



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119140** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C12N 15/26 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 09641</p> <p>(22) Дата подання заявки: 14.03.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.05.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/784,669</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.03.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.12.2015, Бюл.№ 24</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2019, Бюл.№ 9</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2014/029111, 14.03.2014</p>	<p>(72) Винахідник(и): Гейвін Марк А. (US), Каннан Гунасекаран (US), Лі Лі (US), Пірсон Джошуа Т. (US), Кароу Маргарет (US)</p> <p>(73) Власник(и): ЕМДЖЕН ІНК., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California, 91320-1799, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009061853 A2, 14.05.2009 WO 2010085495 A1, 29.07.2010</p>
---	---

(54) МУТЕЇН ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2, ЩО СТИМУЛЮЄ РЕГУЛЯТОРНІ Т-КЛІТИНИ

(57) Реферат:

Винахід стосується мутеїну інтерлейкіну-2 людини (ІЛ-2), що має амінокислотну заміну V91K, та стимулює регуляторні Т-клітини. Винахід також стосується Fc- злитого білка, виділеної нуклеїнової кислоти, вектора експресії, клітини-хазяїна, способу отримання мутеїну ІЛ-2, способу збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин до кількості нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин або у периферичній крові суб'єкта, способу збільшення кількості регуляторних клітин до кількості природних клітин-кілерів у периферичній крові суб'єкта, способу лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання та способу контролю відповіді суб'єкта на лікування мутеїном ІЛ-2.

UA 119140 C2

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США №61/784669, подану 14 березня 2013 р. Вказана вище заявка включена в цю заявку шляхом посилання.

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Ця заявка подається разом з переліком послідовностей, що представлений в електронній формі за допомогою системи EFS-Web. Перелік послідовностей представлений у вигляді файлу в текстовому форматі з назвою A-1826-WO-PCT_ST25.txt, який був створений 25 лютого 2014 р. і має розмір 40849 байтів. Інформація, що міститься у переліку послідовностей, що представлений в електронній формі, повністю включена в цю заявку шляхом посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) зв'язується з трьома трансмембранними субодинацями рецептора: ІЛ-2R β й ІЛ-2R γ , які сумісно активують передачу сигналів усередині клітин після зв'язування з ІЛ-2, і білком CD25 (ІЛ-2R α), який стабілізує взаємодію між ІЛ-2 й ІЛ-2R $\beta\gamma$. Передача сигналів за допомогою ІЛ-2R $\beta\gamma$ задіяна у шляхах передачі сигналів за участю PI3-кінази, Ras-MAP-кінази й STAT5.

Для того, щоб відповідати на низькі концентрації ІЛ-2, які зазвичай присутні в тканинах, Т-клітинам необхідна експресія CD25. Підгрупа Т-клітин, що експресують CD25, включає FoxP3+ регуляторні Т-клітини (T_{рег}-клітини), які необхідні для пригнічення аутоімунного запалення, і FoxP3- Т-клітини, які надавали активації для експресії CD25. FoxP3-CD25+ ефекторні Т-клітини (T_{еф}) можуть належати до типу CD4+ кітин або CD8+ клітин, при цьому обидва типи можуть сприяти розвитку запалення, аутоімунних захворювань, відторгнення трансплантата органу або реакції "трансплантат проти хазяїна". Передача сигналів за участю STAT5, стимульованої ІЛ-2, має вирішальне значення для нормального росту й виживання T_{рег}-клітин і для досягнення високого рівня експресії FoxP3.

У заявці WO 2010/085495 тих же заявників ми описуємо застосування мутеїнів ІЛ-2 для переважної експансії або стимуляції T_{рег}-клітин. Вплив описаних мутеїнів на T_{рег}-клітини можна використовувати для лікування запальних і аутоімунних захворювань при введенні суб'єкту таких мутеїнів. Незважаючи на те, що мутеїни ІЛ-2, описані в цій заявці, можна застосувати для переважної експансії T_{рег} порівняно з T_{еф}-клітинами в умовах in vivo, бажаним було створення мутеїнів ІЛ-2, які б мали оптимальні характеристики для терапевтичного застосування у людини.

СУТЬ ВІНАХОДУ

У цій заявці описані мутеїни ІЛ-2, які можуть бути отримані з високим виходом і мають оптимізовану фармакологічну активність. Під час досліджень, спрямованих на отримання зразка терапевтичного засобу на основі мутеїну ІЛ-2 для застосування у людини, було зроблено декілька неочікуваних і непередбачуваних спостережень. Мутеїни ІЛ-2, описані в цій заявці, були отримані в результаті вказаних досліджень.

Мутеїни ІЛ-2, описані в цій заявці, мають мінімальну кількість змін ІЛ-2, що зменшує ймовірність виникнення імунної відповіді проти мутеїну ІЛ-2 і/або ендогенного ІЛ-2, при цьому зберігається здатність вказаних мутеїнів стимулювати переважну експансію й активацію T_{рег}-клітин. Окрім того, в деяких варіантах реалізації мутеїн ІЛ-2 гібридизований з молекулою, наприклад, фрагментом Fc антитіла, яка збільшує період напіввиведення з сироватки крові при введенні суб'єкту. Мутеїни ІЛ-2 мають короткий період напіввиведення з сироватки крові (від 3 до 5 годин при підшкірній ін'єкції). Приклади гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, описані в цій заявці, мають період напіввиведення у людини, що становить щонайменше 1 день, щонайменше 3 дні, щонайменше 5 днів, щонайменше 10 днів, щонайменше 15 днів, щонайменше 20 днів або щонайменше 25 днів. Детальний вплив на фармакокінетику мутеїнів ІЛ-2 дає змогу зменшити або знизити частоту введення терапевтичного засобу на основі мутеїну ІЛ-2.

Також при створенні великої молекули для фармацевтичного застосування особлива увага повинна бути приділена можливості отримання вказаної молекули в значних кількостях при одночасному зниженні до мінімуму агрегації і підвищенні до максимуму стабільності молекули. Гібридна молекула, що містить мутеїн ІЛ-2 й фрагмент Fc, має такі характеристики.

Окрім того, в деяких варіантах реалізації цього винаходу гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 й фрагмент Fc, містить фрагмент Fc з IgG1. Було показано, що в тих випадках, коли бажаним є усунення ефекторних функцій IgG1 (наприклад, ADCC-індукуючої активності), мутаційна заміна аспарагіну в позиції 297 гліцином (N297G; згідно з системою нумерації ЕС) забезпечує суттєве підвищення ефективності очищення й біофізичних властивостей порівняно з іншими мутаціями, які призводять до відсутності глікозилування фрагмента Fc IgG1. У переважних варіантах реалізації цього винаходу залишки цистеїну вводять у фрагмент Fc, щоб

забезпечити формування дисульфідних зв'язків, які збільшують стабільність молекули, що містить неглікозилований фрагмент Fc. Корисні властивості неглікозилизованого фрагмента Fc знаходяться за рамками обговорення гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 й фрагмент Fc. Таким чином, у цьому винаході запропоновані Fc-вмісні молекули, Fc-гібридні білки й антитіла, що містять заміну N297G і, можливо, заміну одного або більше додаткових залишків цистеїном.

У іншому аспекті цей винахід стосується глікозилованих пептидних лінкерів. Переважні лінкерні пептиди, які придатні для модифікації шляхом N-глікозилування, включають GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7).

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований мутеїн інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) людини, що містить заміну V91K і має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 1, при цьому вказаний мутеїн ІЛ-2 переважно стимулює регуляторні Т-клітини. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 людини містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 1. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний мутеїн містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 1. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу амінокислота в позиції 125 являє собою аланін. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу амінокислота в позиції 125 являє собою цистеїн.

Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу запропонований Fc-гібридний білок, що містить фрагмент Fc і мутеїн ІЛ-2 людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc являє собою фрагмент Fc IgG1 людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc IgG1 людини містить одну або більше мутацій, що змінюють ефекторну функцію вказаного фрагмента Fc. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу IgG1 людини містить заміну в позиції N297. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу заміна в позиції N297 являє собою N297G. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу Fc-гібридний білок містить заміну або делецію С-кінцевого лізину вказаного фрагмента Fc IgG людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу у вказаному фрагменті Fc IgG людини видалений С-кінцевий лізин. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc і мутеїн ІЛ-2 людини у вказаному білку з'єднані лінкером. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний лінкер являє собою GGGGS, GGNGT або YGNGT. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний лінкер являє собою GGGGS. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить вставки, заміни або делеції амінокислот, які призводять до зміни характеру глікозилування вказаного Fc-гібридного білка при експресії у клітинах ссавців. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 містить заміну T3N або T3A. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 містить заміну T3N. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5T. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу Fc-гібридний білок містить димер Fc. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний Fc-гібридний білок містить два мутеїни ІЛ-2. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний Fc-гібридний білок містить один мутеїн ІЛ-2.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонована виділена нуклеїнова кислота, що кодує мутеїн ІЛ-2 людини або частину Fc антитіла і мутеїни ІЛ-2 людини. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу вказана частина Fc антитіла і мутеїн ІЛ-2 людини кодуються у межах однієї відкритої рамки читування. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc являє собою фрагмент Fc IgG1 людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc IgG1 людини містить одну або більше мутацій, що змінили ефекторну функцію вказаного фрагмента Fc. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу IgG1 людини містить заміну в позиції N297. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу заміна в позиції N297 являє собою N297G. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc IgG1 людини містить заміну або делецію С-кінцевого лізину. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу у вказаному фрагменті Fc IgG людини видалений С-кінцевий лізин. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу нуклеїнова кислота додатково кодує лінкер, що з'єднує частину Fc антитіла й мутеїн ІЛ-2 людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний лінкер являє собою GGGGS, GGNGT або YGNGT. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказаний лінкер являє собою GGGGS. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить вставки, заміни або делеції амінокислотних залишків, що змінюють характер глікозилування білка, що містить вказаний мутеїн ІЛ-2, при експресії в клітинах ссавців. Згідно з іншим варіантом

реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3N або Т3А. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3N. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5. Згідно з іншим варіантом реалізації цього

5

винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5T.
Згідно з іншим аспектом цього винаходу запропонований вектор експресії, що містить виділену нуклеїнову кислоту, описану вище, функціонально зв'язану з промотором.

Згідно з іншим аспектом цього винаходу запропонована клітина-хазяїн, що ключає виділену нуклеїнову кислоту, описану вище. В одному варіанті реалізації цього винаходу виділена нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з промотором. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказана клітина-хазяїн являє собою прокариотичну клітину. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу клітина-хазяїн являє собою клітину *E.coli*. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказана клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу клітина-хазяїн являє собою лінію клітин яєчника китайського хом'ячка (СНО).

10

15

Згідно з іншим аспектом цього винаходу запропонований спосіб виготовлення мутеїну ІЛ-2 людини, що включає культивування клітини-хазяїна, описаної вище, за умов, що забезпечують експресію вказаного промотору, і отримання мутеїну ІЛ-2 людини з цієї культури. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу спосіб включає культивування клітини-хазяїна, описаної вище, за умов, що забезпечує експресію вказаного промотору, й отримання Fc-гібридного білка з цієї культури.

20

Згідно з іншим аспектом цього винаходу запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин у контакт з ефективною кількістю мутеїну ІЛ-2 людини, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.

25

30

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин у контакт з ефективною кількістю Fc-гібридного білка, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.

35

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну ІЛ-2 людини, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.

40

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-гібридного білка, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3+FоxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.

45

50

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості природних клітин-кілерів (NK-клітин) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну ІЛ-2 людини, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FоxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується щонайменше на 50 %.

