников можно использовать до тех пор, пока они функциональны в выбранном организме-хозяине.

Различные сигнальные последовательности можно использовать для того, чтобы содействовать экспрессии белков, описанных в настоящем документе. Также можно использовать сигнальную последовательность выбирают или разрабатывают для эффективной секреции и процессинга в экспрессирующем организме-хозяине. Сигнальная последовательность, которая гомологична кодирующей последовательности TCR или кодирующей последовательности IL-2 мыши, можно использовать для клеток млекопитающих. Другие подходящие пары сигнальная последовательность/клетка-хозяин включают сигнальную последовательность *B. subtilis* *sacB* для секреции в *B. subtilis* и сигнальные последовательности α -фактора скрещивания *Saccharomyces cerevisiae* или кислой фосфатазы *phoI* *P. pastoris* для секреции в *P. pastoris*. Сигнальную последовательность можно соединять непосредственно через последовательность, кодирующую сайт расщепления сигнальной пептидазы, с кодирующей последовательностью белка или через короткий нуклеотидный мостик.

Для эукариотических экспрессирующих белок систем идентифицированы элементы для усиления транскрипции и трансляции. Например, расположение промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 1000 п. о. с любой стороны от гетерологичного промотора может повышать уровни транскрипции в 10-400 раз в клетках растения. Экспрессионная конструкция также должна содержать подходящие последовательности инициации трансляции. Модификации экспрессионной конструкции так, чтобы она содержала консенсусную последовательность Kozak для надлежащей инициации трансляции, могут увеличивать уровень трансляции в 10 раз.

Экспрессирующие кассеты соединяют с подходящими векторами, совместимыми с организмом-хозяином, подлежащим использованию. Вектор должен быть способен вмещать последовательность ДНК, которая кодирует слитые белки, подлежащие экспрессии. Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические и прокариотические клетки, предпочтительно те клетки, которые можно легко трансформировать и которые демонстрируют быстрый рост в культуральной среде. В частности, предпочтительные клетки-хозяева включают прокариоты, такие как *E. coli*, *Bacillus subtilis* и т.д., и эукариоты, такие как клетки животного и штаммы дрожжей, например *S. cerevisiae*. Клетки млекопитающих в целом предпочтительны, в частности HEK, J558, NSO, SP2-0 или CHO. Другие подходящие организмы-хозяева включают, например, клетки насекомого, такие как Sf9. Используют стандартные условия культивирования. См. Sambrook, выше. После этого можно выбирать стабильно трансформированные или трансфицированные клеточные линии. В качестве экспрессирующей системы также можно использовать системы транскрипции-трансляции *in vitro*.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый слитый белок, можно вводить в клетку-хозяина посредством стандартных способов трансфекции клеток. Термин "трансфицирование" или "трансфекция" предназначен для того, чтобы охватывать все общепринятые способы введения нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева, в том числе совместная преципитация с фосфатом кальция, DEAE-декстран-опосредованная трансфекция, липофекция, электропорация, микроинъекция, трансдукция и/или интеграция вирусов. Подходящие способы трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook et al. выше и в других лабораторных руководствах.

Альтернативно, можно использовать синтетическую генную конструкцию для всех или части конструкций белков, описанных в настоящем документе. Это влечет за собой синтез разработанной полинуклеотидной молекулы *in vitro* для кодирования полипептидной молекулы, представляющей интерес.

Синтез генов можно осуществлять с использованием множества способов, таких как технология, основанная на множестве микрочипов, которая описана Tian, et. al., (Tian, et. al., Nature, 432:1050-1054), и схожие технологии, в которых олигонуклеотиды синтезируют и собирают на фотопрограммируемых микрожидкостных чипах.

Слитые белки по этому изобретению выделяют из собранных клеток-хозяев или из среды для культивирования. Стандартные способы очистки белков используют для того, чтобы выделять белки, представляющие интерес, из среды или из собранных клеток. В частности, способы очистки можно использовать для того, чтобы экспрессировать и очищать желаемый слитый белок в крупном масштабе (т.е., по меньшей мере, в миллиграммовых количествах) в различных подходах, включая вращающиеся флаконы, вращающиеся колбы, тканевые культуральные планшеты, биореактор или ферментатор.

Фрагмент избирательного агониста IL-2.

IL-2 с заменой N88R представляет собой образцовый случай избирательного агониста IL-2 для рецептора IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (Shanafelt, A. B., et al., 2000, Nat. Biotechnol. 181, 197-202). IL-2/N88R имеет недостаточность связывания с рецепторной субъединицей IL-2RP и рецепторным комплексом IL-2R $\beta\gamma$, но способен связываться с рецепторным комплексом IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и стимулировать пролиферацию IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -экспрессирующих РНА-активированных Т-клеток так же эффективно как wt IL-2, при этом проявляя в 3000 раз сниженную способность стимулировать пролиферацию IL-2RP γ -экспрессирующих естественных киллерных клеток. Другие избирательные агонисты IL-2R $\alpha\beta\gamma$ со схожими профилями активности включают IL-2 с заменами N88I, N88G и D20H, и другие варианты IL-2 с заменами Q126L и Q126F (контактные остатки для субъединицы IL-2RG) также обладают активностью избирательного агониста IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (Cassell, D.J., et al., 2002, Curr Pharm Des., 8:2171-83). Опытный практик в данной области признает, что любые из этих молекул избирательных агонистов IL-2 можно заменять на фрагмент IL-2/N88R, ожидая, что Fc слитый белок будет обладать схожей активностью. Все указанные выше мутации можно выполнять на фоне wt IL-2 или wt IL-2 с заменой C125S, которая представляет собой замену, которая способствует стабильности IL-2 посредством устранения не спаренного остатка цистеина. Это изобретение также можно использовать с другими мутациями или усечениями, которые усовершенствуют продуцирование или стабильность без значительного влияния на активность активации рецептора IL-2.

Варианты по этому изобретению необязательно включают варианты с консервативными заменами, которые применимы как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, варианты с консервативными модификациями относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, по существу к идентичным последовательностям. В частности, вырожденные замены кодонов можно получать посредством создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяют на смешанное основание и/или дезоксиинозиновые остатки (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). По причине вырожденности генетического кода большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют какой-либо заданный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определен кодоном, кодон можно изменять на какие-либо из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой молчащие вариации, которые представляют собой один вид консервативно модифицированных вариаций. В настоящем документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалист признает, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который, как правило, представляет собой единственный кодон для метионина, и TGG, который, как правило, представляет собой единственный кодон для триптофана) можно модифицировать для получения функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, является неявной в каждой описанной последовательности.

В отношении консервативных замен в аминокислотных последовательностях специалист признает, что индивидуальные замены, делеции или добавления в последовательность нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которая изменяет, добавляет или удаляет одну аминокислоту или небольшую процентную долю аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой консервативно модифицированный вариант, где изменение ведет к замене аминокислоты на химически схожую аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению.

Каждая из следующих групп содержит аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);

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

Ключевым выбором при разработке являются свойства Fc белкового фрагмента. Основное терапевтическое применение Fc слитых белков представляет собой (1) наделение белка партнера слияния Fc эффекторными функциями иммуноглобулина; или (2) увеличение времени полужизни в циркуляции у белка партнера слияния (Czajkowsky, et al., 2012, *EMBO Mol. Med.* 4: 1015-28). Основные эффекторные функции белков IgG представляют собой комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), функции, опосредованные связыванием Fc с белком комплекса C1q и с рецепторами IgG-Fc (FcγR) соответственно. Эти эффекторные функции важны, когда терапевтический белок используют для того, чтобы направлять или усиливать иммунный ответ на конкретную антигенную мишень или клетку. Слитый белок по этому изобретению разрабатывают только для того, чтобы увеличивать время полужизни в циркуляции у фрагмента избирательного агониста IL-2, а эффекторные функции не требуются и даже могут быть токсичными и, таким образом, явно нежелательны. Например, слитый белок из избирательного агониста IL-2 и Fc со способным к эффекторной функции Fc может потенциально уничтожить регуляторные T-клетки, которые слитый белок по этому изобретению пытается активировать и стимулировать к размножению, что полностью противоречит терапевтической цели при аутоиммунных заболеваниях. Существует четыре подкласса IgG человека, которые различаются эффекторными функциями (CDC, ADCC), временем полужизни в циркуляции и стабильностью (Salfeld, J.G., 2007, *Nature Biotechnology*, 25:1369-72). IgG1 обладает эффекторными функциями Fc, представляет собой наиболее обильный подкласс IgG и наиболее широко используемый подкласс среди терапевтических белков, одобренных US FDA. IgG2 обладает недостаточностью Fc эффекторных функций, но подвержен димеризации с другими молекулами IgG2 и также подвержен нестабильности из-за запутывания дисульфидных связей в шарнирной области. IgG3 обладает Fc эффекторными функциями и имеет чрезвычайно длинную, жесткую шарнирную область. IgG4 обладает недостаточностью Fc эффекторных функций, имеет более короткое время полужизни в циркуляции, чем другие подклассы и димер IgG4 биохимически нестабилен из-за одной единственной дисульфидной связи в шарнирной области, что ведет к обмену H цепями между различными молекулами IgG4. Специалист в данной области признает, что Fc белковые фрагменты из IgG2 и IgG4 не обладают эффекторными функциями, и их можно использовать в этом изобретении. Специалист в данной области также признает, что в данной области описаны такие модификации Fc последовательностей, что шарнирную область IgG2 Fc можно модифицировать для того, чтобы предотвращать агрегирование или что шарнирную область Fc IgG4 можно модифицировать для того, чтобы стабилизировать димеры. Альтернативно, созданы варианты IgG1 с недостаточностью эффекторной функции. Один такой вариант имеет замену аминокислоты в положении N297, местоположении N-связанного участка гликозилирования. Замена этого остатка аспарагина удаляет участок гликозилирования и значительно снижает ADCC и CDC активность (Тао, М.И., et al., 1989, *J. Immunol.* 143:2595-2601). Этот вариант используют в качестве образцового случая изобретения в настоящем документе. Другой вариант IgG1 с недостаточностью эффекторной функции представляет собой IgG1 (L-234F/L-235E/P331S) (Oganessian, et al., 2008, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64:700-4), который содержит мутантные аминокислоты в сайтах связывания C1q и FcγR, и специалист в данной области рассмотрит использование этих или схожих вариантов Fc для того, чтобы генерировать стабильные

IL-2SA-Fc слитые белки с недостаточностью эффекторной функции. Специалист в данной области также признает, что формы Fc белковых фрагментов, сконструированных так, чтобы они представляли собой стабильные мономеры вместо димеров (Dumont, J.A., et al., 2006, *BioDrugs* 20:151-60; Liu Z, et al., *J. Biol. Chem.* 2015, 2; 290:7535-62), также можно комбинировать с избирательным агонистом IL-2 по этому изобретению. Кроме того, специалист в данной области признает, что функционально однорукий гетеродимер, состоящий из полипептида IL-2 и H цепи Fc в комбинации с полипептидом H цепи Fc, собранный с использованием технологии биспецифических антител (Zhu Z., et al., 1997, *Protein Sci.* 6:781-8), также можно комбинировать с избирательным агонистом IL-2 по этому изобретению. Созданы некоторые IL-2 Fc слитые белки с использованием молекул интактных антител IgG, с антигенной специфичностью (Penichet, M.L., et al., 1997, *Hum Antibodies.* 8: 106-18) или без антигенной специфичности (Bell, et al., 2015, *J Autoimmun.* 56:66-80) во фрагменте IgG. Кроме того, специалист в данной области признает, что Fc варианты, которые не содержат часть или всю шарнирную область, можно использовать с этим изобретением.