55

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості природних клітин-кілерів (NK-

60

клітин) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-гібридного білка, описаного вище. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості CD3+FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується щонайменше на 50 %.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання, що включає введення вказаному суб'єкту терапевтично ефективної кількості мутеїну ІЛ-2, описаного вище.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання, що включає введення вказаному суб'єкту терапевтично ефективної кількості Fc-гібридного білка, описаного вище. В одному варіанті реалізації цього винаходу введення викликає зменшення щонайменше одного симптому вказаного захворювання. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{reg}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта збільшується після введення. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{reg}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта залишається по суті незмінним після введення. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу запальне або аутоімунне захворювання являє собою вовчак, реакцію "трансплантат проти хазяїна", гепатит С-індукований васкуліт, цукровий діабет І типу, розсіяний склероз, спонтанну втрату вагітності, atopічні захворювання або запальні захворювання кишечника.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований фрагмент Fc антитіла IgG1 людини, при цьому вказаний фрагмент Fc містить мутацію N297G, й амінокислотна послідовність вказаного фрагмента Fc IgG1 людини щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 3. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу амінокислотна послідовність фрагмента Fc IgG1 людини щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc людського IgG1 містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc люського IgG1 додатково містить одну або більше мутацій для стабілізації поліпептиду. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу одна або більше амінокислот, наведених у SEQ ID NO: 3, заміщені цистеїном. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу залишки V259, A287, R292, V302, L306, V323 або I332 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3, заміщені цистеїном. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc містить заміну A287C і L306C у межах амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc містить заміну V259C і L306C у межах амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc містить заміну R292C і V302C у межах амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc містить заміну V323C і I332C у межах амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропоноване антитіло, що містить фрагмент Fc, описаний вище.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований Fc-гібридний білок, що містить фрагмент Fc, описаний вище.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований поліпептид, що містить лінкер, що являє собою GGNGT або YGNGT. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу лінкер містить N-глікозилування. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу лінкер вставлений або заміщує петлю в поліпептидній структурі.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб створення молекули, що містить неглікозилований фрагмент Fc IgG1, що включає експресію нуклеїнової кислоти, кодуючий поліпептид, описаний вище, в культурі клітин ссавців і отримання молекули, що містить неглікозилований фрагмент Fc IgG1, з цієї культури.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб створення молекули, що містить неглікозилований фрагмент Fc IgG1, за експресії в клітинах ссавців, що включає етап мутаційної заміни кодону N297 у фрагменті Fc кодоном, який кодує гліцин.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований Fc-гібридний білок, що містить послідовність SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 20. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу запропонована нуклеїнова кислота, що кодує Fc-гібридний білок. Згідно з одним

варіантом реалізації цього винаходу запропонована клітина, що включає вказану нуклеїнову кислоту. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу запропонований спосіб отримання Fc-гібридного білка, що включає інкубування клітини за умов, що забезпечують експресію вказаного Fc-гібридного білка. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу запропонований спосіб лікування запального або аутоімунного захворювання у суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-гібридного білка вказаному суб'єкту. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу вказане запальне або аутоімунне захворювання являє собою реакцію "трансплантат проти хазяїна".

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропонований спосіб контролю відповіді суб'єкта на лікування з використанням мутеїну інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) людини, описаного вище, або Fc-гібридного білка, описаного вище, що включає детектування визначеної зміни у вказаного суб'єкта, причому визначена зміна являє собою підвищення температури тіла, підвищення концентрації С-реактивного білка (СРБ) в периферичній крові вказаного суб'єкта, зменшення кількості тромбоцитів у периферичній крові вказаного суб'єкта, зменшення кількості нейтрофілів у периферичній крові вказаного суб'єкта або зменшення концентрації альбуміну в периферичній крові вказаного суб'єкта, при цьому в випадку детектування такої зміни лікування припиняють, призупиняють, зменшують частоту дозування або зменшують кількість препарату, що вводять. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу визначена зміна включає підвищення температури тіла щонайменше на 0,5 °С, збільшення концентрації С-реактивного білка в периферичній крові вказаного суб'єкта щонайменше на 0,2 мг/мл, зменшення кількості тромбоцитів у периферичній крові вказаного суб'єкта щонайменше в 0,8 разу, зменшення кількості нейтрофілів у периферичній крові вказаного суб'єкта щонайменше в 0,8 разу або зниження концентрації альбуміну в периферичній крові вказаного суб'єкта щонайменше в 0,4 разу.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

ФІГ. 1. Гетеродимеризація шляхом гібридизації з С-кінцем фрагмента Fc IgG не змінює активність мутеїнів ІЛ-2, що мають знижену ефективність і високу афінність відносно CD25, згідно з результатами короточасного дослідження з використанням стимуляції.

ФІГ. 2А і ФІГ. 2В. Мутеїни ІЛ-2, що містять вказані мутації й гібридизовані з С-кінцем однієї сторони Fc-гетеродимеру, досліджували для визначення їхньої здатності стимулювати фосфорилювання STAT5 в Т-клітинах. Ці мутеїни також містили три мутації, що надають високу афінність відносно CD25 (V69A, N71R, Q74P). Їхню активність порівнювали з активністю трьох форм ІЛ-2, не гібридизованих з фрагментом Fc (відкриті символи): WT ІЛ-2, HaWT (висока афінність відносно CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) і HaD (висока афінність відносно CD25 і знижена активність при передачі сигналів) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Відповіді фосфо-STAT5 наведені для популяції Fc α P3+CD4+ і Fc α P3-CD4+ Т-клітин за інтенсивності сигналу вище від порогового значення.

ФІГ. 3. Проліферація підгрупи Т-клітин у відповідь на титрування доз мутеїнів ІЛ-2, гібридизованих з Fc-гетеродимером. Активність гібридних білків порівнювали з такою для трьох форм ІЛ-2, не гібридизованих з фрагментом Fc (відкриті символи): WT ІЛ-2, HaWT (висока афінність відносно CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) і HaD (висока афінність відносно CD25 і знижена активність при передачі сигналів) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

ФІГ. 4. Проліферація NK-клітин у відповідь на титрування доз мутеїнів ІЛ-2, гібридизованих з Fc-гетеродимером. Активність гібридних білків порівнювали з такою для трьох форм ІЛ-2, не гібридизованих з фрагментом Fc (відкриті символи): WT ІЛ-2, HaWT (висока афінність відносно CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) і HaD (висока афінність відносно CD25 і знижена активність при передачі сигналів) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

ФІГ. 5. Проліферація підгрупи Т-клітин у відповідь на титрування доз мутеїнів ІЛ-2, гібридизованих з Fc-гетеродимером N297G. Активність мутеїнів, гібридизованих з фрагментом Fc, порівнювали з такою для ІЛ-2 дикого типу (відкриті кола) і Fc дикого типу (забарвлені кола). Мутації, які зумовлюють високу афінність відносно CD25 (HaMut1), включали V69A і Q74P.

ФІГ. 6. Проліферація NK-клітин у відповідь на титрування доз мутеїнів ІЛ-2, гібридизованих з Fc-гетеродимером N297G. Активність мутеїнів, що містили фрагмент Fc, порівнювали з такою для ІЛ-2 дикого типу (відкриті кола) і Fc дикого типу (забарвлені кола).

ФІГ. 7А і ФІГ. 7В. Мутеїни ІЛ-2.Fc, які не містять мутацій, що зумовлюють високу афінність відносно CD25, стимулюють експансію T_{per}-клітин і активацію Fc α P3 у гуманізованих мишей.

ФІГ. 8. Низькі щотижневі дози (0,5 мкг на тварину) мутеїнів ІЛ-2.Fc стимулюють експансію T_{per}-клітин і активацію Fc α P3 у гуманізованих мишей, при цьому для Fc.V91K спостерігали вищу

активність порівняно з такою для Fc.N88D і Fc.WT.

ФІГ. 9А. Fc.V91K і Fc.N88D зберігаються на поверхні активованих Т-клітин за рахунок зв'язку з CD25.

5 ФІГ. 9В. Підтримання процесу передачі сигналів за участю ІЛ-2R при введенні Fc.V91K і Fc.N88D порівняно з Fc.WT.

ФІГ. 10А і В. Порівняння інтервалів між періодами дозування Fc.V91K, які становлять два тижні і чотири тижні, у яванських макак, і порівняння ефективності внутрішньовенного (в/в) і підшкірного (п/ш) шляхів введення.

10 ФІГ. 11А-Ф. Кінетичні параметри клітинних відповідей, температура тіла й концентрація С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові у яванських макак, що отримували пролейкін®, Fc.V91K і Fc.N88D відповідно до різних схем дозування.

ФІГ. 12А. Вплив збільшення дозування пролейкіну®, Fc.V91K або Fc.N88D на рівні T_{per} -клітин, NK-клітин, $CD4^{+}FoxP3^{-}$ Т-клітин і $CD8^{+}FoxP3^{-}$ Т-клітин у яванських макак. Кожна точка являє собою середні максимальні відповіді від чотирьох тварин.

15 ФІГ. 12В. Вплив збільшення дозування пролейкіну®, Fc.V91K або Fc.N88D на рівні T_{per} -клітин і еозинофілів у яванських макак. Кожна точка являє собою середні максимальні відповіді від чотирьох тварин.

20 ФІГ. 12С. Вплив збільшення дозування пролейкіну®, Fc.V91K або Fc.N88D на рівні T_{per} -клітин, концентрацію СРБ і температуру тіла у яванських макак. Кожна точка являє собою середні максимальні відповіді від чотирьох тварин.

25 ФІГ. 12D. Вплив збільшення дозування пролейкіну®, Fc.V91K або Fc.N88D на кількість T_{per} -клітин, тромбоцитів, нейтрофілів і концентрацію альбуміну у яванських макак. Кожна точка являє собою середні максимальні відповіді від чотирьох тварин. Праві осі ОУ перевернуті, щоб відобразити відносне зниження кількості тромбоцитів, нейтрофілів або концентрації альбуміну порівняно зі зразками, отриманими до початку дозування.

ФІГ. 13. Кінетика вироблення антитіл до лікарського препарату (ADA) у яванських макак, що отримували Fc.V91K.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ПЕРЕВАЖНИХ ВАРІАНТІВ РЕАЛІЗАЦІЇ ВІНАХОДУ

30 Заголовки розділів, що використовуються у цій заявці, призначені виключно для структурування тексту опису і не повинні бути витлумачені як такі, що обмежують предмет цього винаходу. Усі літературні джерела, що наведені в цьому описі, очевидним чином повністю включені в цю заявку шляхом посилання.

35 Стандартні методики можуть бути використані для отримання рекомбінантних ДНК, синтезу олігонуклеотидів, культивування й трансформації тканин, очищення білків і т.п. Ферментативні реакції й методики очищення можуть бути виконані згідно з технічними умовами виробника або згідно зі стандартним способом реалізації, відомим з цього рівня техніки або як описано в цій заявці. Перераховані далі процедури й методики можуть бути, як правило, виконані згідно зі стандартними способами, добре відомими в цій галузі техніки, і як описано у різних загальних і більш конкретних посиланнях, які цитуються й обговорюються в цьому описі. Див., наприклад, керівництво Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., яке включено в цю заявку шляхом посилання для будь-яких цілей. У тому випадку, якщо не передбачені конкретні визначення, використовується номенклатура, лабораторні процедури й методики, що стосуються рівня аналітичної хімії, органічної хімії, медичної і фармацевтичної хімії, описані в цій заявці, є добре відомими й зазвичай використовуються в цій галузі техніки. Для проведення хімічного синтезу, хімічних досліджень, приготування і доставки фармацевтичного препарату й лікування пацієнтів можуть бути використані стандартні методики.

ІЛ-2

50 Мутеїни ІЛ-2, що описані в цій заявці, являють собою варіанти людського ІЛ-2 дикого типу. У цій заявці термін "людський ІЛ-2 дикого типу", "ІЛ-2 дикого типу" або "WT ІЛ-2" означає поліпептид, що має таку амінокислотну послідовність:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

В якій Х являє собою С, S, V або А (SEQ ID NO: 2).

55 Варіанти можуть містити одну або більше заміни, делецій або вставок у межах амінокислотної послідовності ІЛ-2 дикого типу. У цій заявці залишки амінокислот позначені однолітерним кодом, після якого зазначена позиція амінокислоти в ІЛ-2, наприклад, K35 являє собою залишок лізину в позиції 35 у послідовності SEQ ID NO: 2. У цій заявці заміни амінокислот позначені однолітерним кодом, після якого зазначена позиція амінокислоти в ІЛ-2, за яким слідує однолітерний код заміної амінокислоти, наприклад, K35A являє собою заміну залишку

60

лізину в позиції 35 у послідовності SEQ ID NO: 2 залишком аланіну.