Fc слитые белки можно создавать в двух конфигурациях, обозначаемых здесь как X-Fc и Fc-X, где X, белок партнера слияния, находится на N-конце и Fc находится на C-конце, и Fc-X, где Fc находится на

N-конце, и белок партнера слияния находится на С-конце (фиг. 2). В литературе представлены примеры, показывающие, что различные партнеры слияния имеют выраженные предпочтения к N- или С-концевым Fc слитым конструкциям. Например, показано, что FGF21 имеет сильное предпочтение к конфигурации Fc-X. Fc-FGF21 обладает активирующей рецептор биологической активностью, по существу то же, что и сам FGF21, тогда как FGF21-Fc обладает 1000-кратно сниженной биологической активностью (Hecht, et al., 2012, PLoS One. 7(11):c49345). Для различных применений создано множество IL-2 Fc слитых белков, о которых сообщалось, что они обладают хорошей биологической активностью IL-2, когда непосредственно слиты с Fc как в конфигурации Fc-X (Gillies, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 1428-32; Bell, et al., 2015, J. Autoimmun. 56:66-80), так и в конфигурации X-Fc (Zheng, X.X., et al., 1999, J. Immunol. 163:4041-8). Gavin, et al. (US 20140286898 A1) описывают Fc слитые белки, содержащие IL-2 и определенные варианты IL-2 в конфигурации Fc-X, которые обладают биологической активностью, схожей с таковой у свободного цитокина IL-2, но в отличие от результатов Zheng et al. (Zheng, X.X., et al., 1999, J. Immunol. 1999, 163:4041-8) обнаружено, что слитые белки вариантов IL-2 в конфигурации X-Fc обладают сниженной или нулевой биологической активностью. Таким образом, Gavin et al. в целом говорят далеко не о N-концевых IL-2 Fc слитых белках. Другой фактор, который влияет на выбор конфигурации слитого белка, представляет собой влияние на время полужизни в циркуляции. В литературе повторно встречается то, что IL-2 слитые белки в конфигурации Fc-X имеют относительно низкое время полужизни в циркуляции, значительно меньше, чем время полужизни 21 сутки у IgG1 человека у людей или время полужизни текущих Fc слитых белков, одобренных FDA (табл. I). Сообщалось, что слитые белки IgG-IL-2 в конфигурации Fc-X имеют относительно короткое время полужизни в циркуляции порядка часов у мышей (Gillies S.D., 2002, Clin. Cancer Res., 8:210-6; Gillies, S.D., US 2007/0036752 A2; Bell C.J., 2015, J. Autoimmun. 56:66-80) и порядка 3,3 ч (Ribas A., J. 2009, Transl. Med. 7:68) и 3,7 ч (King D.M., 2004, J. Clin. Oncol., 22:4463-73) у человека, а также сообщалось, что Fc-IL-2 слитые белки имеют время полужизни в циркуляции 12,5 ч у мышей (Zhu E.F., Cancer Cell. 2015, 13; 27(4):489-501). Протеолиз между С-концом Fc фрагмента и фрагментом IL-2 вносит вклад в короткое время полужизни в циркуляции (Gillies S.D., 2002, Clin. Cancer Res., 8:210-6; Zhu E.F., 2015, Cancer Cell. 27:489-501). По причине этого относительно короткого времени полужизни авторы изобретения сосредоточились на слитых белках избирательного агониста IL-2 и Fc в конфигурации X-Fc.

Линкер.

Аминокислотная последовательность в сочленении между Fc и белком партнера слияния может представлять собой или (1) непосредственную слитую конструкцию из двух белковых последовательностей или (2) слитую конструкцию с промежуточным линкерным пептидом. Из 10 Fc слитых белков, которые в настоящее время одобрены US FDA для клинического использования (табл. I), 8 представляют собой непосредственные слитые конструкции из белка партнера слияния с Fc, тогда как 2 содержат линкерные пептиды, так что многие Fc слитые белки могут быть функциональны без линкерных пептидов. Линкерные пептиды включают в качестве разделителей между двумя белковыми фрагментами. Линкерные пептиды могут содействовать надеждающей укладке белка и стабильности составляющих белковых фрагментов, усовершенствовать экспрессию белка и делать возможной более хорошую биологическую активность составляющих белковых фрагментов (Chen, et al., 2013, Adv. Drug. Deliv. Rev. 65:1357-69). Пептидные линкеры, используемые во многих слитых белках, разработаны в виде неструктурированных гибких пептидов. Исследование длины, последовательности и конформации линкерных пептидов между независимыми структурными доменами в естественных белках предоставило теоретическую основу для разработки гибких пептидных линкеров (Argos, 1990, J. Mol. Biol. 211:943-58). Argos предоставил руководство, согласно которому длинные гибкие линкерные пептиды должны состоять из небольших неполярных остатков, таких как глицин, и небольших полярных остатков, таких как серин и треонин, причем несколько остатков глицина делают возможной очень гибкую конформацию, а серин или треонин предоставляют полярный участок поверхности для ограничения гидрофобного взаимодействия в пептиде или с составляющими фрагментами слитого белка. Многие пептидные линкеры, описанные в литературе, богаты глицином и серином, например повторы последовательности GGGGS, несмотря на то, что средний специалист в данной области признает, что другие последовательности, отвечающие общим рекомендациям Argos (Argos, 1990, J. Mol. Biol. 20; 211(4):943-58), также можно использовать. Например, один из белков, описанных в настоящем документе, содержит линкерный пептид, состоящий из глицина и аланина (SEQ ID NO: 15). Гибкий линкерный пептид с конформацией полностью протяженного бета-тяжа будет иметь длину от конца до конца приблизительно 3,5 Å на остаток. Таким образом, линкерный пептид из 5, 10, 15 или 10 остатков будет иметь максимальную полностью протяженную длину 17,5, 35, 52,5 или 70 Å соответственно. Максимальная длина от конца до конца пептидного линкера также может представлять собой ориентир для определения характеристик пептидного линкера в этом изобретении. Цель линкерного пептида в данном изобретении состоит в том, чтобы сделать возможным достижение подходящей конформации и ориентации отдельных фрагментов слитого белка для того, чтобы сделать возможным соединение фрагмента избирательного агониста IL-2 с его когнатным рецептором и позволить связывание Fc фрагмента с FcRn, чтобы сделать возможными возвращение слитого белка в циркуляцию и пролонгированное время полужизни в циркуляции. Поскольку факторы, влияющие на эти взаи-

модействия, трудно предсказать, требования к надлежащей длине линкерного пептида следует проверять и определять эмпирически. Для многих Fc слитых белков линкерные пептиды не нужны, о чем свидетельствуют 8 из 10 Fc слитых белков, одобренных US FDA, не содержащих такие пептиды, которые перечислены в табл. I. В отличие от этого, дулаглутид, слитая конструкция из GLP-1 и Fc, содержит пептидный линкер из 15 остатков, который имеет сильное влияние на биологическую активность (Glaesner, патент США 7452966 B2). Предыдущая работа в данной области над IL-2-Fc слитыми белками указывает на то, что линкерные пептиды не обязательны для биологической активности. Сообщалось, что IL-2 слитые белки, содержащие wt IL-2 или IL-2 с заменой C125S в ориентации Fc-X, обладают биологической активностью IL-2, схожей с таковой у свободного цитокина IL-2 без пептидных линкеров (Gillies, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:1428-32; Gavin, et al., патентная заявка США 20140286898 1 или с пептидными линкерами (Bell, et al., 2015, J. Autoimmun. 56:66-80). В ориентации X-Fc, Zheng et al. сообщают о биологической активности IL-2 слитого белка IL-2 в конфигурации X-Fc, которая по существу неотличима от таковой у самого IL-2 (Zheng, X.X., et al., 1999, J. Immunol. 1999, 163:4041-8). Этот обширный известный уровень техники говорит, что слитая конструкция из белка IL-2 с Fc не требует линкерного пептида для того, чтобы иметь высокую биологическую активность IL-2. Однако, Gavin et al. сообщают о том, что Fc слитые белки в конфигурации X-Fc, содержащие определенные варианты IL-2 с измененной рецепторной избирательностью, имеют сниженную или нулевую биологическую активность или без пептидного линкера или с пептидным линкером из 5 остатков (Gavin, et al., патентная заявка США 20140286898 A1).

Биологические анализы.