Мутеїни ІЛ-2

У цьому винаході запропоновані мутеїни ІЛ-2 людини, які переважно стимулюють регуляторні Т-клітини ($T_{\text{рег}}$). У цій заявці термін "переважно стимулює регуляторні Т-клітини" означає, що мутеїн підсилює проліферацію, виживання, активацію і/або функцію CD3+FoxP3+ Т-клітин у більшій мірі, ніж CD3+FoxP3- Т-клітин. Здатність переважно стимулювати $T_{\text{рег}}$ -клітини може бути виміряна за допомогою методу проточної цитометрії лейкоцитів периферичної крові, в якій спостерігають збільшення відсотка частки FoxP3+CD4+ Т-клітин в загальній популяції CD4+ Т-клітин, збільшення відсотка частки FoxP3+CD8+ Т-клітин у загальній популяції CD8+ Т-клітин, збільшення відсотка частки FoxP3+ Т-клітин відносно NK-клітин, і/або більш виражене збільшення рівня експресії CD25 на поверхні FoxP3+ Т-клітин відносно збільшення рівня експресії CD25 на поверхні інших типів Т-клітин. Переважну експансію $T_{\text{рег}}$ -клітин також можна детектувати як збільшення представлення деметильованої ДНК промотору FoxP3 (тобто $T_{\text{рег}}$ -специфічної деметильованої області або TSDR) відносно деметильованих генів CD3 в загальній ДНК, екстрагованій з цільної крові, згідно з результатами секвенування продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), отриманих з геномної ДНК, обробленої бісульфітом (J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

Мутеїни ІЛ-2, які переважно стимулюють $T_{\text{рег}}$ -клітини, збільшують співвідношення кількості CD3+FoxP3+ Т-клітин до кількості CD3+FoxP3- Т-клітин у суб'єкта або в зразку периферичної крові щонайменше на 30 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 100 %, щонайменше на 150 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 300 %, щонайменше на 400 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 600 %, щонайменше на 700 %, щонайменше на 800 %, щонайменше на 900 % або щонайменше на 1000 %.

Переважні мутеїни ІЛ-2 включають, але не обмежуються ними, мутеїни ІЛ-2, що містять заміну V91K або N88D в амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 2. Приклад мутеїну ІЛ-2 наведений у SEQ ID NO: 1. Особливо переважною є амінокислотна послідовність, наведена в SEQ ID NO: 1, що містить заміну C125A. Незважаючи на те, що зменшення числа додаткових мутацій і послідовності ІЛ-2 дикого типу може забезпечувати переваги, в рівень цього винаходу включені мутеїни ІЛ-2, що мають укорочення або додаткові вставки, делеції або заміни, окрім заміни V91K або N88D, за умови, що вказані мутеїни зберігають активність, спрямовану на переважну стимуляцію $T_{\text{рег}}$ -клітин. Таким чином, варіанти реалізації цього винаходу включають мутеїни ІЛ-2, які переважно стимулюють $T_{\text{рег}}$ -клітини і містять амінокислотну послідовність, що містить заміну V91K або N88D, яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 2. В особливо переважних варіантах реалізації такі мутеїни ІЛ-2 містять амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 2.

Стосовно амінокислотних послідовностей ідентичність і/або схожість послідовностей визначають з використанням стандартних методик, відомих у цій галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись ними, алгоритм локальної ідентичності послідовностей, описаний у роботі Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм вирівнювання для визначення ідентичності послідовностей, описаний у роботі Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод визначення схожості послідовностей, описаний у роботі Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, комп'ютеризований варіант реалізації цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA в пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Медісон, Вісконсин, США), програму для визначення ідентичності послідовностей Best Fit, описану в роботі Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, переважно з використанням налаштувань за замовчуванням або візуальної перевірки. Переважно відсоток ідентичності обраховується за допомогою системи баз даних FastDB на основі наступних параметрів: штраф за невідповідність 1; штраф за пропуск 1; штраф за розмір пропуску 0,33 і штраф за приєднання 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, » Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Одним з прикладів придатного алгоритму є PILEUP. PILEUP здійснює множинне вирівнювання послідовностей з групи споріднених послідовностей з використанням

прогресуючого парного вирівнювання. Він також будує дерево, що показує взаємозв'язок між кластерами, що використовується для побудови вирівнювання. У PILEUP використовується спрощення способу прогресуючого вирівнювання Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; використований спосіб аналогічний способу, описаному Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Придатні параметри PILEUP включають штраф за делецію за замовчуванням 3,00, штраф за продовження делеції за замовчуванням 0,10 і аналізовані кінцеві делеції.

Іншим прикладом придатного алгоритму є алгоритм BLAST, описаний в: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; і Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особливо придатною програмою BLAST є програма WU-BLAST-2, яка була отримана з Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. У WU-BLAST-2 використовується декілька параметрів пошуку, більшість з яких установлені як значення за замовчуванням. Для змінних параметрів установлюють наступні значення: область перекривання = 1, частка перекривання = 0,125, поріг для слова (T) = 11. Параметри HSP S і HSP S2 являють собою динамічні значення й встановлюються програмою самостійно, залежно від структури конкретної послідовності і структури конкретної бази даних, в якій проводять пошук цільової послідовності. Проте значення можна коректувати для підвищення чутливості.

Прикладом додаткового придатного алгоритму є GAPPED BLAST, описаний в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. GAPPED BLAST використовує матрицю вагових оцінок заміни BLOSUM-62; значення порогу T установлено рівним 9; двошпиковий спосіб для ініціації нерозривних продовжень оцінює довжину делеції k як $10+k$; X_u установлено рівним 16 і X_g установлено рівним 40 для етапу пошуку за базою даних і 67 для вихідної стадії алгоритмів. Вирівнювання послідовностей, що містять делеції, ініціюється оцінкою, що відповідає близько 22 бітам.

Незважаючи на те, що сайт або область для введення варіацій амінокислотної послідовності можуть бути визначені заздалегідь, мутація сама собою не обов'язково повинна бути визначена заздалегідь. Наприклад, для того, щоб оптимізувати ефективність мутації в якому-небудь сайті, цільовий кодон або область можуть піддаватися випадковому мутагенезу, потім експресований мутеїн ІЛ-2 піддають скринінгу для виявлення оптимальної комбінації бажаних видів активності. Методики введення мутаційних заміни у заздалегідь визначені сайти молекули ДНК, що має відому послідовність, добре відомі, наприклад, мутагенез з використанням праймера M13 і ПЛР-мутагенез. Скринінг мутеїнів може бути виконаний за допомогою кількісних досліджень, описаних у цій заявці, наприклад.

Заміни амінокислот, як правило, являють собою заміни окремих залишків; вставки зазвичай містять від близько одного (1) до двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча допустимі вставки значно більших розмірів. Делеції можуть становити від близько одного (1) до близько двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча в деяких випадках делеції можуть бути значно більших розмірів.

Заміни, делеції і вставки амінокислотних залишків або будь-яку їхню комбінацію можна використовувати для отримання кінцевого похідного або варіанта. Як правило, ці зміни стосуються декількох амінокислот, щоб мінімізувати зміни молекули, зокрема, імуногенність і специфічність антигензв'язувального білка. Проте за визначених умов можуть бути допустимі більш суттєві зміни. Консервативні заміни, як правило, вводять відповідно за наступною схемою, наведеною в Таблиці 1.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Типові заміни
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile

Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Суттєві зміни функції або імуногенної ідентичності здійснюють шляхом вибору заміни, які є менш консервативними, ніж ті, які показані в Таблиці 1. Наприклад, можуть бути введені заміни, які більш суттєво впливають на: структуру головного поліпептидного ланцюга в області зміни, наприклад, альфа-спіральної або бета-складчастої структури; заряд або гідрофобність молекули в сайті-мішені або об'єм бічного ланцюга. Заміни, які, як очікується, в цілому викликають суттєві зміни властивостей поліпептиду, включаючи те, в яких (а) гідрофільний залишок, наприклад, серил або треоніл, заміщений (або змінений) гідрофобним залишком, наприклад, лейцилом, ізoleyцилом, фенілаланіном, валіном або аланіном; (б) цистеїн або пролін заміщений (або змінений) будь-яким іншим залишком; (с) залишок, що має електропозитивний бічний ланцюг, наприклад, лізил, аргініл або гістидил, заміщений (або змінений) електронегативним залишком, наприклад, глутамілом або аспартилом; або (д) залишок, що має об'ємний бічний ланцюг, наприклад, фенілаланін, заміщений (або змінений) залишком, що не має бічного ланцюга, наприклад, гліцином.

Варіанти зазвичай проявляють аналогічну якісну біологічну активність і викликають аналогічну імунну реакцію, що і природний аналог, у той же час за мірою необхідності проводять відбір варіантів для зміни характеристик мутеїну ІЛ-2. Альтернативно, варіант може бути сконструйований так, щоб змінити біологічну активність мутеїну ІЛ-2. Наприклад, сайти глікозилювання можуть бути змінені або видалені, як описано в цій заявці.

Мутеїни ІЛ-2, що мають збільшений період напіввиведення з сироватки крові

Оскільки мутеїни ІЛ-2, що запропоновані в цій заявці, переважно стимулюють експансію $T_{\text{рег}}$ -клітин порівняно, наприклад, з $T_{\text{еф}}$ або НК-клітинами, очікується, що при введенні пацієнту їхній профіль безпеки буде відрізнятися від такого для ІЛ-2 дикого типу або пролейкіну® (алдеслейкін; Novartis, Базель, Швейцарія). Побічні ефекти, пов'язані з введенням ІЛ-2 дикого типу або пролейкіну®, включають грипозні симптоми, мерзлякуватість/озноб, біль у суглобах, лихоманку, висип, свербіж, реакції в місці ін'єкції, артеріальну гіпотензію, діарею, нудоту, занепокоєння, сплутаність свідомості і депресію. Мутеїни ІЛ-2, запропоновані в цій заявці, можуть бути змінені для включення або гібридизації з молекулами, які збільшують період напіввиведення мутеїну із сироватки крові без підвищення ризику того, що таке збільшення періоду напіввиведення збільшить імовірність виникнення або вираженість побічного ефекту, або небажаного явища у пацієнта. Підшкірне введення такого мутеїну, що має збільшений період напіввиведення з сироватки крові, може забезпечити більш тривалий вплив на мішень з більш низьким системним максимальним впливом (C_{max}). Збільшений період напіввиведення із сироватки крові може забезпечити введення мутеїну за нижчого дозування або з меншою частотою дозування.

Період напіввиведення із сироватки крові мутеїнів ІЛ-2, запропонованих у цій заявці, може бути збільшений по суті будь-яким способом, відомим у цій галузі техніки. Такі способи включають зміну послідовності мутеїну ІЛ-2 для включення пептиду, який зв'язується з неонатальним рецептором $Fc\gamma$ або зв'язується з білком, який має збільшений період напіввиведення із сироватки крові, наприклад, IgG або сироватковим альбуміном людини. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 гібридизований з поліпептидом, який забезпечує збільшення періоду напіввиведення гібридної молекули. Такі поліпептиди включають фрагмент Fc IgG або інші поліпептиди, які зв'язуються з неонатальним рецептором $Fc\gamma$, сироватковим альбуміном людини, або поліпептиди, які зв'язуються з білком, що має збільшений період напіввиведення із сироватки крові. У переважних варіантах реалізації мутеїн ІЛ-2 гібридизований з молекулою Fc IgG.

Мутеїн ІЛ-2 може бути гібридизований з N-кінцем або C-кінцем фрагмента Fc IgG. Як показано в прикладах, гібридизація з C-кінцем фрагмента Fc IgG зберігає активність мутеїну ІЛ-2 у більшій мірі, ніж гібридизація з N-кінцем фрагмента Fc IgG.

Один варіант реалізації цього винаходу стосується димеру, що містить два Fc -гібридних поліпептиди, отриманих шляхом гібридизації мутеїну ІЛ-2 і фрагмента Fc антитіла. Димер може бути отриманий, наприклад, шляхом введення гібридного гена, що кодує гібридний білок, у відповідний вектор експресії, який експресує гібридний ген у клітинах-хазяїнах, трансформованих рекомбінантним вектором експресії, тим самим забезпечуючи збирання

експресованого гібридного білка з формуванням структури, яка близька до такої для молекул антитіл, після утворення міжланцюгових зв'язків між фрагментами Fc для отримання димеру.

У цій заявці термін "Fc-поліпептид" або "фрагмент Fc" включає природні і мутовані форми поліпептидів, отриманих з фрагмента Fc антитіла. Укорочені форми таких поліпептидів, що містять шарнірну область, яка сприяє димеризації, також включені в галузь цього винаходу. У деяких варіантах реалізації фрагмент Fc містить ділянки CH2 і CH3 антитіла. Поряд зі збільшеним періодом напіввиведення із сироватки крові однією з переваг гібридних білків, що містять фрагменти Fc (і утворені з них олігомери), є легше очищення способом афінної хроматографії на колонках з такими сорбентами, як білок А або білок G. Переважні фрагменти Fc отримують з людського IgG, який включає IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. При цьому конкретні залишки всередині Fc позначені з використанням номерів положень. Всі позиції Fc пронумеровані відповідно до системи ЄС.

Одна з функцій фрагмента Fc антитіла полягає у взаємодії з імунною системою, коли антитіло зв'язується зі своєю мішенню. Така функція розглядається як "ефекторна функція". Взаємодія антитіло-мішень призводить до антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (ADCC), антитіло-залежного клітинного фагоцитозу (ADCP) і/або комплемент-залежної цитотоксичності (CDC). ADCC і ADCP ініціюються при зв'язуванні фрагмента Fc з рецепторами Fc на поверхні клітин імунної системи. CDC ініціюються при зв'язуванні фрагмента Fc з білками системи комплементу, наприклад, C1q.

Підкласи IgG розрізняються за їхньою здатністю виступати в ролі посередників ефекторних функцій. Наприклад, IgG1 значно перевершує IgG2 і IgG4 відносно здатності ініціювати ADCC і CDC. Таким чином, у тих варіантах реалізації, в яких ефекторна функція є небажаною, фрагмент Fc IgG2 буде переважним. Проте відомо, що молекули, що містять Fc IgG2, складніше отримати, і вони мають менш привабливі біофізичні властивості, такі як коротший період напіввиведення, порівняно з молекулами, що містять Fc IgG1.

Ефекторна функція антитіла може бути збільшена або зменшена шляхом введення однієї або більше мутацій у фрагмент Fc. Варіанти реалізації цього винаходу включають гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, в яких фрагмент Fc модифікований для збільшення ефекторної функції (U.S. 7317091 і Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; які повністю включені в цю заявку шляхом посилання). Приклади молекул Fc IgG1, що мають підвищену ефекторну функцію, включають ті, які містять такі заміни:

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

Інший спосіб підвищення ефекторних функцій білків, що містять Fc IgG, включає зменшення ступеня іфукозилювання фрагмента Fc. Видалення корової фукози з 2-антенарних олігосахаридів, приєднаних до фрагмента Fc, значно підсилювало ADCC-ефекторну функцію без зміни антигензв'язувальних функцій або CDC-ефекторної функції. Відомо декілька способів зменшення або усунення іфукозилювання Fc-вмісних молекул, наприклад, антитіл. Ці способи включають рекомбінантну експресію в певних лініях клітин ссавців, включаючи лінію клітин з блокованим геном FUT8, варіант лінії клітин CHO Lec13, лінію клітин гібридами щура YB2/0, клітинну лінію, яка містить малі інтерферуючі РНК, специфічні відносно гена FUT8, і клітинну лінію, що спільно експресує β -1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферазу III і фермент апарату Гольджі α -манозидазу II. В іншому варіанті Fc-вмісні молекули можна експресувати в клітині з

виду, що не стосується ссавців, таких як рослинна, дріжджова або прокаріотична клітина, наприклад, клітина *E. coli*.

У переважних варіантах реалізації цього винаходу гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, містять фрагмент Fc, який модифікований для зменшення ефекторних функцій. Приклади молекул Fc, що мають зменшену ефекторну функцію, включають ті, які містять такі заміни:

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

Відомо, що IgG1 людини має сайт глікозилування в позиції N297 (система нумерації ЕС), і глікозилування сприяє реалізації ефекторної функції антитіл IgG1. Приклад послідовності IgG1 наведений в SEQ ID NO: 3. У ряді дослідницьких груп були зроблені спроби ввести мутацію в позицію N297, щоб отримати неглікозиловані антитіла. Мутагенез був направлений переважно на заміщення N297 амінокислотами, які схожі з аспарагіном за фізико-хімічною природою, такими як глутамін (N297Q) або аланін (N297A), який імітує аспарагін без полярних груп.

У цій заявці термін "неглікозиловане антитіло" або "неглікозилований фрагмент Fc" стосується статусу глікозилування залишку в позиції 297 фрагмента Fc. Антитіло або інша молекула може бути глікозилована в одному або більше інших сайтів, але все ще може розглядатися як неглікозиловане антитіло або неглікозилований Fc-гібридний білок.

У ході дослідницьких робіт з метою отримання фрагмента Fc IgG1, позбавленого ефекторних функцій, було виявлено, що мутаційна заміна амінокислоти в позиції N297 людського IgG1 залишком гліцину, тобто N297G, забезпечує набагато вищу ефективність очищення і поліпшені біофізичні властивості порівняно з іншими амінокислотними замінами в цьому залишку. Див. Приклад 8. Таким чином, у переважних варіантах реалізації гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, містить фрагмент Fc людського IgG1, що містить заміну N297G. Фрагмент Fc із заміною N297G можна застосовувати відповідно з будь-яким варіантом реалізації, в якому молекула містить фрагмент Fc людського IgG1, при цьому її застосування не обмежується включенням до складу гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. У деяких варіантах реалізації антитіло містить фрагмент Fc, який містить заміну N297G.

Фрагмент Fc, що являє собою фрагмент Fc IgG1 людини з мутацією в позиції N297G, також може містити додаткові вставки, делеції і заміни. У деяких варіантах реалізації цього винаходу фрагмент Fc IgG1 людини містить заміну N297G і щонайменше на 90 % ідентичний, щонайменше на 91 % ідентичний, щонайменше на 92 % ідентичний, щонайменше на 93 % ідентичний, щонайменше на 94 % ідентичний, щонайменше на 95 % ідентичний, щонайменше на 96 % ідентичний, щонайменше на 97 % ідентичний, щонайменше на 98 % ідентичний або щонайменше на 99 % ідентичний амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 3. В особливо переважному варіанті реалізації С-кінцевий залишок лізину заміщений або видалений. Амінокислотна послідовність людського IgG1, що містить заміну N297G і делецію С-кінцевого лізину, наведена в SEQ ID NO: 4.

Було показано, що молекули, що містять неглікозилований фрагмент Fc IgG1, менш стабільні, ніж молекули, що містять глікозилований фрагмент Fc IgG1. Фрагмент Fc може бути додатково модифікований, щоб підвищити стабільність неглікозилованої молекули. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу одна або більше амінокислот заміщені цистеїном так, щоб сформувати дисульфідні зв'язки в димерному стані. Залишки V259, A287, R292, V302, L306, V323 або I332 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3, можуть бути заміщені цистеїном. У переважних варіантах реалізації цього винаходу конкретні пари залишків заміщені так, що вони переважно формують дисульфідний зв'язок один з одним, тим самим обмежуючи або запобігаючи випадковому формуванню дисульфідних зв'язків. Переважні пари включають, але не обмежуються ними, A287C і L306C, V259C і L306C, R292C і V302C і V323C і I332C.

У цьому винаході запропоновані Fc-вмісні молекули, в яких один або більше залишків V259, A287, R292, V302, L306, V323 або I332 заміщені цистеїном. Переважні Fc-вмісні молекули включають ті, які містять заміни A287C і L306C, V259C і L306C, R292C і V302C або V323C і

I332C.

Додаткові мутації, які можуть бути введені у фрагмент Fc IgG1, включають ті, які полегшують формування гетеродимеру з Fc-вмісних поліпептидів. У деяких варіантах реалізації фрагмент Fc модифікований для створення "виступів" і "западин", які полегшують формування гетеродимеру з двох різних Fc-вмісних поліпептидних ланцюгів при спільній експресії в клітині. Патент США 7695963. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу фрагмент Fc змінений для використання ефекту електростатичної взаємодії, щоб стимулювати формування гетеродимеру, перешкоджаючи утворенню гомодимеру з двох різних Fc-вмісних поліпептидних ланцюгів при спільній експресії в клітині. Заявка WO 09/089004, яка повністю включена в цю заявку шляхом посилання. Переважні гетеродимерні фрагменти Fc включають ті, в яких один ланцюг Fc містить заміни D399K і E356K, й інший Fc ланцюг містить заміни K409D і K392D. В інших варіантах реалізації один ланцюг Fc містить заміни D399K, E356K і E357K, й інший ланцюг Fc містить заміни K409D, K392D і K370D.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу мономерна форма гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, тобто, що містить тільки одну молекулу мутеїну ІЛ-2, може забезпечувати певні переваги. У таких варіантах реалізації фрагмент Fc гібридного білка може містити одну або більше мутацій, які полегшують формування гетеродимеру. Гібридний білок експресується спільно з фрагментом Fc, що містить мутації, зворотні відносно тих, які присутні в гібридному поліпептиді, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc, але без мутеїну ІЛ-2. При утворенні гетеродимеру з двох Fc-вмісних поліпептидів кінцевий білок містить тільки один мутеїн ІЛ-2.

Інший спосіб створення мономерного гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, включає гібридизацію мутеїну ІЛ-2 з мономерним фрагментом Fc, тобто фрагментом Fc, який не піддається димеризації. Стабільні мономерні фрагменти Fc містять мутації, які перешкоджають димеризації і стабілізують молекулу в мономерній формі. Переважні мономерні фрагменти Fc розкриті в WO 2011/063348, яка повністю включена в цю заявку шляхом посилання. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, містять фрагмент Fc з негативно зарядженими амінокислотами в позиціях 392 і 409 спільно із заміною амінокислот у позиціях Y349, L351, L368, V397, L398, F405 або Y407 залишком треоніну.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, містить лінкер між Fc і мутеїном ІЛ-2. У цій галузі техніки відомо багато різних поліпептидних лінкерів, які можна використовувати для конструювання гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc. У переважних варіантах реалізації гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc, містить одну або більше копій пептиду, що складається з GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7), між Fc і мутеїном ІЛ-2. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу область поліпептиду між фрагментом Fc і областю мутеїну ІЛ-2 містить одну копію GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7). У цій заявці розкрито, що лінкери GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7) піддаються глікозилюванню при експресії у відповідних клітинах і що таке глікозилювання може полегшити стабілізацію білка в розчині і/або при введенні в умовах *in vivo*. Таким чином, згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2, містить глікозилований лінкер між фрагментом Fc і областю мутеїну ІЛ-2.

У цьому винаході передбачено, що глікозилований лінкер можна використовувати для конструювання поліпептиду. У цьому винаході запропоновані поліпептиди, що містять GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7), що введені в амінокислотну послідовність поліпептиду або заміщають одну або більше амінокислот у амінокислотній послідовності поліпептиду. У переважних варіантах реалізації цього винаходу GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7) введені в петлю третинної структури поліпептидів. В інших варіантах реалізації одна або більше амінокислот в петлі заміщені GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7).

C-кінцева ділянка фрагмента Fc і/або N-кінцева ділянка мутеїну ІЛ-2 може містити одну або більше мутацій, які змінюють профіль глікозилювання гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, при експресії в клітинах ссавців. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 додатково містить заміну T3, наприклад, T3N або T3A. Мутеїн ІЛ-2 може додатково містити заміну S5, наприклад, S5T.

Ковалентні модифікації мутеїну ІЛ-2 і гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, включені в обсяг цього винаходу, і, як правило, але не завжди, здійснюються після трансляції. Наприклад, кілька типів ковалентних модифікацій мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, вводять в молекулу за допомогою взаємодії конкретних амінокислотних залишків мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент

Fc, з органічним агентом, що використовується для отримання похідних, який здатний реагувати з вибраними бічними ланцюгами або залишками N- або C-кінцевих аміногруп.

Залишки цистеїнілу найчастіше вступають у реакцію з α -галоацетатами (і відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, з формуванням карбоксиметильних або карбоксіамідометильних похідних. Залишки цистеїнілу також утворюють похідні при взаємодії з бромтрифторацетоном, α -бром- β - (5-імідозоїл) пропіонової кислоти, хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїмідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил-2-піридилдисульфідом, п-хлормеркурібензоатом, 2- хлормеркурі-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом.

Залишки гістидилу утворюють похідні при взаємодії з діетилпірокарбонатом при pH = 5,5-7,0, оскільки цей агент є відносно специфічним стосовно бічного ланцюга гістидилу. Також можна застосовувати пара-бромфенацилбромід; реакцію проводять переважно в 0,1 М какодилаті натрію при pH 6,0.