Надежные и количественные биологические анализы необходимы для определения характеристик биологической активности рассматриваемых белков. Эти анализы должны измерять активацию рецептора IL-2, измерять последующие функциональные последствия активации в регуляторных Т-клетках и измерять терапевтически-релевантные результаты и функции активированных регуляторных Т-клеток. Эти анализы можно использовать для измерения терапевтической активности молекул избирательных агонистов IL-2, а также можно использовать для измерения фармакодинамики избирательного агониста IL-2 у животных или у человека. Один анализ измеряет фосфорилирование белка сигнальной трансдукции STAT5, измеряемое проточной цитометрией с использованием антитела, специфичного к фосфорилированному белку (pSTAT5). Фосфорилирование STAT5 представляет собой важную стадию в пути передачи сигнала IL-2. STAT5 важен для развития регуляторных Т-клеток и конститутивно активированной формы STAT5, экспрессируемой CD4⁺CD25⁺ клетками, достаточно для продуцирования регуляторных Т-клеток в отсутствие IL-2 (Mahmud, S.A., et al., 2013, JAKSTAT 2:e23154). Следовательно, некоторые специалисты в данной области признают, что измерение фосфорилирования STAT5 (pSTAT5) в регуляторных Т-клетках отражает IL-2 активацию в этих клетках и будет предсказывать другие биологические исходы IL-2 лечения, с учетом подходящего времени экспозиции и условий. Другой анализ для функциональной активации измеряет IL-2-стимулируемую пролиферацию регуляторных Т-клеток. Некоторые специалисты в данной области признают, что пролиферацию регуляторных Т-клеток можно измерять посредством встраивания тимидина, меченного тритием, в очищенные регуляторные Т-клетки, по увеличению числа регуляторных Т-клеток в смешанной популяции клеток, измеряемому с помощью проточной цитометрии и частоты фенотипов маркеров CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ или CD4⁺CD25⁺CD127⁻, по увеличенной экспрессии в регуляторных Т-клетках белков клеточного цикла, ассоциированных с пролиферацией, таких как Ki-67, или посредством измерения разведения витального флуоресцентного красителя, ассоциированного с клеточным делением, такого как карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир (CFSE), посредством проточной цитометрии в регуляторных Т-клетках. Другой анализ для функциональной активации регуляторных Т-клеток с использованием IL-2 представляет собой увеличенную стабильность регуляторных Т-клеток. Некоторые полагают, что периферические регуляторные Т-клетки нестабильны и имеют потенциал к дифференциации в Th1 и Th17 эффекторные Т-клетки. IL-2 активация регуляторных Т-клеток может стабилизировать регуляторные Т-клетки и предотвращать их дифференцировку (Chen, Q., et al., 2011, J. Immunol. 186:6329-37). Другой исход IL-2 стимуляции регуляторных Т-клеток представляет собой стимуляцию уровня функциональных эффекторных молекул регуляторных Т-клеток, таких как CTLA4, GITR, LAG3, TIGIT, IL-10, CD39 и CD73, которые вносят вклад в иммуносупрессорную активность регуляторных Т-клеток.

Чтобы разработать белок из избирательного агониста IL-2 и Fc, авторы изначально сосредоточились на белках в конфигурации X-Fc по причине короткого времени полужизни, о котором сообщалось для IL-2 слитых белков в конфигурации Fc-X. Первые два белка, полученные и протестированные, один с линкерным пептидом и один без него, неожиданно демонстрировали, что белок с пептидным линкером имел биологическую активность IL-2, а белок без пептидного линкера не имел поддающейся обнаружению биологической активности. Оба белка демонстрировали высокую аффинность связывания с IL-2RA, что указывает на то, что оба белка имели надлежащую укладку. Эти результаты подсказывают, что линкерный пептид необходим для активации рецептора IL-2 и биологической активности. После этого получили ряд дополнительных аналогов, чтобы устранить другие переменные и тестировать эту гипотезу. Результаты этих исследований привели к обнаружению ключевых зависимостей между структурой и

активностью для этого терапевтического белка и созданию новых молекул с желаемой активностью и фармацевтическими атрибутами.

Состав.

Фармацевтические композиции слитых белков по настоящему изобретению определяют как сформулированные для парентеральной (в частности, внутривенной или подкожной) доставки в соответствии со стандартными способами. В целом, фармацевтические составы содержат слитые белки по настоящему изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем, таким как физиологический раствор, буферный физиологический раствор, 5% декстроза в воде или тому подобное. Составы дополнительно могут содержать один или несколько эксципиентов, консервантов, солюбилизаторов, буферных средств, альбумин для того, чтобы предотвращать потерю белка на поверхностях сосудов, и т. д. Способы получения составов хорошо известны в данной области и раскрыты, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19^{sup}.th ed., 1995.

В качестве иллюстрации фармацевтические составы можно поставлять в виде набора, содержащего контейнер, который содержит слитые белки по настоящему изобретению. Терапевтические белки можно предоставлять в форме инъекционного раствора для одной или нескольких доз, в виде стерильного порошка, который нужно восстанавливать перед инъекцией, или в виде предварительно заполненного шприца. Такой набор дополнительно может содержать письменную информацию о показаниях и использовании фармацевтической композиции. Кроме того, такая информация может содержать сообщение о том, что слитые белки по настоящему изобретению противопоказаны пациентам с известной гиперчувствительностью к слитым белкам по настоящему изобретению.

Слитые белки избирательных агонистов IL-2 по этому изобретению можно вводить в композиции, в том числе в фармацевтические композиции. Такие композиции типично включают белок и фармацевтически приемлемый носитель. Как используют в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но не ограничиваясь этим, физиологический раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию средства и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения (например, антибиотики) также можно включать в композиции.

Фармацевтическую композицию формулируют так, чтобы она была совместима с ее планируемым путем введения. Слитые белки избирательных агонистов IL-2 по изобретению, вероятно, подлежат введению через парентеральный путь. Примеры парентеральных путей введения включают, например, внутривенное, внутривенное и подкожное. Растворы или суспензии, используемые для парентерального применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфат натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно корректировать с использованием кислот или оснований, таких как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до pH приблизительно 7,2-7,8, например 7,5). Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды с множеством доз, выполненные из стекла или пластмассы.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для незапланированного получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Носители, подходящие для внутривенного введения, включают физиологический раствор, бактериостатическую воду или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и текучей в такой мере, чтобы имела место возможность легкого введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть предохранена против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Сохранение необходимого размера частицы в случае дисперсии можно облегчать с помощью поверхностно-активных средств, например, полисорбата или Tween. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия.

Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, после чего следует стерилизация фильтрованием. В целом, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов

предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, которые дают порошок активного ингредиента плюс какой-либо дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием.

В одном из вариантов осуществления слитый белок избирательного агониста IL-2 получают с носителями, которые защищают слитый белок избирательного агониста IL-2 от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразрушаемые биологически совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Такие составы можно получать с использованием стандартных способов.

Фармацевтические композиции могут содержаться в контейнере, упаковке или дозаторе вместе с инструкциями для введения.

Введение.

Слитые белки по настоящему изобретению предпочтительно вводят через парентеральный путь. Подкожный путь представляет собой предпочтительный путь, но внутривенное, внутримышечное и подкожное введение также можно использовать. Для подкожного или внутримышечного путей можно использовать депо и составы депо. Для определенных заболеваний можно использовать специализированные пути введения. Например, для воспалительных заболеваний глаз можно использовать внутриглазную инъекцию. Слитые белки можно использовать в концентрации приблизительно от 0,1 до 10 мкг/мл общего объема, несмотря на то, что можно использовать концентрации в диапазоне от 0,01 до 100 мкг/мл.

Определение дозы соответствует уровню средних навыков в данной области. Дозирование является ежедневным или еженедельным в течение периода лечения или может происходить с другой периодической частотой. Внутривенное введение происходит с использованием инъекции или инфузии болюса за типичный период от одного до нескольких часов. Составы с замедленным высвобождением также можно использовать. В целом, терапевтически эффективное количество слитых белков по настоящему изобретению представляет собой количество, достаточное для получения клинически значимого изменения состояния, подлежащего лечению, такого как клинически значимое изменение циркулирующих регуляторных Т-клеток, клинически значимое изменение в регуляторных Т-клетках, присутствующих в пораженной ткани, или клинически значимое изменение симптома заболевания.

Данные, получаемые из анализа клеточных культур и исследований на животных, можно использовать при формулировании диапазона доз для использования у человека. Доза таких соединений предпочтительно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀, т.е. концентрацию тестируемого соединения, которая достигает половины максимальной стимуляции регуляторных Т-клеток) при небольшой или нулевой токсичности. Доза может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозированной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способе по изобретению, терапевтически эффективную дозу можно оценивать изначально в анализах на клеточных культурах. Дозу можно формулировать в животных моделях, чтобы достигать диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает EC₅₀, как определяют в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для того, чтобы более точно определять эффективные дозы у человека. Уровни в плазме можно измерять, например, посредством твердофазного иммуноферментного анализа.

Как определено в настоящем документе, терапевтически эффективное количество слитого белка избирательного агониста IL-2 (т.е. эффективная доза) зависит от выбранного полипептида и частоты доз. Например, в однократной дозе можно вводить количества в диапазоне приблизительно от 0,001 до 0,1 мг/кг массы организма пациента; в некоторых вариантах осуществления можно вводить приблизительно 0,005, 0,01, 0,05 мг/кг. Композиции можно вводить от одного раза в сутки до одного или нескольких раз в неделю или одного или нескольких раз в месяц; в том числе один раз через день. Специалист в данной области примет во внимание, что определенные факторы могут влиять на дозу и время, необходимые для лечения субъекта, включая в качестве неограничивающих примеров тяжесть заболевания или нарушения, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, уровень регуляторных Т-клеток, присутствующих у пациента, и другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством слитого белка избирательного агониста IL-2 по изобретению, вероятно, представляет собой серию воздействий.

Аутоиммунные заболевания.

Отмечены некоторые заболевания, для которых может быть полезна терапия по этому изобретению. Однако роль регуляторных Т-клеток в аутоиммунных заболеваниях представляет собой область очень активных исследований, и, вероятно, дополнительные заболевания будут идентифицированы в качестве подлежащих лечению с помощью этого изобретения. Аутоиммунные заболевания определяют как заболевания человека, в которых иммунная система атакует свои собственные белки, клетки и ткани. Исчерпывающий список и обзор аутоиммунных заболеваний можно найти в *The Autoimmune Diseases* (Rose and Mackay, 2014, Academic Press).

Другие слитые белки.