Залишки лізінилу і кінцевих амінокислот піддають взаємодії з бурштиновим ангідридом або ангідридами інших карбонових кислот. Отримання похідних при використанні цих агентів змінює заряд залишків лізінилу. Інші придатні реагенти для отримання похідних являють собою α -аміновмісні залишки, включаючи імідоефіри, такі як метилпіколінімідат; піридоксаль фосфат; піридоксаль; хлорборгідрид; тринітробензолсульфонову кислоту; O-метилізоасечовину; 2,4-пентандіон; і реакцію з гліоксилатом, що каталізується трансаміназою.

Залишки аргінілу модифікують шляхом взаємодії з одним або декількома стандартними реагентами, включаючи фенолглюксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон і нінгідрин. Для отримання похідних залишків аргініну необхідно, щоб реакція проходила в лужних умовах у зв'язку з високим значенням рKa функціональної групи гуанідину. Окрім того, ці реагенти можуть взаємодіяти з групами лізину, а також епсилон- аміногрупою аргініну.

Може бути проведена специфічна модифікація залишків тирозину, при цьому особливий інтерес викликає введення спектральних міток у залишки тирозину за допомогою реакції з ароматичними сполуками діазонію або тетранітрометаном. Найчастіше для утворення O-ацетилпохідних тирозилу і 3-нітропохідних використовують N-ацетилімідазол і тетранітрометан, відповідно. Залишки тирозилу піддають йодуванню з використанням I^{125} або I^{131} , щоб отримати мічені білки для застосування в радіоімунологічних способах досліджень, також можна використовувати спосіб на основі хлораміну T, описаний вище.

Карбоксильні бічні групи (аспартилу або глутамілу) селективно модифікують шляхом взаємодії з карбодіімідами ($R'-N=C=N-R'$), де R і R' являють собою необов'язково різні алкільні групи, такі як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил) карбодіімід або 1-етил-3- (4-азон-4,4-диметилпентил) карбодіімідів. Окрім того, залишки аспартилу і глутамілу перетворюють на залишки аспарагіну і глутаміну шляхом взаємодії з іонами амонію.

Отримання похідних із застосуванням біфункціональних агентів можна використовувати для зшивання антигензв'язувальних білків з нерозчинним у воді носієм або поверхнею для використання в різних способах досліджень. Зазвичай, зшиваючі агенти, що використовуються, включають, наприклад, 1,1-біс(діізоацетил)-2-фенілетан, глутаровий альдегід, складні ефіри N-гідроксисукциніміду, наприклад, складні ефіри 4-азидосаліцилової кислоти, гомобіфункціональні імідоефіри, включаючи складні ефіри дисукцинімідилу, такі як 3, 3'-дитіобіс (сукцинімідилпропіонат), і біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан. Агенти для одержання похідних, такі як метил-3-[(п-азидофеніл)дитіо] пропіонімідат, дають змогу отримувати фотоактивуючі проміжні сполуки, які здатні утворювати поперечні зшивання за присутності світла. В іншому варіанті для іммобілізації білків використовують реакційноздатні нерозчинні у воді носії, такі як вуглеводи, активовані ціаноген-бромідом, і реакційноздатні субстрати, описані в патентах США №№3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 і 4330440.

Залишки глутамінілу і аспарагінілу зазвичай деамідують з отриманням відповідних залишків глутамілу і аспартилу, відповідно. В іншому варіанті ці залишки деамідують в слабкокислом середовищі. Будь-яка форма цих залишків включена в обсяг цього винаходу.

Інші модифікації включають гідроксильовання проліну і лізину, фосфорилування гідроксильних груп залишків серилу або треонілу, метилювання α -аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну і гістидину (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилювання N-кінцевого аміну й амідування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Інший тип ковалентної модифікації мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, який включений в обсяг цього винаходу, являє собою зміну характеру глікозилування зазначеного білка. Як відомо в цій галузі техніки, характер глікозилування може

залежати як від послідовності білка (наприклад, наявності або відсутності конкретних амінокислотних залишків, що піддаються глікозилюванню, як обговорюється нижче), так і від типу клітини-хазяїна або організму, в якому виробляється білок. Конкретні системи експресії обговорюються нижче.

5 Глікозилювання поліпептидів, як правило, є N-зв'язаним або O-зв'язаним. N-зв'язане глікозилювання стосується приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X позначає
10 будь-яку амінокислоту, крім проліну, є послідовностями впізнавання для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, присутність
15 будь-якої з цих трипептидних послідовностей в поліпептиді створює можливий сайт глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання стосується приєднання одного фрагмента таких
20 цукрів як N-ацетилгалактозамін, галактоза або ксиліоза до гідроксіамінокислоти, найчастіше до серину або треоніну, хоча 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін також можуть бути використані.

Додавання сайтів глікозилювання до мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, який містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, може бути легко здійснено шляхом зміни амінокислотної послідовності так, щоб вона включала одну або більше з описаних вище трипептидних послідовностей (для N-зв'язаного глікозилювання). Зміна також може бути здійснена шляхом додавання або заміни
25 одного чи більше залишків серину або треоніну в початковій послідовності (для O-зв'язаного глікозилювання). Для зручності амінокислотну послідовність мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, переважно модифікують шляхом змін на рівні ДНК, зокрема, шляхом мутування ДНК, що кодує поліпептид-мішень, у попередньо вибраних оновах з отриманням кодонів, які при трансляції забезпечують бажані амінокислоти.

Іншим способом збільшення числа вуглеводних фрагментів на мутеїні ІЛ-2 або гібридному білку, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, є хімічне або ферментативне зв'язування глікозидів
25 з білком. Перевага цих способів полягає в тому, що вони не вимагають вироблення білка в клітині-хазяїні, яка має молекулярний апарат, придатний для N- і O-зв'язаного глікозилювання. Залежно від використовуваного способу зв'язування цукор(у) може бути прикріплений до (a) аргініну і гістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, наприклад, цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, наприклад, серину, треоніну або гідроксипроліну, (e)
30 ароматичних залишків, наприклад, фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (f) амідної групи глутаміну. Такі способи описані в міжнародній патентній заявці 87/05330, опублікованій 11 вересня 1987 р., і в роботі Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Видалення вуглеводних фрагментів, присутніх на вихідному мутеїні ІЛ-2 або гібридному білку, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, може бути здійснено хімічними або
35 ферментативними способами. Для хімічного деглікозилювання необхідним є вплив на білок такої сполуки, як трифторметансульфонова кислота, або еквівалентної сполуки. Така обробка призводить до відщеплення більшості або всіх цукрів, за винятком зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозамін або N-ацетилгалактозамін), при цьому поліпептид залишається інтактним. Хімічне деглікозилювання описано в роботах Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys.
40 259:52 і Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативне відщеплення вуглеводних фрагментів на поліпептидах може бути здійснено за допомогою різних ендо- і екзоглікозидаз, описаних у роботі Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Глікозилювання в потенційних сайтах глікозилювання може бути попереднє шляхом використання такої сполуки, як тунікаміцин, описаної в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Тунікаміцин блокує
45 формування зв'язків білок-N-глікозид.

Інший тип ковалентної модифікації мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, включає зв'язування мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і
50 фрагмент Fc, з різними небілковими полімерами, включаючи, але не обмежуючись ними, різні поліюлі, такі як поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь або поліоксіалкілени, за допомогою способу, описаного в патентах США №№4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337. Окрім цього, заміни амінокислот можуть бути введені в різних позиціях в межах мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, щоб полегшити додавання полімерів, таких як ПЕГ. Відповідно, варіанти реалізації цього винаходу включають пегильовані мутеїни ІЛ-2 і пегильовані гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Такі пегильовані білки можуть мати збільшений період напіввиведення і/або знижену імуногенність порівняно з неpegильованими білками.

Полінуклеотиди, кодуєчі мутеїни ІЛ-2 і гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc

У галузь цього винаходу включені нуклеїнові кислоти, що кодуєчі мутеїни ІЛ-2 і гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Аспекти цього винаходу включають полінуклеотидні
60 варіанти (наприклад, внаслідок виродженості), які кодуєчі амінокислотні послідовності, описані

в цій заявці. У переважних варіантах реалізації цього винаходу поліпептид, який кодується виділеною нуклеїновою кислотою, є компонентом гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc.

Нуклеотидні послідовності, що відповідають амінокислотним послідовностям, описаним в цій заявці, які призначені для використання як зондів або праймерів для виділення нуклеїнових кислот або як послідовностей для запиту під час пошуку в базах даних, можуть бути отримані за допомогою "зворотної трансляції" з амінокислотних послідовностей. Добре відома методика полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) може бути використана для виділення і ампліфікації послідовності ДНК, що кодує мутеїни ІЛ-2 і гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Олігонуклеотиди, які визначають бажані кінці комбінації фрагментів ДНК, використовують як 5'- і 3'-праймери. Олігонуклеотиди можуть додатково містити сайти розпізнавання рестрикційними ендонуклеазами, щоб полегшити введення ампліфікованої комбінації фрагментів ДНК у вектор експресії. Методики ПЛР описані в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; і *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекули нуклеїнових кислот згідно з цим винаходом включають ДНК і РНК в одноланцюговій і дволанцюговій формі, а також відповідні комплементарні послідовності. "Виділена нуклеїнова кислота" являє собою нуклеїнову кислоту, яка була відокремлена від суміжних генетичних послідовностей, присутніх у геномі організму, з якого була виділена нуклеїнова кислота, у випадку нуклеїнових кислот, виділених з природних джерел. У випадку нуклеїнових кислот, синтезованих ферментативними способами на основі матриці або хімічними способами, наприклад, ПЛР-продукти, молекули кДНК або олігонуклеотиди, наприклад, варто розуміти, що нуклеїнові кислоти, отримані за допомогою таких способів, являють собою виділені нуклеїнові кислоти. Виділена молекула нуклеїнової кислоти стосується молекули нуклеїнової кислоти у вигляді окремого фрагмента або у вигляді компонента більшої конструкції нуклеїнової кислоти. В одному переважному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти по суті не містять забруднюючого ендогенного матеріалу. Молекула нуклеїнової кислоти переважно отримана з ДНК або РНК, виділеної щонайменше один раз, по суті, в чистій формі і в кількості або концентрації, що забезпечує ідентифікацію, перетворення і відновлення її складових нуклеотидних послідовностей за допомогою стандартних біохімічних методів (наприклад, методів, які описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такі послідовності переважно забезпечені і/або сконструйовані у формі відкритої рамки зчитування, яка перервана внутрішніми нетранслюючими послідовностями, або інтронами, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетранслюючої ДНК можуть знаходитися в напрямку 5'- або 3'-кінця відносно відкритої рамки зчитування, в ділянках, в яких нетранслюючі області ДНК не будуть перешкоджати перетворенню або експресії кодуючої області.

Варіанти згідно з цим винаходом зазвичай отримують за допомогою сайт-направленого мутагенезу нуклеотидів в ДНК, що кодує мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc, використовуючи метод касетного мутагенезу або ПЛР-мутагенезу й інші методики, добре відомі в цій галузі техніки, щоб отримати ДНК, що кодує такий варіант, з подальшою експресією рекомбінантної ДНК у клітинній культурі, як описано в цій заявці. Проте мутеїни ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc, можуть бути отримані за допомогою синтезу в умовах *in vitro*, використовуючи загальноприйняті методики. Варіанти зазвичай проявляють якісну біологічну активність, яка аналогічна такій для природного аналога, наприклад, експансія T_{reg} -клітин, проте можуть бути відібрані варіанти, які мають модифіковані характеристики, які будуть більш детально описані нижче.

Фахівці в цій галузі техніки зрозуміють, що у зв'язку з вираженістю генетичного коду може бути отримана надзвичайно велика кількість нуклеїнових кислот, всі з яких кодують мутеїни ІЛ-2 і гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і Fc, відповідно до цього винаходу. Таким чином, після визначення конкретної амінокислотної послідовності, фахівці в цій галузі техніки зможуть виготовити будь-яку кількість різних нуклеїнових кислот шляхом простої зміни послідовності одного або більше кодонів так, що амінокислотна послідовність кодованого білка залишиться незмінною.

У цьому винаході також запропоновані системи експресії та конструкції у формі плазмід, векторів експресії, касет транскрипції або експресії, які містять щонайменше один полінуклеотид, описаний вище. Також у цьому винаході запропоновані клітини-хазяїни, що містять такі системи експресії або конструкції.

Як правило, вектори експресії, що використовуються в будь-якій з клітин-хазяїнів, будуть містити послідовності для підтримки плазміди і для клонування та експресії екзогенних

нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, що сукупно називаються "фланкуючими послідовностями", у деяких варіантах реалізації, як правило, будуть містити одну або більше з наступних нуклеотидних послідовностей: промотор, один або більше енхансерів, сайт ініціації реплікації, послідовність термінації транскрипції, повну інтронну послідовність, що містить донорний і акцепторний сайт сплайсингу, послідовність, що кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, сайт зв'язування рибосом, послідовність поліаденілювання, полілінкерну область для вставки нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який експресують, і селективний маркерний елемент. Кожна з цих послідовностей обговорюється нижче.

Вектор необов'язково може містити послідовність, що кодує "мітку", тобто молекулу олігонуклеотиду, розташовану на 5'- або 3'-кінці кодує послідовності мутеїнів ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc; олігонуклеотидна послідовність кодує поліглістидинову мітку (наприклад, hexaHis (SEQ ID NO: 21)) або іншу "мітку", таку як FLAG, HA (гемаглютинин вірусу грипу) або тус, для яких існують комерційно доступні антитіла. Така мітка, як правило, гібридизована з поліпептидом при експресії цього поліпептиду і може слугувати як засіб для афінного очищення або детектування мутеїну ІЛ-2 в клітині-хазяїні. Афінне очищення можна здійснювати, наприклад, за допомогою колонкової хроматографії з використанням антитіл проти мітки як афінного носія. Мітка необов'язково може бути згодом видалена з очищених мутеїнів ІЛ-2 і гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і Fc, за допомогою різних способів, таких як використання певних пептидаз для розщеплення.

Фланкуючі послідовності можуть бути гомологічними (тобто отриманими з одного і того ж виду і/або штаму, що і клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто отриманими з виду, відмінного від виду клітини-хазяїна або штаму), гібридними (тобто являють собою комбінацію фланкуючих послідовностей, отриманих більш ніж з одного джерела), синтетичними або нативними. Таким чином, джерелом фланкуючої послідовності може бути будь-який прокаріотичний або еукаріотичний організм, будь-який хребетний і безхребетних організм або будь-яка рослина, за умови, що фланкуюча послідовність є функціональною і може бути активована молекулярними системами клітини-хазяїна.

Фланкуючі послідовності, які можна використовувати у векторах згідно з цим винаходом, можуть бути отримані за будь-яким з декількох способів, добре відомих в цій галузі техніки. Як правило, фланкуючі послідовності, які можна використовувати в цій заявці, будуть заздалегідь виявлені за допомогою картування та/або шляхом розщеплення рестрикційною ендонуклеазою і, таким чином, можуть бути виділені з належного тканинного джерела з використанням відповідних рестрикційних ендонуклеаз. У деяких випадках може бути відома повна нуклеотидна послідовність фланкуючої послідовності. У цій заявці фланкуючі послідовності можуть бути синтезовані за допомогою способів синтезу нуклеїнових кислот або клонування, описаних у цій заявці.

Незалежно від того, відома вся або тільки частина фланкуючої послідовності, така послідовність може бути отримана за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та/або шляхом скринінгу геномної бібліотеки з використанням відповідного зонда, такого як олігонуклеотид та/або фрагмент фланкуючої послідовності з цього ж або іншого виду. Якщо фланкуюча послідовність не відома, то фрагмент ДНК, що містить фланкуючу послідовність, може бути виділений з більшого фрагмента ДНК, який може містити, наприклад, послідовність, що кодує або навіть інший ген або гени. Виділення може бути здійснено шляхом розщеплення рестрикційною ендонуклеазою з отриманням правильного фрагмента ДНК з подальшим виділенням за допомогою очищення в агарозному гелі, колонкової хроматографії на основі систем Qiagen® (Чатсворт, Каліфорнія, США) або іншими способами, щ відомі фахівцям у цій галузі техніки. Параметри вибору відповідних ферментів для здійснення цієї мети будуть очевидні для будь-якого фахівця зі стандартною кваліфікацією в цій галузі техніки.

Сайт ініціації реплікації, як правило, є частиною комерційно доступних прокаріотичних векторів експресії і полегшує ампліфікацію вектора в клітині-хазяїні. Якщо вибраний вектор не містить сайту ініціації реплікації, то такий сайт може бути хімічно синтезований на основі відомої послідовності і лігований у вектор. Наприклад, сайт ініціації реплікації з плазмиди pBR322 (New England Biolabs, Беверлі, Массачусетс, США) придатний для більшості грамнегативних бактерій, і різні сайти ініціації реплікації вірусного походження (наприклад, SV40, поліоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV) або папіломи, такі як HPV або BPV) придатні для клонування векторів у клітинах ссавців. Як правило, сайт ініціації реплікації не є необхідним компонентом для векторів експресії в клітинах ссавців (наприклад, сайт ініціації реплікації SV40 зазвичай використовується тільки тому, що він додатково містить промотор ранніх генів вірусу).

Послідовність термінації транскрипції, як правило, розташована на 3'-кінці області, що кодує поліпептид, і слугує для термінації транскрипції. Зазвичай послідовність термінації транскрипції

в прокариотичних клітинах являє собою фрагмент, збагачений парами GC, за яким розташована політимінова послідовність. У той час як послідовність може бути легко клонована з бібліотеки або навіть отримана комерційно як частина вектора, вона також може бути легко синтезована за допомогою способів синтезу нуклеїнових кислот, таких як ті, які описані в цій заявці.

5 Селективний маркерний ген кодує білок, необхідний для виживання і розмноження клітини-хазяїна, що вирощують у селективному культуральному середовищі. Звичайні селективні маркерні гени кодують білки, які (а) надають прокариотичним клітин-хазяїнам стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину; (b) доповнюють різні види ауксотрофної недостатності клітини; або (c) постачають необхідними поживними речовинами, недоступними зі складних середовищ або середовищ з певним складом. Конкретні селективні маркерні гени включають ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну і ген стійкості до тетрацикліну. Переважно ген стійкості до неоміцину також може бути використаний для відбору в прокариотичних і еукаріотичних клітинах-хазяїнах.

10 Інші селективні гени можуть бути використані для ампліфікації гена, який буде експресованим. Ампліфікація являє собою процес, при якому гени, необхідні для вироблення білка, важливого для розмноження або виживання клітин, повторюються в тандемі в хромосомах наступних поколінь рекомбінантних клітин. Приклади відповідних селективних маркерів для клітин ссавців включають ген дигідрофолатредуктази (DHFR) і ген тимідинкінази, що не містить промотору. Трансформовані клітини ссавців піддають тиску відбору, в результаті цього розмножуються тільки трансформовані клітини, унікальним чином пристосовані до виживання завдяки наявності селективного гена, присутнього у векторі. Тиск відбору створюють шляхом культивування трансформованих клітин в умовах, в яких концентрація селективного агента в середовищі послідовно збільшується, що призводить до ампліфікації як селективного гена, так і ДНК, що кодує інший ген, такий як мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Як наслідок цього на основі ампліфікованої ДНК синтезується підвищена кількість поліпептиду, такого як мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc.

Сайт зв'язування рибосом зазвичай необхідний для ініціації трансляції мРНК і містить послідовність Шайна-Дальгарно (прокариоти) або послідовність Козака (еукаріоти). Цей елемент зазвичай розташований в напрямку 3'-кінця відносно промотору і 5'-кінця відносно кодуєчої послідовності поліпептиду, який експресують. У деяких варіантах реалізації одна або більше кодуєчих областей можуть бути функціонально зв'язані з внутрішнім сайтом посадки рибосоми (IRES), що забезпечує трансляцію двох відкритих рамок зчитування з одного РНК-транскрипту.

У деяких випадках, наприклад, коли глікозилювання є бажаним у системі експресії на основі еукаріотів-хазяїнів, різні перед- або пропослідовності можуть бути модифіковані з метою поліпшення характеру глікозилювання або виходу продукту. Наприклад, сайт розщеплення пептидаз конкретного сигнального пептиду може бути змінений або можуть бути додані пропослідовності, які також можуть впливати на глікозилювання. Кінцевий білковий продукт може мати в позиції -1 (відносно першої амінокислоти зрілого білка) одну або більше додаткових амінокислот, що є придатними для експресії, які могли бути повністю видалені. Наприклад, кінцевий білковий продукт може містити один або два амінокислотних залишки в сайті розщеплення пептидазою, прикріпленому до аміно-кінця. У іншому варіанті використання деяких сайтів ферментативного розщеплення може призвести до утворення незначно укороченої форми бажаного поліпептиду, якщо фермент здійснює розщеплення в такій області в межах послідовності зрілого поліпептиду.

45 Вектори експресії і клонування відповідно до цього винаходу, як правило, будуть містити промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і функціонально зв'язаний з молекулою, що кодує мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Промотори являють собою нетранскрибуючі послідовності, розташовані перед (тобто в напрямку 5'-кінця) стартовим кодоном структурного гена (зазвичай в межах близько від 100 до 1000 п.о.), які контролюють транскрипцію структурного гена. Промотори зазвичай стосуються одного з двох класів: індукуючі промотори і конститутивні промотори. Індукуючі промотори ініціюють підвищення рівня транскрипції з послідовності ДНК, що знаходиться під їхнім контролем, у відповідь на деяку зміну умов культивування, таку як наявність або відсутність поживної речовини або зміну температури. Конститутивні промотори, з іншого боку, забезпечують постійну транскрипцію гена, з яким вони функціонально зв'язані, тобто, практично не керують експресією гена. Велика кількість промоторів, які розпізнаються різними потенційними клітинами-хазяїнами, добре відомі в цій галузі техніки.

Промотори, які придатні для використання в дріжджових хазяїнах, також добре відомі в цій галузі техніки. Енхансери дріжджових генів переважно використовують з промоторами

дріжджових генів. Промотори, які придатні для використання в клітинах-хазяїнах ссавців, добре відомі і включають, але не обмежуються ними, промотори, отримані з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус пташиної віспи, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровіруси, вірус гепатиту В і найбільш переважно вірус мавп 40 (SV40). Інші придатні промотори ссавців включають гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори білків теплового шоку і промотор актину.

Додаткові промотори, які можуть представляти інтерес, включають, але не обмежуються ними: ранній промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, що міститься в довгому 3'-кінцевому повторі вірусу саркоми Рауса (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимідинкінази вірусу герпесу (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор і регуляторні послідовності з гена металотіонеїну (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); і прокариотичні промотори, такі як промотор бета-лактамази (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); або промотор tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Також певний інтерес представляють наступні області, контролюючі транскрипцію у тварин, які проявляють тканинну специфічність і були використані у трансгенних тварин: контрольна ділянка гена еластази I, яка активна в ацинарних клітинах підшлункової залози (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); контрольну ділянку гена інсуліну, який активний в бета-клітинах підшлункової залози (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-122); контрольний ділянку гена імуноглобуліну, який активний в лімфоїдних клітинах (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); контрольну ділянку гена вірусу раку молочної залози миші, який активний у клітинах яєчок, молочної залози, лімфоїдних і тучних клітинах (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); контрольну ділянку гена альбуміну, яка активна в печінці (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); контрольну ділянку гена альфа-фетопротейну, який активний у печінці (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); контрольну ділянку гена альфа-1-антитрипсину, який активний у печінці (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); контрольну ділянку гена бета-глобіну, який активний у мієлоїдних клітинах (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); контрольну ділянку гена основного білка мієліну, який активний в олігодендроцитах мозку (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); контрольну ділянку гена легкого ланцюга міозину-2, який активний у скелетних м'язах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); і контрольну ділянку гена гонадотропін-визивляючого гормону, який активний у гіпоталамусі (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Послідовність енхансера може бути вставлена у вектор для підвищення ефективності транскрипції у вищих еукаріотів. Енхансери являють собою цис-діючі елементи ДНК, зазвичай містять приблизно 10-300 п.о., які діють на промотор, щоб підвищити ефективність транскрипції. Енхансери відносно незалежні від орієнтації і позиції, оскільки їх виявляли в позиціях, які розташовані в напрямку як 5'-кінця, так і 3'-кінця відносно транскрипційної одиниці. Відомо декілька послідовностей енхансерів, доступних з генів ссавців (наприклад, глобіну, еластази, альбуміну, альфа-фетопротейну та інсуліну). Тим не менше, зазвичай застосовують який-небудь вірусний енхансер. Приклади енхансерних елементів для активації промоторів в еукаріот включають енхансер SV40, енхансер промотору ранніх генів цитомегаловірусу, енхансер поліоми і енхансери аденовірусів, відомі в цій галузі техніки. Незважаючи на те, що енхансер може бути розташований у векторі в напрямку або 5'-кінця, або 3'-кінця відносно відносно кодуючої послідовності, як правило, він розташований в ділянці послідовності в напрямку 5'-кінця відносно промотору. Послідовність, що кодує відповідну нативну або гетерологічну сигнальну послідовність (лідерну послідовність або сигнальний пептид), може бути включена у вектор експресії для посилення позаклітинної секреції мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Вибір сигнального пептиду або лідерної послідовності залежить від типу клітин-хазяїнів, в яких повинен вироблятися білок, причому гетерологічна сигнальна послідовність може заміщати нативну сигнальну послідовність. Приклади сигнальних пептидів, які є функціональними в клітинах-хазяїнах ссавців, включають: сигнальну послідовність для інтерлейкіну-7 (ІЛ-7), описану в патенті США №4965195; сигнальну послідовність для рецептора інтерлейкіну-2, описану в роботі Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальний пептид для рецептора інтерлейкіну-4, описаний в патенті EP №0367566; сигнальний пептид для рецептора інтерлейкіну-1 типу I, описаний в патенті США №4968607; сигнальний пептид для рецептора інтерлейкіну-1 типу II, описаний в патенті EP №0460846.