Поскольку задача Fc белкового фрагмента в этом изобретении состоит лишь в увеличении времени полужизни в циркуляции, специалист в данной области признает, что фрагмент избирательного агониста IL-2 может быть слит с N-концом других белков, чтобы достичь той же цели увеличения размера молекулы и уменьшения уровня почечного клиренса, используя зависимости между структурой и активностью, обнаруженные в этом изобретении. Избирательный агонист IL-2 может быть слит с N-концом сывороточного альбумина (Sleep, D., et al., 2013, *Biochim Biophys Acta*. 1830:5526-34), который увеличивает гидродинамический радиус слитого белка по сравнению с фрагментом IL-2, а также подвержен возврату в циркуляцию посредством FcRN. Специалист в данной области также признает, что фрагмент избирательного агониста IL-2 по этому изобретению также может быть слит с N-концом рекомбинантных неиммуногенных полимеров аминокислот. Два примера неиммуногенных полимеров аминокислот, разработанных с этой целью, представляют собой полимеры XTEN, цепи аминокислот A, E, G, P, S и T (Schellenberger, V., et al., 2009, *Nat Biotechnol*. 27:1186-90)), и полимеры PAS, цепи аминокислотных остатков P, A и S (Schlappschy, M., et al., 2007, *Protein Eng. Des. Sel*. 20:273-84).

Все публикации и патентные заявки, цитированные в этом описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы конкретно и индивидуально было указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка включена посредством ссылки.

Несмотря на то что приведенное выше изобретение описано в некоторых подробностях с помощью иллюстраций и примеров в целях прозрачности понимания, в свете положений данного изобретения специалистам в данной области будет без труда понятно, что в них определенные изменения и модификации можно создавать, не отступая от сущности или объема приложенной формулы изобретения.

Примеры

Следующие примеры приведены только в качестве иллюстрации и не в качестве ограничения. Специалисты легко распознают множество не критичных параметров, которых можно менять или модифицировать для того, чтобы получать по существу схожие результаты.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка слитых белков избирательного агониста IL-2 и Fc IgG.

кДНК, кодирующую N88RL9AG1 (SEQ ID NO: 4), конструировали посредством синтеза ДНК и ПЦР-сборки. Конструкция N88RL9AG1 состояла из сигнальной последовательности IgG1 мыши, последовательности зрелого IL-2 человека (SEQ ID NO: 1) с заменами N88R и C125S, 9 аминокислотной линкерной пептидной последовательности (SEQ ID NO: 15) и Fc-области IgG1 человека, содержащей замену N297A (SEQ ID NO: 2). N88R/IL-2 представляет собой избирательный агонист IL-2 со сниженным связыванием с IL-2RB и избирательной агонистической активностью в клетках, экспрессирующих рецептор IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (Shanafelt, A.B., et al., 2000, *Nat. Biotechnol*. 18:1197-202). Устранение N-связанного участка гликозилирования N297 в Fc IgG1 снижает Fc эффекторные функции (Тао, М.Н., et al., 1989, *J. Immunol*. 143:2595 -2601). D20HL0G2 состояла из сигнальной последовательности IgG1 мыши, IL-2 (SEQ ID NO: 1) с заменами D20H и C125S и Fc белкового фрагмента, полученного из IgG2 человека (SEQ ID NO: 3). Сообщалось, что D20H вариант IL-2 обладает избирательной агонистической активностью, схожей с N88R (Cassell, D.J., et al., 2002, *Curr Pharm Des.*, 8:2171-83).

Эти кДНК клонировали в pcDNA3.1 (+) (Life Technologies, Carlsbad, CA) с использованием участков рестрикции HindIII и NotI. Осуществляли временную трансфекцию клеток НЕК293 очищенной экспрессирующей векторной плазмидой, содержащей конструкцию. Клетки НЕК293 высевали во встряхиваемую колбу за 24 ч до трансфекции и выращивали с использованием бессывороточных сред с определенным химическим составом. 0,1 литра суспензии клеток НЕК293 временно трансфицировали ДНК экспрессионными конструкциями. После 24 ч клетки считали для получения жизнеспособности и числа жизнеспособных клеток. Культуры собирали на сутки 5 и кондиционированный супернатант среды осветляли посредством центрифугирования на 3000 \times g в течение 15 мин. Белок очищали, пропуская супернатант через колонку с белком А (GE Healthcare), элюируя в 0,25% уксусной кислоты (pH 3,5), нейтрализуя элюированный белок с 1 М Tris (pH 8,0) и осуществляя диализ против 30 мМ HEPES, pH 7, 150 мМ NaCl. Затем образцы стерилизовали фильтрованием через 0,2 мкм мембранный фильтр и анализировали с помощью SDS PAGE при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Белки мигрировали в виде димера с дисульфидной связью. Концентрацию белка определяли посредством поглощения с использованием вычисленного коэффициента экстинкции 1,11 мг/мл \cdot см⁻¹ и аликвоты хранили при -80°C.

Цитокины N88R/IL-2 и D20H/IL-2 представляют собой варианты SEQ ID NO: 1, которые продуцировала E.coli, по существу как описано в патенте США 6955807 B1, за исключением добавления дополнительной мутации C125S для усовершенствованной стабильности.

Пример 2. Определение рецептор-связывающей активности N88RL9AG1 и D20HL0G2.

Для того чтобы определять, уложены ли N88RL9AG1 и D20HL0G2 должным образом, их аффинность к субъединицам IL-2RA и IL-2RB рецептора IL-2 определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Biacore T-200 (GE Healthcare). Белки внеклеточных доменов IL-2RA и IL-2RB и белок IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) иммобилизовали на чипах CM-5

Вiasore посредством NHS/EDC связывания с конечными значениями 30 и 484 RU (резонансные единицы) соответственно. Кинетику связывания с IL-2RA измеряли в пяти концентрациях IL-2 и N88RL9AG1 в диапазоне от 0,6 до 45 нМ при скорости потока 50 мкл/мин. Кинетику связывания с IL-2RB измеряли в пяти концентрациях в диапазоне от 16,7 н до 450 нМ для IL-2 и от 14 до 372 нМ для Fc слитых белков при скорости потока 10 мкл/мин. Константы диссоциации (K_d) вычисляли по кинетическим константам с использованием программного обеспечения для оценки Viasore версии 2.0, принимая соотношение 1:1 для IL-2 и двухвалентное соотношение для N88RL9AG1 и D20HL0G2. Значения равновесной K_d вычисляли с помощью программного обеспечения для оценки Viasore с использованием значений для стационарного связывания.

Связывание с IL-2RA обнаруживали как для IL-2, так и для N88RL9AG1. Значение R_{max} для N88RL9AG1, равное 14,43, был 5,5 раза выше, чем таковое для IL-2, равное 2,62, в соответствии с тем фактом, что N88RL9AG1 (82,916 г/М) имеет более высокую молекулярную массу, чем IL-2 (15,444 г/М). Значения k_{on} , k_{off} и K_d для IL-2 находились в ожидаемом диапазоне из опубликованных значений SPR (табл. II). Аффинность N88RL9AG1 была приблизительно в 2 раза выше, чем у IL-2, как определяют как с помощью кинетики, так и с помощью равновесных способов. Связывание IL-2 с IL-2RB обнаруживали с R_{max} 6,19. Значения, которые определяли для k_{on} , k_{off} и K_d , находились в диапазоне, приведенном в литературе. Приведенные значения составляют $3,1 \times 10^{-8}$ М (IL-2RA) и $5,0 \times 10^{-7}$ М (IL-2RB) (Myszka, D.G., et al., 1996, Protein Sci. 5:2468-78); $5,4 \times 10^{-8}$ М (IL-2RA) и $4,5 \times 10^{-7}$ М (IL-2RB) (Shanafelt, A.B., et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 1197-202) и $6,6 \times 10^{-9}$ М (IL-2RA) и $2,8 \times 10^{-7}$ М (IL-2RB) (Ring, A.M., et al., 2012, Nat. Immunol. 13:1187-95). По существу не обнаруживали связывание N88RL9AG1 с IL-2RB, причем небольшое связывание обнаруживали при наибольшей протестированной концентрации ($R_{max}=0,06$), значительно ниже того, что ожидали на основании различия молекулярных масс между IL-2 и N88RL9AG1 и на основании результатов связывания с IL-2RA. Белок D20HL0G2 также тестировали на связывание с IL-2RA, и обнаружили, что он имеет K_d $8,3 \times 10^{-9}$ М, схожую с таковой для N88RL9AG1. Таким образом, SPR исследования связывания показывали, что оба белка N88RL9AG1 и D20HL0G2 связываются с IL-2RA, что указывает, что белки уложены должным образом.

Пример 3. Биологическая активность N88RL9AG1 и D20HL0G2 на Т-клетках.

Биологическую активность N88RL9AG1 и D20HL0G2 на Т-клетках определяли посредством измерения уровней фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) в конкретных подгруппах Т-клеток. Уровни pSTAT5 измеряли посредством проточной цитометрии в фиксированных и пермеабиллизованных клетках с использованием антитела к фосфорилированному пептиду STAT5. Регуляторные Т-клетки конститутивно экспрессируют CD25, и клетки, которые входят в верхний 1% уровней экспрессии CD25, высоко обогащены регуляторными Т-клетками (Jailwala, P., et al., 2009, PLoS One. 2009; 4:e6527; Long, S.A., et al., 2010, Diabetes 59:407-15). Следовательно, данные проточной цитометрии делили на CD25^{Mgh} (верхние 1-2% CD25-экспрессирующих клеток) и CD25^{низк} группы на подгруппы регуляторных Т-клеток и CD4 эффекторных Т-клеток соответственно.

Криосохраненные CD4⁺ Т-клетки (Astarte Biologies, Seattle, WA) размораживали, промывали в среде X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ), содержащей 1% АВ сыворотки человека (Mediatech, Manassas, VA), и оставляли восстанавливаться в течение 2 ч при 37°C. Затем клетки распределяли в 0,1 мл в пробирки 15×75 мм в концентрации 5×10^6 клеток/мл. Клетки обрабатывали различными концентрациями IL-2 или Fc слитых белков в течение 10 мин при 37°C. Затем клетки фиксировали с использованием буфера для фиксации Cytofix при 37°C в течение 10 мин, пермеабиллизировали с использованием Perm Buffer ill (BD Biosciences, Santa Clara, CA) в течение 30 мин на льду и затем промывали. Затем клетки окрашивали смесью антител anti-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA), anti-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) и anti-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) в концентрациях, рекомендованных производителем, в течение 30 мин при 20°C, промывали и получали данные проточной цитометрии на приборе LSRII (BD Biosciences). Данные анализировали с использованием аналитического программного обеспечения Flowjo (Flowjo, Ashland, OR).

Затем тестировали активность D20HL0G2 в CD4⁺ анализе pSTAT5 Т-клеток. Неожиданно, D20HL0G2 не обладал активностью в этом анализе (фиг. 3В). Дополнительный контроль с 10^{-8} М цитокина D20H/IL-2 (вариант цитокина IL-2, не слитый с Fc) демонстрировал устойчивую и избирательную pSTAT5 активацию клеток CD25^{high} (фиг. 3С). Недостаток активности при использовании D20HL0G2 был особенно удивительным с учетом того, что D20HL0G2 связывался с IL-2RA с K_d , схожей с таковой у IL-2 и N88RL9AG1, что указывает на его должную укладку.

Для того чтобы подтвердить, что CD25^{высок} клетки, которые избирательно активировал N88RL9AG1, представляли собой регуляторные Т-клетки, активированные клетки совместно окрашивали на pSTAT5 и FOXP3, другой молекулярный маркер регуляторных Т-клеток. CD4⁺ клетки обрабатывали в 4 нМ IL-2 или N88RL9AG1, фиксировали и пермеабиллизовали, как описано выше для окрашивания pSTAT5, и затем впоследствии обрабатывали 1 мл FOXP3 Perm Buffer (BioLegend, San Diego, CA) в течение 30 мин при комнатной температуре, и затем промывали и ресуспендировали в FOXP3 Perm Buffer. Пермеабиллизованные клетки окрашивали смесью антител anti-FOXP3-eFluor450, anti-CD25-AF488

(eBioscience, San Diego, CA) и anti-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) в течение 30 мин при 20°C, промывали и анализировали посредством проточной цитометрии. Результаты этого эксперимента показывали, что высокая доля обработанных N88RL9AG1 клеток с активированным STAT5 (pSTAT5⁺ клетки) также экспрессировали высокие уровни FOXP3. Этот результат предоставляет дополнительное доказательство того, что активированные клетки высоко обогащены регуляторными Т-клетками. В отличие от этого, обработанные IL-2 pSTAT5⁺ клетки представляли собой как FOXP3⁺, так и FOXP3⁻, причем FOXP3⁻ клетки составляли большинство.

Пример 4. Определение зависимостей между структурой и активностью, которые важны для биологической активности.

Неожиданные результаты, описанные в примере 3, подсказывают, что биологическая активность IL-2, обнаруживаемая с использованием N8 8RL9AG1, но не с использованием D20HL0G2, обусловлена присутствием линкерного пептида. Для того чтобы верифицировать эту находку и устранить влияние других переменных, таких как изотип фрагмента Fc и мутация избирательности во фрагменте IL-2, разрабатывали и получали панель аналогов, все с использованием Fc IgG1 N297A (табл. III).

Конструировали кДНК, экспрессировали и очищали белки, как описано в примере 1, за исключением того, что С-концевой остаток лизина из Fc удаляли во всех конструкциях и что получение клеточной культуры происходило в объеме 30 мл вместо 100 мл. Все белки извлекали с хорошим выходом. Фактически, сравнение выходов серии молекул N88R/IL-2 показывало четкую тенденцию на увеличение выхода белка с увеличением длины пептидного линкера, где сбор N88RL-20AG1 (с самым длинным пептидным линкером) в 6,8 раза выше, чем N88RL0AG1 (без пептидного линкера) (фиг. 5A). Основание для повышенного выхода белков, содержащих линкерный пептид, еще не ясно, но может быть обусловлено увеличенным уровнем экспрессии, увеличенным уровнем секреции, увеличенной стабильностью белка или увеличенной эффективностью очистки. Что интересно, выход WTL15AG1 только немного выше (1,8 раза), чем у WTLOAG1, по сравнению с 4,5-кратно более высоким выходом N88RL15AG1 относительно N88RL0AG1. Выход D20HL15AG1 схож с выходом N88RL15AG1, что указывает на то, что мутация избирательности IL-2 не оказывает достоверного эффекта на выход, и оба эти белка имели значительно более высокий выход (в 4,3 раза и 3,4 раза, соответственно), чем AG1L15D20H (фиг. 5B). В совокупности эти результаты показывают, что увеличение длины пептидного линкера связано с более высоким выходом белка у слитых белков Fc, содержащих N88R/IL-2, что выход Fc слитых белков, содержащих wt IL-2, значительно менее чувствителен к присутствию линкерного пептида, и получали IL-2-Fc слитые белки в конфигурации X-Fc

Эти очищенные белки тестировали в биологическом анализе pSTAT5 Т-клеток человека по существу как описано в примере 3, за исключением того, что CD3⁺ Т-клетки человека (негативно отобранные) использовали вместо CD4⁺ клеток, и клетки инкубировали с тестовыми белками в течение 20 мин вместо 10 мин.

Результаты для серии молекул N88R/IL-2 показывали, что на биологическую активность в популяции, обогащенной регуляторными Т-клетками, значительно влияла длина пептидного линкера (фиг. 6A). pSTAT5 сигнал (% pSTAT5⁺ клеток) в популяции регуляторных Т-клеток возрастал постепенно с увеличением длины пептидного линкера. Эта увеличенная биологическая активность отражена как в максимальном сигнале pSTAT5 при 10⁻⁸ М тестового белка, так и в значениях EC₅₀ (табл. IV). N88RL-20AG1, белок с самым длинным пептидным линкером, демонстрировал 4,2-кратное увеличение максимального сигнала pSTAT5 относительно N8 8RL0AG1. Поскольку сигнал pSTAT5 для N88RL0AG1 не достигал 50% IL-2 активации в его самой высокой концентрации (10⁻⁸ М), не было возможно определять кратное улучшение в EC₅₀ для белков, содержащих линкерные пептиды, относительно N88RL0AG1. Однако, на основании EC₅₀ для N88RL-20AG1 и самой высокой протестированной концентрации N88RL0AG1 можно оценивать, что N88RL-20AG1 будет проявлять а>100-кратно более низкую EC₅₀, чем N88RL0AG1.

Как ожидалось, имело место по существу не поддающаяся обнаружению активность любой из N88R/IL-2 молекул в CD25^{-низк} популяции, тогда как IL-2 10⁻⁸ М стимулировал pSTAT5 активность в 54,2% CD25^{-low} клеток (фиг. 6B).

Сравнение WTLOAG1 и WTL15AG1 показало, что линкерные пептиды оказывают значительно менее достоверный эффект на wt IL-2-Fc слитые белки, чем N88R/IL-2-Fc слитые белки (фиг. 7). В субпопуляции регуляторных Т-клеток как WTLOAG1, так и WTL15AG1 имели значимую биологическую активность и фактически стимулировали приблизительно 2-кратно повышенный максимальный уровень pSTAT5 фосфорилирования, чем IL-2. Однако WTLOAG1 и WTL15AG1 также стимулировал большие pSTAT5 сигналы в CD25^{-low} клетках в приблизительно 10-кратно повышенной концентрации. WTL15AG1 и WTLOAG1 демонстрировали приблизительно 10-кратную разницу в значениях EC₅₀ в популяциях как регуляторных Т-клеток, так и CD25^{-низк} клеток.

Максимальный pSTAT5 сигнал для D20HL15AG1 в регуляторных Т-клетках был значительно меньше, чем таковой для N88RL15AG1 (фиг. 8). Это подсказывает, что недостаток любой поддающейся обнаружению активности в примере 3 при использовании D20HL0G2 отчасти обусловлен более низкой активностью D20H/IL-2 фрагмента в контексте Fc слитого белка по сравнению с фрагментом N88R/IL-2. Активность AG1L15D20H была слегка выше, чем таковая у D20HL15AG1, что указывает на то, что кон-

фигурация фрагмента IL-2 в Fc слитом белке (т.е. X-Fc против Fc-X) не оказывает главного эффекта на биологическую активность регуляторных Т-клеток.

В совокупности эти результаты определяют ключевые признаки N88R/IL-2-Fc слитых белков, необходимые для оптимальной биологической активности. N88R/IL-2-Fc белкам необходим линкерный пептид для оптимальной биологической активности регуляторных Т-клеток с тенденцией к увеличению биологической активности с увеличением длины линкерного пептида. Второе, наряду с работой других, линкерные пептиды оказывают более умеренный эффект на биологическую активность Fc слитых белков, содержащих wt IL-2. Эти различающиеся требования к линкерному пептиду могут быть следствием того факта, что N88R/IL-2 обладает недостаточностью связывания с IL-2RB, что возможно может вести к более строгим требованиям к соединению с рецептором и увеличению чувствительности стерическим затруднениям от партнера Fc слитого белка. Эти результаты также определяют наиболее активные слитые белки избирательного агониста IL-2 и Fc.

Пример 5. Избирательность слитых белков избирательного агониста IL-2 и Fc в PBMC человека/

Для того, чтобы определять избирательность N88R/IL-2-Fc слитых белков в более широком биологическом контексте, разработан анализ для того, чтобы измерять активацию STAT5 среди ключевых типов клеток иммунной системы в неочищенных нефракционированных PBMC человека. PBMC человека выделяли посредством центрифугирования с фиколл-гипаком у нормального добровольца. 10^6 PBMC суспендировали в среде X-VIVO 15 с глюкозой (Lonza) и 10% FBS (Omega) и обрабатывали с использованием 10^{-8} М тестовых белков в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки обрабатывали с использованием Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (EBIO) в соответствии с инструкциями производителя. Затем клетки фиксировали с использованием буфера Cytofix и пермеабилizировали с использованием Perm Buffer III, как описано в примере 3. Затем фиксированные и пермеабилizированные клетки промывали в 1% FBS/PBS и окрашивали смесью антител в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. Затем окрашенные клетки промывали в 1% FBS/PBS, ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном цитометре Fortessa (BD Biosciences). Смесью антител состояла из: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (BD, #560650), anti-pSTAT5-AF-488 (BD, #612598), anti-CD25-PE (BD, #560989), anti-CD56-PE-CF594 (BD, #562328), anti-FOXP3-AF647 (BD, #560889), anti-CD3-V450 (BD, 560366) и anti-CD8-BV650 (Biolegend, #301041). Эта процедура окрашивания позволяла осуществлять мониторинг уровней pSTAT5 в клетках иммунной системы 7 ключевых типов.