Вектор може містити один або більше елементів, які полегшують експресію, коли вектор

інтегрований в геном клітини-хазяїна. Приклади включають елемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) і ділянку прикріплення до ядерного матриксу (MAR). Ділянки MAR виступають посередниками при структурній організації хроматину і можуть захистити інтегрований вектор від ефекту "позиція". Отже, ділянки MAR є особливо придатними в тих випадках, коли вектор використовується для створення стабільних трансфектантів. Ряд природних і синтетичних MAR-вмісних нуклеїнових кислот відомі в цій галузі техніки, наприклад, патенти США №№6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Вектори експресії згідно з цим винаходом можуть бути сконструйовані з вихідного вектора, такого як комерційно доступний вектор. Такі вектори можуть містити всі бажані фланкуючі послідовності або можуть не містити їх. У тих випадках, коли одна або більше з фланкуючих послідовностей, описаних у цій заявці, не присутні спочатку у векторі, вони можуть бути отримані окремо і лігвані вектор. Способи, що використовуються для отримання кожної з фланкуючих послідовностей, добре відомі фахівцям в цій галузі техніки.

Після отримання вектора і введення молекули нуклеїнової кислоти, що кодує мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, у належний сайт вектора, готовий вектор може бути введений в придатну клітину-хазяїна для ампліфікації та/або експресії поліпептиду. Трансформацію вектора експресії в вибрану клітину-хазяїна можна здійснювати за допомогою добре відомих способів, включаючи трансфекцію, інфекцію, спільне осадження фосфатом кальцію, електропорацію, мікроін'єкцію, ліпофекцію, трансфекцію з використанням DEAE-декстрану або іншими відомими способами. Вибраний спосіб буде частково залежати від типу клітини-хазяїна, яка буде використана. Перераховані способи та інші відповідні способи добре відомі фахівцям в цій галузі техніки і викладені, наприклад, в керівництві Sambrook et al., 2001, вище.

Клітина-хазяїн при культивуванні у відповідних умовах синтезує мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, які згодом можуть бути відірані з культурального середовища (якщо клітина-хазяїн секретує білок у середовище) або безпосередньо з клітини-хазяїна, яка продукує білок (якщо білок не секретується). Вибір придатної клітини-хазяїна буде залежати від різних факторів, таких як бажаний рівень експресії, поліпептидні модифікації, які є бажаними чи необхідними для забезпечення активності (наприклад, глікозилювання або фосфорилування) і легкості згортання в біологічно активну молекулу. Клітка-хазяїн може являти собою прокаріотичну або еукаріотичну клітину.

Лінії клітин ссавців, доступні як хазяїни для експресії, добре відомі в цій галузі техніки і включають, але не обмежуються ними, іморталізовані клітинні лінії, доступні з Американської колекції типових культур (ATCC), і будь-які клітинні лінії, що використовуються в системі експресії, відомої в цій галузі техніки, можуть бути використані для отримання рекомбінантних поліпептидів згідно з цим винаходом. У цілому, клітини-хазяїни трансформують рекомбінантним вектором експресії, який містить ДНК, що кодує бажаний мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Клітини-хазяїни, які можна використовувати, включають прокаріотичні, дріжджові або клітини вищих еукаріотів. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli* або бацили. Клітини вищих еукаріотів включають клітини комах і встановлені клітинні лінії ссавців. Приклади придатних ліній клітин-хазяїнів ссавців включають лінію клітин нирки мавп COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клітини, клітини 293, клітини C127, клітини 3T3 (ATCC CCL 163), клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або їхні похідні, такі як VEGGIE CHO і споріднені клітинні лінії, які вирощують у безсироватковому середовищі (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клітини HeLa, клітинні лінії BHK (ATCC CRL 10) і клітини лінії CV1/EBNA, отримані з лінії клітин нирки африканської зеленої мавпи CV1 (ATCC CCL 70), описаної в роботі McMahon et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, лінії клітин мезонефроса людини, такі як 293, 293 EBNA або MSR 293, клітини епідермісу людини A431, клітини людини Colo205, інші трансформовані клітинні лінії приматів, нормальні диплоїдні клітини, клітинні штами, отримані з культивованої в умовах *in vitro* первинної тканини, первинні експланти, HL-60, U937, клітини ліній HaK або Jurkat. За необхідності, клітинні лінії ссавців, такі як HepG2/3B, KB, NIH-3T3 або S49, наприклад, можуть бути використані для експресії поліпептиду, коли бажаним є використання поліпептиду в різних шляхах передачі сигналів або кількісних дослідженнях з використанням репортерного гена.

В іншому варіанті поліпептид може бути отриманий в клітинах нижчих еукаріотів, таких як дріжджі, або в клітинах прокаріотів, таких як бактерії. Відповідні штами дріжджів включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida* або будь-який інший штам дріжджів, який здатний експресувати гетерологічні поліпептиди. Придатні штами бактерій включають *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* або будь-

який інший штам бактерій, який здатний експресувати гетерологічні поліпептиди. У випадку якщо поліпептид виробляється клітинами дріжджів або бактерій, то бажаною може бути модифікація поліпептиду, отриманого в таких системах, наприклад, шляхом фосфорилування або глікозилування відповідних сайтів, щоб отримати функціональний поліпептид. Ковалентне приєднання таких фрагментів можна здійснювати з використанням відомих хімічних або ферментативних способів.

Поліпептид також може бути отриманий за допомогою функціонального зв'язування виділеної нуклеїнової кислоти згідно з цим винаходом з придатною керуючою послідовністю в одному або більше векторів експресії в клітинах комах, а також використовуючи систему експресії в клітинах комах. Матеріали і способи, що стосуються систем експресії на основі бакуловірусів/клітин комах, доступні комерційно у вигляді набору, наприклад, від Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США (набір MaxVac[®]), такі способи також добре відомі в цій галузі техніки і описані в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), і Luskow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Безклітинні системи трансляції також можна використовувати для отримання поліпептидів за допомогою РНК, отриманих з конструкцій нуклеїнових кислот, розкритих у цій заявці. Відповідні вектори клонування та експресії для використання в бактеріальних, грибових, дріжджових клітинах-хазяїнах і клітинах-хазяїнах ссавців описані в Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клітина-хазяїн, яка містить виділену нуклеїнову кислоту згідно з цим винаходом, переважно, функціонально зв'язана щонайменше з однією послідовністю, яка керує експресією, являє собою "рекомбінантну клітину-хазяїна".

У деяких аспектах цей винахід включає виділену нуклеїнову кислоту, що кодує мутеїн ІЛ-2 людини, яка переважно стимулює регуляторні Т-клітини і амінокислотна послідовність якого містить заміну V91K і щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % або 100 % ідентична амінокислотної послідовності, наведеної у SEQ ID NO: 1. Виділена нуклеїнова кислота може кодувати будь-який з типових мутеїнів ІЛ-2, запропонованих у цій заявці.

У галузь цього винаходу також включені виділені нуклеїнові кислоти, що кодують будь-який з типових гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і Fc, описаних у цій заявці. У переважних варіантах реалізації частина Fc антитіла і мутеїн ІЛ-2 людини кодуються в межах однієї відкритої рамки зчитування, можливо, містить лінкер, кодує послідовність якого знаходиться між фрагментом Fc і мутеїном ІЛ-2.

Згідно з іншим аспектом в цьому винаході запропоновані вектори експресії, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують описані вище мутеїни ІЛ-2 або гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, які функціонально зв'язані з промотором.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропоновані клітини-хазяїни, що містять виділені нуклеїнові кислоти, що кодують описані вище мутеїни ІЛ-2 або гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Клітина-хазяїн може являти собою прокариотичну клітину, таку як E.coli, або еукаріотичну клітину, таку як клітину ссавця. У деяких варіантах реалізації цього винаходу клітина-хазяїн являє собою лінію клітин ячечника китайського хом'ячка (СНО).

Згідно з іншим аспектом в цьому винаході запропоновані способи отримання мутеїну ІЛ-2 людини. Зазначені способи включають культивування клітини-хазяїна в умовах, що забезпечують експресію промотору, функціонально зв'язаного з мутеїном ІЛ-2 людини. Далі із зазначеної культури отримують мутеїн ІЛ-2 людини. Мутеїн ІЛ-2 може бути отриманий з культурального середовища та/або лізатів клітин-хазяїнів.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропоновані способи отримання гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 людини і фрагмент Fc. Зазначені способи включають культивування клітини-хазяїна в умовах, що забезпечують експресію промотору, функціонально зв'язаного з гібридним білком, що містить мутеїн ІЛ-2 людини і фрагмент Fc. Далі із зазначеної культури отримують гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 людини і фрагмент Fc. Гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 людини і фрагмент Fc, може бути отриманий з культурального середовища та/або лізатів клітин-хазяїнів.

Фармацевтичні композиції

У деяких варіантах реалізації цього винаходу запропонована фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість мутеїну ІЛ-2 разом з фармацевтично ефективними розчинниками, носієм, солубілізатором, емульгатором, консервантом та/або ад'ювантом. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 стосується гібридного білку, який містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Фармацевтичні композиції згідно з цим винаходом включають, але не обмежуючись ними, рідкі, заморожені і ліофілізовані композиції.

Переважно матеріали для виготовлення композицій є нетоксичними для реципієнтів у використуваних дозах і концентраціях. У конкретних варіантах реалізації запропоновані фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість терапевтичної молекули, що містить мутеїн ІЛ-2, наприклад, гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу фармацевтична композиція може містити матеріали для виготовлення композицій, призначені для модифікації, підтримки чи збереження, наприклад, значення рН, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або вивільнення, всмоктування або проникнення композиції. У таких варіантах реалізації придатні матеріали для виготовлення композицій включають, але не обмежуються ними, амінокислоти (наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін, пролін або лізин); антимікробні препарати; антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію або гідросульфат натрію); буфери (такі як борат, бікарбонат, Трис-НСІ, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти); наповнювачі (такі як маніт або гліцин); хелатуючі агенти (такі як етилендіамінтетраоцтова кислоти (ЕДТА)); комплексоутворюючі агенти (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин); наповнювачі; моносахариди; дисахариди; та інші вуглеводи (такі як глюкоза, маноза або декстрини); білки (наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); барвники, ароматизатори та розчинники; емульгатори; гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон); низькомолекулярні поліпептиди; солеутворюючі протіони (такі як натрій); консерванти (такі як хлорид бензалконію, бензойна кислота, саліцилова кислота, тимеросал, фенетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або перекис водню); розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь); цукрові спирти (такі як маніт або сорбіт); суспендуючі агенти; поверхнево-активні речовини або змочувальні агенти (наприклад, плюронові кислоти, ПЕГ, складні ефіри сорбітану, полісорбати, такі як полісорбат 20, полісорбат, тритон, трометамін, лецитин, холестерин, тилоксапол); агенти, що підвищують стабільність (такі як сахароза або сорбіт); агенти, що підвищують тонічність (такі як галогеніди лужних металів, переважно хлорид натрію або калію, маніт, сорбіт); носії для доставки; розчинники; допоміжні речовини та/або фармацевтичні ад'юванти. Див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу оптимальна фармацевтична композиція буде визначена фахівцем у цій галузі техніки залежно від, наприклад, передбачуваного шляху введення, способу доставки та бажаної дози. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, вище. У деяких варіантах реалізації цього винаходу такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення в умовах *in vivo* та швидкість кліренсу антигензв'язувальних білків відповідно до цього винаходу в умовах *in vivo*. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу основний наповнювач або носій у фармацевтичній композиції може бути водним або неводним. Наприклад, придатний наповнювач або носій може являти собою воду для ін'єкцій, фізіологічний сольовий розчин або штучну спинномозкову рідину, можливо, з додаванням інших матеріалів, які є стандартними для композицій для парентерального введення. Інші приклади наповнювачів включають нейтральний фізіологічний розчин або фізіологічний розчин, змішаний з сироватковим альбуміном. У конкретних варіантах реалізації цього винаходу фармацевтичні композиції містять Трис-буфер з показником рН близько 7,0-8,5 або ацетатний буфер з показником рН близько 4,0-5,5, і можуть додатково містити сорбіт або його відповідний аналог. У деяких варіантах реалізації цього винаходу композиції, що містять мутеїн ІЛ-2, можуть бути отримані для зберігання у формі ліофілізованої таблетки або водного розчину шляхом змішування вибраної композиції, що має бажаний ступінь чистоти, з необов'язковими агентами для виготовлення композицій (Remington's Pharmaceutical Sciences, вище). Також у деяких варіантах реалізації цього винаходу продукт, що містить мутеїн ІЛ-2, може бути приготовленим у вигляді ліофілізату з використанням відповідних допоміжних речовин, таких як сахароза.