Фенотипы клеток определяли следующим образом: регуляторные Т-клетки: CD3⁺, CD4⁺, Foxp3⁺, CD25^{высок}, CD8⁻, CD56⁻; активированные CD4 Teff клетки: CD3⁺, CD4⁺, Foxp3⁻, CD25^{высок}, CD8⁻, CD56⁻; CD4 Teff клетки: CD3⁺, CD4⁺, Foxp3⁻, CD25^{низк}, CD8⁻, CD56⁻; NKT-клетки: CD3⁺, CD4⁻, Foxp3⁻, CD25^{низк}, CD8⁻, CD56⁺; естественные киллерные клетки: CD3⁻, CD4⁻, Foxp3⁻, CD25^{низк}, CD8⁻, CD56⁺; В-клетки: CD3⁻, CD4⁻, Foxp3⁻, CD25^{низк}, CD8⁻, CD56⁻.

Белки тестировали в этом анализе в концентрации 10^{-8} М. Результаты, представленные на фиг. 9 и резюмированные в таблице V, показывают, что N8 8RL15AG1 демонстрировал заметную избирательность по сравнению с wt IL-2 и WTL15AG1, оба они активировали pSTAT5 в больших фракциях все популяции клеток. N8 8RL15AG1 стимулировал сигнал pSTAT5 в популяции регуляторных Т-клеток близко к уровню wt IL-2, при незначительной активации других типов клеток, за исключением естественных киллерных клеток. Дополнительный анализ (не показано) демонстрировал, что pSTAT5⁺ естественные киллерные клетки представляли собой CD25^{высок}, что является характеристикой NK-CD56^{bright} клеток, субпопуляции естественных киллерных клеток, которые также обладают иммунорегуляторной активностью (Poli, A, et al., 2009? Immunology. 126(4):458-65). Несколько типов клеток, которые имели низкий уровень сигналов pSTAT5 при использовании N88ML-2 (активированные CD4 Teff клетки, CD4 Teff клетки, естественные киллерные Т-клетки и естественные киллерные клетки), демонстрировали нулевые или более низкие сигналы pSTAT5 при использовании N88RL15AG1. Эти результаты демонстрируют активность и высокую избирательность N88RL15AG1 для регуляторных Т-клеток в сложной биологической среде.

Таблица I

Fc слитые белки, одобренные US FDA, и их характеристики

Лекарственное средство	Изотип Fc	Партнер слияния	N или C слитая конструкция	Линкерный пептид	Время полужизни (сутки)
Ромиплостим	G1	Пептид TPO-R	C	Y	3, 5
Этанерцепт	G1	P75 TNFa-R	N	N	4, 3

Алефасепт	G1	LFA3	N	N	10,1
Рилонацепт	G1	IL1-R	N	N	8,6
Абатацепт	G1	CTLA4	N	N	16,7
Белатацепт	G1	CTLA4 (мут.)	N	N	9,8
Афлиберцепт	G1	VEGF R1+R2	N	N	Нет данных
Дулаглутид	G4 (мут.)	GLP1	N	Y	3,7
Элократ	G1	FVIII	N	N	0,8
Алпроликс	G1	FIX	N	N	3,6

Таблица II

Аффинность IL-2 Fc слитых белков к субъединицам IL-2RA и IL-2RB

Лиганд	Аналит	Метод	k_{on}	k_{off}	K_d (M)
IL2RA	IL-2	Кинетика	$5,85 \times 10^6$	$8,4 \times 10^{-2}$	$1,44 \times 10^{-8}$
	N88RL9AG1	Кинетика	$1,78 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,63 \times 10^{-9}$
	D20HL0G2	Кинетика	$1,66 \times 10^7$	0,137	$8,30 \times 10^{-9}$
	IL-2	Равновесие	-	-	$1,47 \times 10^{-8}$
	N88RL9AG1	Равновесие	-	-	$9,36 \times 10^{-9}$
IL2RB	IL-2	Кинетика	$5,10 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-1}$	$5,87 \times 10^{-7}$
	N88RL9AG1	Кинетика	nd	nd	-
	IL-2	Равновесие	-	-	$2,53 \times 10^{-7}$
	N88RL9AG1	Равновесие	-	-	$7,60 \times 10^{-2}$

nd - связывание не обнаруживали.

Таблица III

Белок	IL2	Пептидный линкер	Конфигурация	SEQ ID NO.
N88RL0AG1	N88R	0	X-Fc	6
N88RL5AG1	N88R	5	X-Fc	7
N88RL10AG1	N88R	10	X-Fc	8
N88RL15AG1	N88R	15	X-Fc	9
N88RL20AG1	N88R	20	X-Fc	10
WTLOAG1	wt	0	X-Fc	11
WTL15AG1	Wt	15	X-Fc	12
D20HL15AG1	D20H	15	X-Fc	13
AG1L15D20H	D20H	15	Fc-X	14

Таблица IV

Белок	EC50	Максимальный ответ pSTAT5 при 10^{-8} M	Кратность увеличения при максимальном ответе pSTAT5
N88RL0AG1	$>10^{-8}$	0,33	1,0
N88RL5AG1	$>10^{-8}$	0,52	1,6
N88RL9AG1	7×10^{-10}	0,96	2,9
N88RL10AG1	9×10^{-10}	0,90	2,7
N88RL15AG1	4×10^{-10}	1,22	3,7
N88RL20AG1	1×10^{-10}	1,40	4,2

Таблица V

	Контроль	IL-2	WTL15AG 1	N88R/IL- 2	N88RL15AG 1
Регуляторные Т-клетки	0,8	99,9	99,8	99,9	75,1
Активированные CD4	0,1	70,5	65,2	3,7	0,1
Teff клетки					
CD4 Teff клетки	0,2	60,9	40,0	2,4	0,5
CD8 Teff клетки	0,1	90,2	35,4	2,3	0,1
NKT клетки	0,5	74,9	60,5	20,5	5,2
NK клетки	0,3	96,8	96,1	49,9	19,3
В-клетки	0,1	20,9	10,6	0,2	0,1

Процентная доля рSTAT5⁺ клеток в иммунных клетках 7 типов в PBMC человека. Клетки обрабатывали белками, указанными в заголовках колонок и анализировали, как описано в примере 6.

Список последовательностей

SEQ ID NO.1

>human IL-2
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGAGGGGDKTHTCPP

SEQ ID NO.2

>human IgG1 (N297A) Fc
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSP
 GK

SEQ ID NO.3

>human IgG2 Fc
 VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK*

SEQ ID NO.4

>N88RL9AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGAGGGGDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK*

SEQ ID NO.5

>D20HLOG2
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTVECPCCPAPPVAGPSVFL
 FPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK*

SEQ ID NO.6

>N88RL0AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG*

SEQ ID NO.7

>N88RL5AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG*

SEQ ID NO.8

>N88RL10AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
 SVLTVLHQDWLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG*

SEQ ID NO.9

>N88RL15AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIFEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
 SVLTVLHQDWLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG*

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO. 10

>N88RL20AG1

APTSSSTFKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKADELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRNINVI VLEELKGSSETTFMCEYADETATITVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGG
GGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSL
LSPG*

SEQ ID NO. 11

>WTL0AG1

APTSSSTFKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKADELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRNINVI VLEELKGSSETTFMCEYADETATITVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGG
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO. 12

>WTL15AG1

APTSSSTFKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKADELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRNINVI VLEELKGSSETTFMCEYADETATITVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGG
THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO. 13

>D20HL15AG1

APTSSSTFKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKADELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRNINVI VLEELKGSSETTFMCEYADETATITVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGG
THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO. 14

>AG1L15D20H

DKTHTTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GGGGSGGGSGGGSGGAPTSSSTFKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKADELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRNINVI VLEELKGSSETTFMCEYADETATITVEFLNRWITFSQSIISTLT*

SEQ ID NO. 15

>L9

GGGGAGGGG

SEQ ID NO. 16

>L5

GGGGS

SEQ ID NO. 17

>L10

GGGGSGGGG

SEQ ID NO. 18

>L15

GGGGSGGGSGGGG

SEQ ID NO. 19

>L20

GGGGSGGGSGGGSGGGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, который содержит:

- N-концевой вариант белка IL-2 человека; и
- C-концевой белок Fc IgG; и
- пептид,

где каждый из варианта белка IL-2 человека, белка Fc IgG и линкерного пептида имеет аминоконец (N-конец) и карбоксильный конец (C-конец) и где слитый белок сконструирован так, что C-конец варианта белка IL-2 человека слит посредством пептидной связи с N-концом линкерного пептида и N-конец белка Fc IgG слит посредством пептидной связи с C-концом линкерного пептида.

2. Слитый белок по п.1, в котором вариант белка IL-2 содержит IL-2 человека с заменой, выбранной из группы, состоящей из N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L, Q126F, D84G и D84I относительно аминокислотной последовательности белка IL-2 человека с SEQ ID NO: 1.

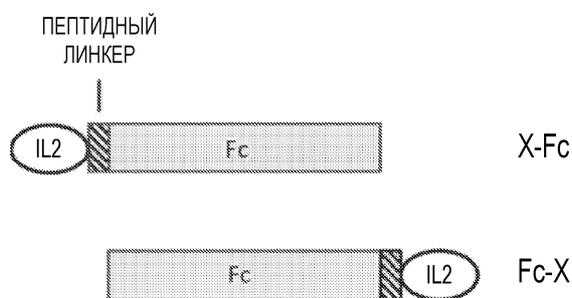
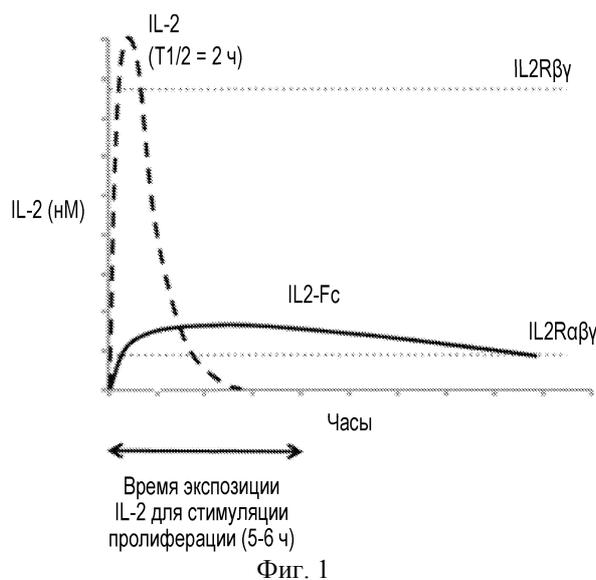
3. Слитый белок по п.1, в котором вариант белка IL-2 содержит IL-2 человека с заменами N88R и C125S относительно аминокислотной последовательности белка IL-2 человека с SEQ ID NO: 1.

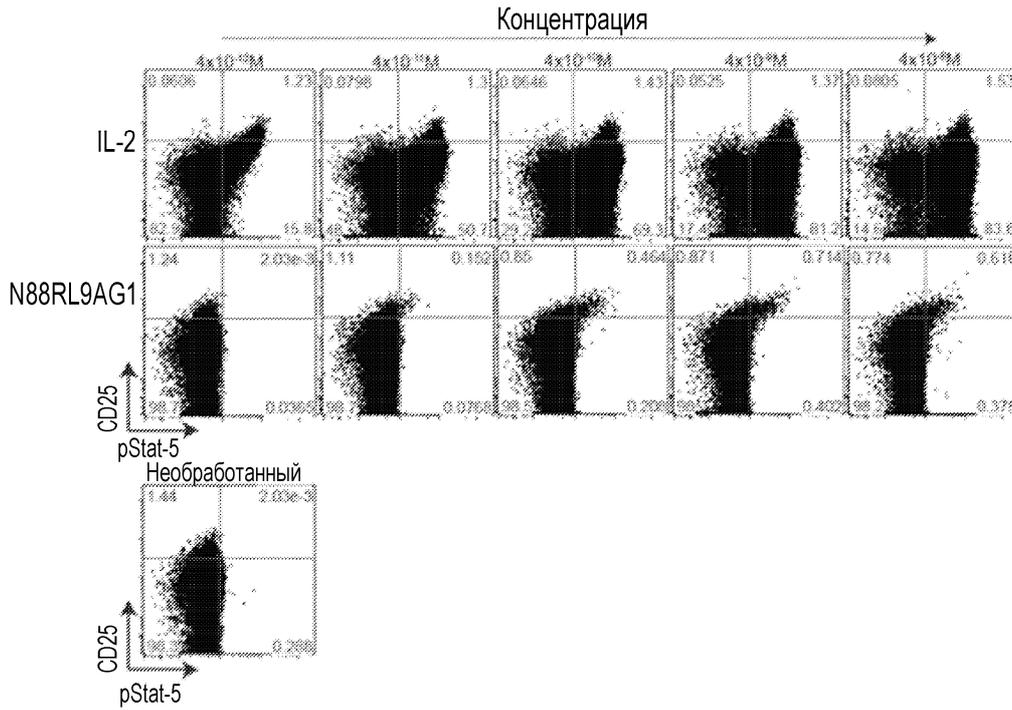
4. Слитый белок по п.1, в котором белок Fc IgG содержит одну или несколько замен аминокислот, которые снижают эффекторные функции белка Fc IgG.

5. Слитый белок по п.1, в котором:

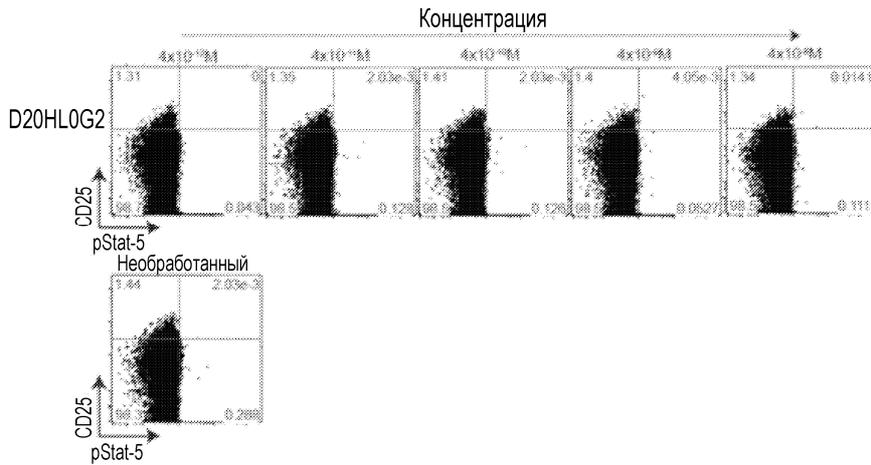
- вариант белка IL-2 имеет замены аминокислот N88R и C125S относительно аминокислотной последовательности белка IL-2 человека с SEQ ID NO: 1;
- линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

- с) белок Fc IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
6. Фармацевтическая композиция для лечения аутоиммунного заболевания, которая содержит слитый белок по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
7. Способ избирательной активации регуляторных Т-клеток человека, включающий введение слитого белка по п.1, где слитый белок вводят в терапевтически эффективной дозе до тех пор, пока концентрации регуляторных Т-клеток человека не достигают желаемых уровней.
8. Димерный белок, который содержит две идентичные цепи, где каждая цепь содержит слитый белок по п.1.
9. Димерный белок по п.8, в котором вариант белка IL-2 содержит IL-2 человека с заменами C125S и N88R относительно аминокислотной последовательности белка IL-2 человека с SEQ ID NO: 1.
10. Димерный белок по п.8, в котором линкерный пептид состоит из линкера, выбранного из группы, состоящей из остатков глицина, остатков серина и смеси остатков глицина и серина.
11. Белок по п.8, в котором вариант белка IL-2 имеет замену N88R относительно аминокислотной последовательности белка IL-2 человека с SEQ ID NO: 1.
12. Димерный белок по п.8, в котором линкер содержит смесь от 12 до 17 остатков серина и глицина.
13. Димерный белок по п.8, в котором линкер содержит остатки глицина и остатки серина в соотношении 4:1.
14. Нуклеиновая кислота, которая кодирует слитый белок по п.1.
15. Способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка по п.1.
16. Способ по п.15, в котором аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из диабета 1-го типа, системной красной волчанки и реакции трансплантат против хозяина.

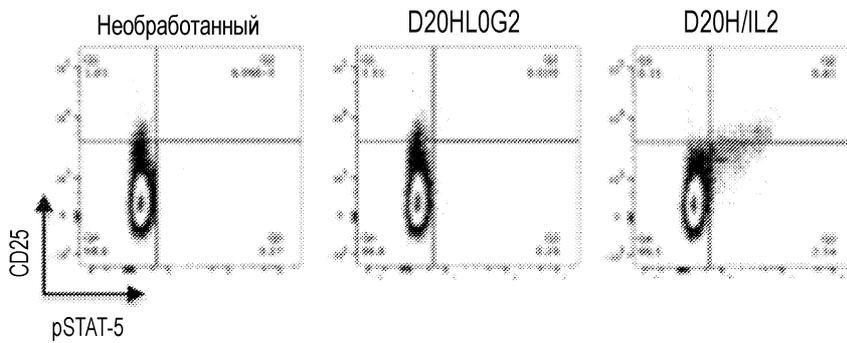




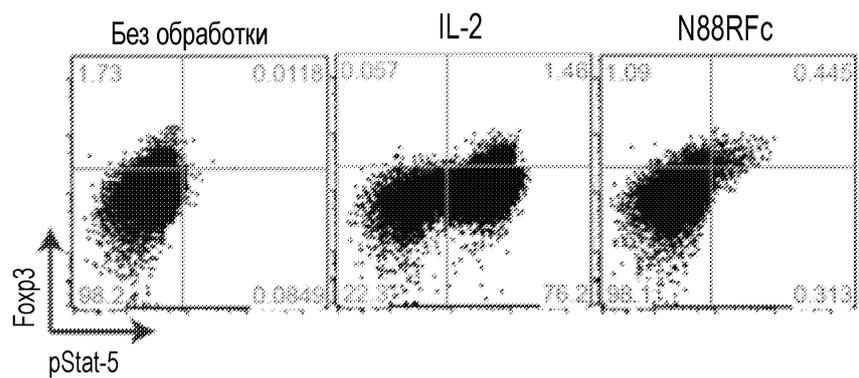
Фиг. 3А



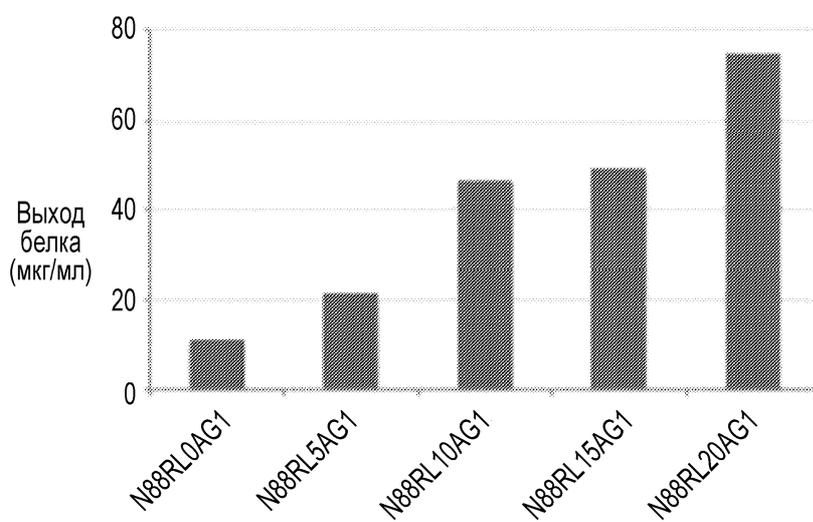
Фиг. 3В



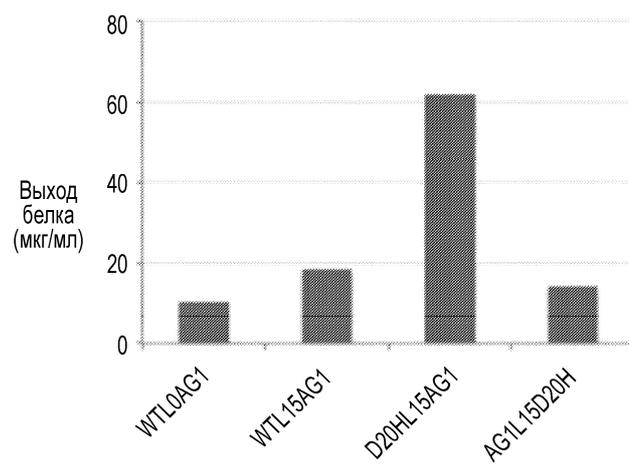
Фиг. 3С



Фиг. 4

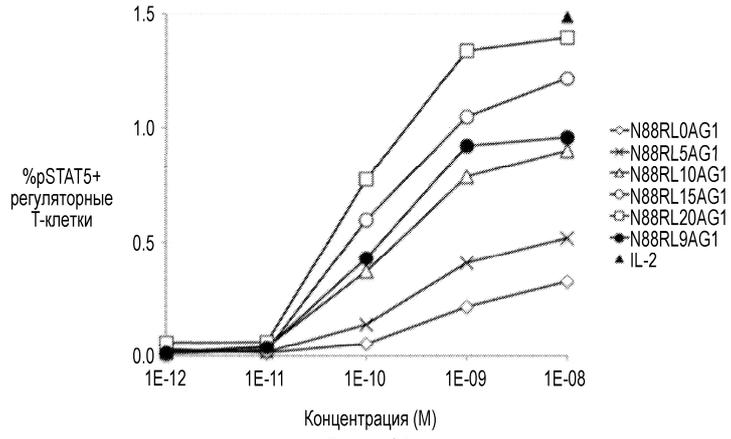


Фиг. 5А

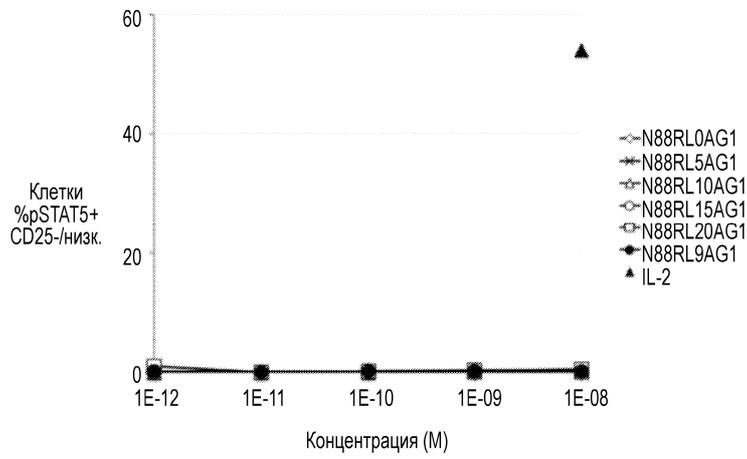


Фиг. 5В

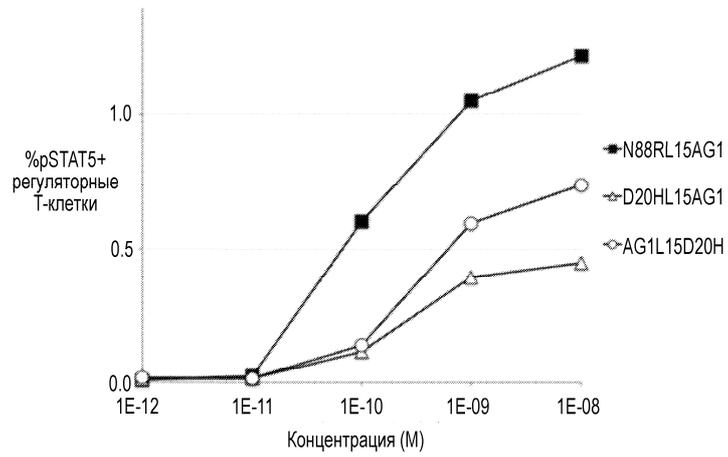
038361



Фиг. 6А

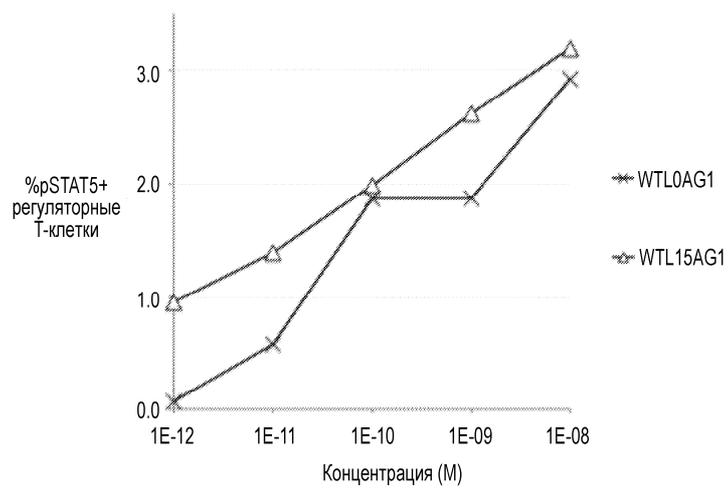


Фиг. 6В

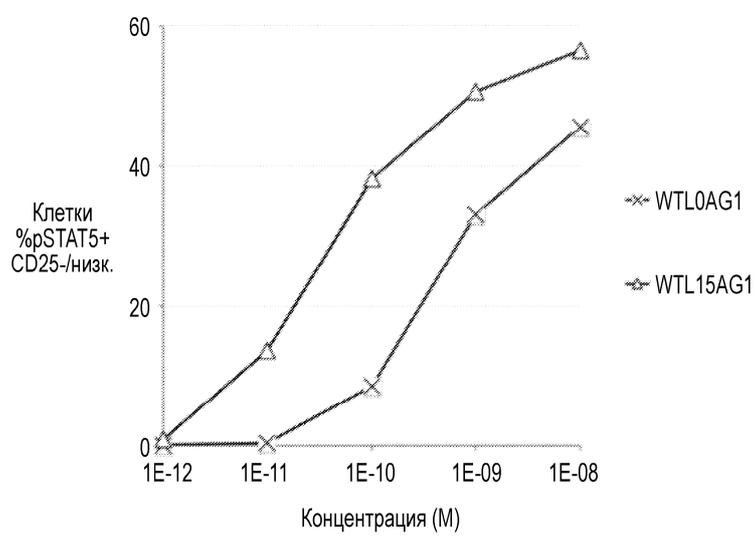


Фиг. 7

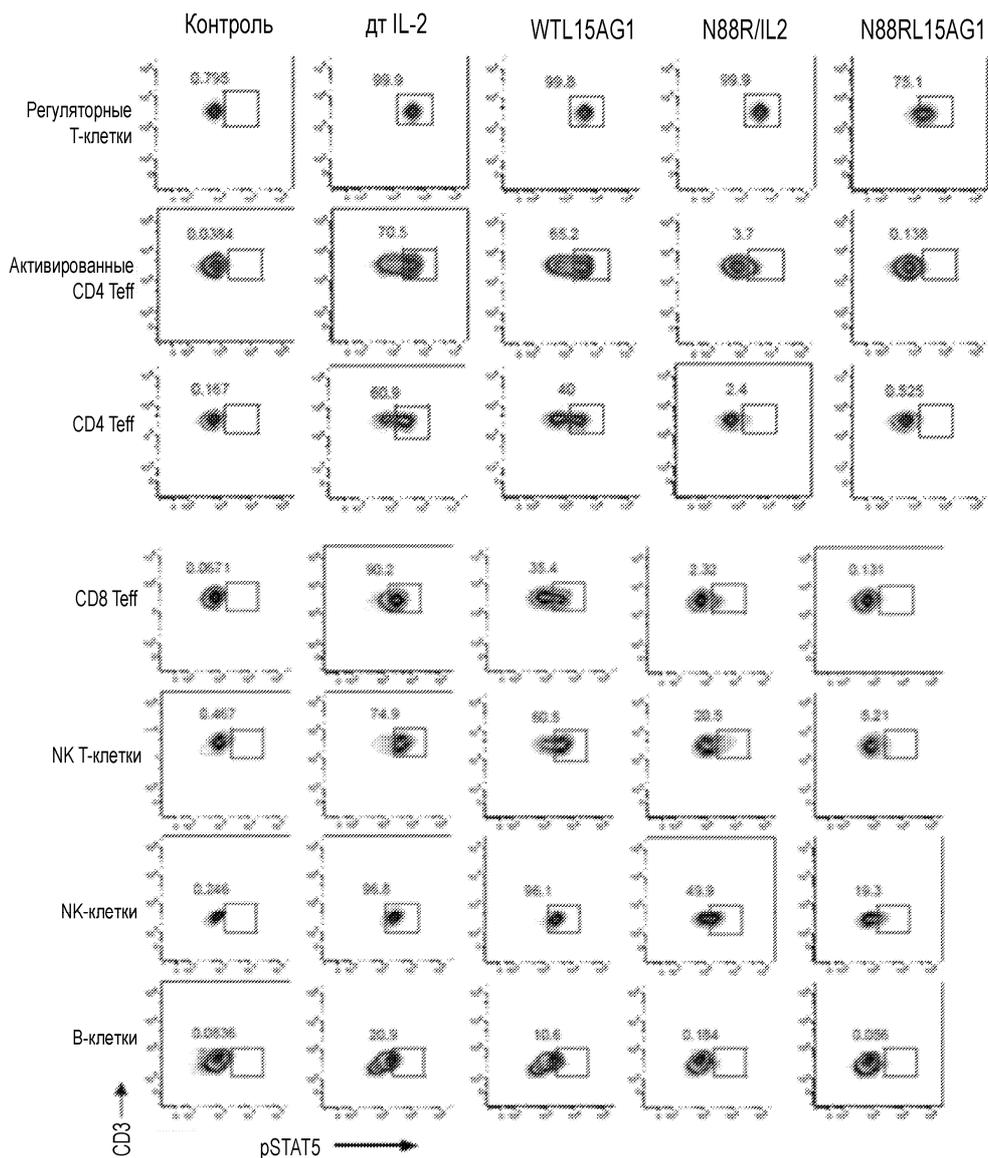
038361



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2