Фармацевтичні композиції згідно з цим винаходом можуть бути вибрані для парентеральної доставки. В іншому варіанті композиції можуть бути вибрані для введення шляхом інгаляції або для доставки через травний тракт, наприклад, перорально. Виготовлення таких фармацевтично прийнятних композицій знаходиться в межах кваліфікації фахівця в цій галузі техніки. Компоненти композицій присутні переважно в концентраціях, які прийнятні для місця введення. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу буфери використовуються для підтримки показника рН композиції в межах фізіологічних значень рН або трохи нижчих значень рН, як правило, в діапазоні значень рН від близько 5 до близько 8.

У тому випадку, якщо передбачається використання парентерального шляху введення,

терапевтичні композиції для застосування відповідно до цього винаходом можуть бути забезпечені у вигляді апірогенного водного розчину, придатного для парентерального введення, який містить бажану композицію мутеїну ІЛ-2 у фармацевтично прийнятному носії. Особливо придатним носієм для парентеральної ін'єкції є стерильна дистильована вода, на основі якої композиція, що містить мутеїн ІЛ-2, виготовляється у вигляді стерильного ізотонічного розчину з належною концентрацією консервантів. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу продукт може містити композицію, що містить бажану молекулу спільно з агентом, таким як ін'єковані мікросфери, біодеградабельні частинки, полімерні сполуки (такі як полімолочна кислота або полігліколева кислота), гранули або ліпосоми, які можуть забезпечити контрольоване або пролонговане вивільнення зазначеного продукту, який може бути доставлений за допомогою ін'єкції з уповільненим всмоктуванням компонентів. У деяких варіантах реалізації цього винаходу може бути використана гіалуронова кислота, яка сприяє збільшенню періоду циркуляції. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу імплантовані пристрої для доставки лікарського засобу можуть бути використані для введення композиції, що містить мутеїн ІЛ-2.

Додаткові фармацевтичні композиції будуть очевидні для фахівців у цій галузі техніки, включаючи композиції з пролонгованим або контрольованим вивільненням композиції, що містить мутеїн ІЛ-2. Методики виготовлення багатьох інших систем, що забезпечують пролонговану або контрольовану доставку, таких як ліпосомні носії, біодеградабельні мікрочастинки або пористі гранули та ін'єкції з уповільненим вивільненням компонентів, також відомі фахівцям у цій галузі техніки. Див., наприклад, міжнародну патентну заявку РСТ/US93/00829, яка включена в цю заявку шляхом посилання і в якій описано контрольоване вивільнення пористих полімерних мікрочастинок для доставки фармацевтичних композицій. Препарати з пролонгованим вивільненням можуть включати напівпроникні полімерні носії у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Носії, що забезпечують пролонговане вивільнення, можуть включати складні поліефіри, гідрогелі, полілактиди (розкриті в патенті США №3773919 і в Європейській патентній заявці EP 058481, які включені в цю заявку шляхом посилання), співполімери L-глутамінової кислоти і гамма-етил-L-глутамату (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), полі-2-гідроксіетилметакрилату (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 і Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), співполімер етилену і вінілацетату (Langer et al., 1981, вище) або полі-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту (публікація Європейської патентної заявки EP 133988). Композиції з пролонгованим вивільненням можуть також включати ліпосоми, які можуть бути отримані будь-яким з декількох способів, відомих у цій галузі техніки. Див., наприклад, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публікації Європейських патентних заявок EP036676; EP088046 і EP143949, які включені в цю заявку шляхом посилання.

Фармацевтичні композиції, що використовуються для введення в умовах *in vivo*, як правило, забезпечуються у вигляді стерильних препаратів. Стерилізація може бути досягнута шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани. Якщо композиція є ліофілізованою, то стерилізація з використанням цього способу може бути проведена або перед, або після ліофілізації і відновлення. Композиції для парентерального введення можуть зберігатися в ліофілізованій формі або у вигляді розчину. Композиції для парентерального введення, як правило, поміщають у контейнер, що має стерильний вхідний отвір, наприклад, пакет для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірних ін'єкцій.

У деяких аспектах цей винахід включає композиції, що містять мутеїн ІЛ-2, які мають буферну здатність, придатні для використання у вигляді фармацевтичних композицій, як описано в міжнародній патентній заявці 06138181A2 (PCT/US2006/022599), яка повністю включена в цю заявку шляхом посилання.

Як обговорювалося вище, у деяких варіантах реалізації запропоновані композиції, що містять мутеїн ІЛ-2, зокрема, фармацевтичні гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, які містять, крім композиції, що містить мутеїн ІЛ-2, одну або більше допоміжних речовин, таких як ті, які наведені як приклад в цьому розділі і в інших місцях цієї заявки. Стосовно зазначених композицій допоміжні речовини можуть бути використані в цьому винаході для найрізноманітніших цілей, таких як регулювання фізичних, хімічних чи біологічних властивостей композицій, наприклад, регулювання в'язкості, та/або відповідно зі способами згідно з цим винаходом для поліпшення ефективності та/або стабілізації таких композицій, і відповідно зі способами захисту від розкладання і псування, внаслідок, наприклад, впливів, що виникають у процесі виробництва, перевезення, зберігання, передпродажної підготовки, введення і протягом наступних етапів.

Існують різні методичні вказівки, що описують способи стабілізації білка і матеріали для виготовлення композицій, а також способи, які є придатними для цих цілей, наприклад, див. роботи Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations" Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution, » в: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), і Randolph et al., "Surfactant-protein interactions, » Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), кожна з яких повністю включена в цю заявку шляхом посилання, зокрема, в розділи, що стосуються допоміжних речовин і вищевказаних способів для білкових композицій, що мають буферну здатність, згідно з цим винаходом, особливо відносно білкових фармацевтичних продуктів і способів, що є придатними для використання у медичних цілях у тварин і/або людини.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу солі можуть бути використані, наприклад, для регулювання іонної сили та/або ізотонічності композиції, та/або для поліпшення розчинності та/або фізичної стабільності білка або іншого інгредієнта композиції згідно з цим винаходом.

Добре відомо, що іони можуть стабілізувати нативний стан білків за рахунок зв'язування з зарядженими залишками на поверхні білка, екранування заряджених і полярних груп в білку і зменшення міцності їх електростатичних взаємодій, тобто притягування і відштовхування. Іони також можуть стабілізувати денатурований стан білка, зокрема, за рахунок зв'язування з денатурованими пептидними зв'язками (-CONH) білка. Також іонна взаємодія із зарядженими і полярними групами в білку може зменшити міжмолекулярні електростатичні взаємодії і тим самим запобігати або зменшувати агрегації білка і його нерозчинності.

Різні види іонів значно відрізняються за своїм впливом на білки. Було розроблено кілька якісних класифікацій іонів та їхній вплив на білки, які можуть бути використані при виготовленні фармацевтичних композицій згідно з цим винаходом. Одним із прикладів є серія Гофмейстера, в якій іонні і полярні неіонні розчинені речовини класифікуються згідно з їхнім впливом на конформаційну стабільність білків у розчині. Стабілізуючі розчинені речовини називаються "космотропними". Дестабілізуючі розчинені речовини називаються "хаотропними". Космотропні речовини зазвичай використовуються у високих концентраціях (наприклад, >1 М сульфат амонію) для осадження білків з розчину ("висолювання"). Хаотропні речовини зазвичай використовуються для денатурування та/або солюбілізації білків ("всолювання"). Відносна ефективність іонів відносно процесів "висолювання" і "всолювання" визначає їхню позицію у серії Гофмейстера.

Згідно з різними варіантами реалізації цього винаходу вільні амінокислоти можуть бути використані в композиціях, що містять мутеїн ІЛ-2, як наповнювачі, стабілізатори і антиоксиданти, а також згідно з іншими стандартними способами застосування. Лізин, пролін, серин і аланін можна використовувати для стабілізації білків у складі. Гліцин можна використовувати при ліофілізації, щоб забезпечити правильну структуру і властивості ліофілізованої таблетки. Аргінін можна використовувати для інгібування агрегації білка в рідких і ліофілізованих композиціях. Метіонін можна використовувати як антиоксидант.

Поліоли включають цукри, такі як маніт і сахароза, сорбіт і багатоатомні спирти, такі як, наприклад, гліцерин і пропіленгліколь, і, згідно з цим описом, поліетиленгліколь (ПЕГ) і споріднені речовини. Поліоли є космотропними сполуками. Їх можна використовувати як стабілізуючі агенти в рідких і ліофілізованих композиціях для захисту білків від процесів фізичного та хімічного руйнування. Поліоли також можна використовувати для регулювання тонічності композицій.

Поліоли, які можна використовувати в деяких варіантах реалізації цього винаходу, включають маніт, який зазвичай застосовують, щоб забезпечити структурну стабільність таблетки в ліофілізованих композиціях. Маніт забезпечує структурну стабільність ліофілізованої таблетки. Як правило, він використовується спільно з ліопротектором, наприклад, сахарозою. Сорбіт і сахароза є одними з бажаних агентів для регулювання тонічності, а також стабілізаторами, що захищають від впливів під час циклів заморожування-розтавання при транспортуванні або отриманні нерозфасованого продукту в процесі виробництва. Відновні цукри (які містять вільні альдегідні або кетоніві групи), такі як глюкоза і лактоза, можуть глікувати поверхневі залишки лізину і аргініну. Відповідно, вони, як правило, не входять до числа переважних поліолів для застосування згідно з цим винаходом. Крім цього, цукри, які утворюють такі активні форми, наприклад, сахароза, яка при гідролізі в кислих умовах розпадається на фруктозу і глюкозу і, отже, призводить до глікування, з цієї причини також не входять до переважних поліолів згідно з цим винаходом. ПЕГ можна використовувати для стабілізації білків і як кріопротектори, і завдяки цим якостям він може бути використаний у цьому

винаході.

Варіанти композицій, що містять мутеїн ІЛ-2, додатково містять поверхнево-активні речовини. Білкові молекули можуть всмоктуватися на поверхнях і денатурувати з подальшою агрегацією на поверхні розділу фаз повітря-рідина, тверде тіло-рідина і рідина-рідина. Як правило, ймовірність виникнення таких явищ зворотно пропорційна концентрації білка. Інтенсивність таких шкідливих взаємодій зазвичай обернено пропорційна концентрації білка і, як правило, посилюється при фізичному струшуванні, наприклад, такому, яке створюється під час доставки і завантаження продукту.

Поверхнево-активні речовини зазвичай використовують для запобігання, зведення до мінімуму або зниження поверхневого всмоктання. Поверхнево-активні речовини, які придатні для використання в цьому винаході для цих цілей, включають полісорбат 20, полісорбат 80, інші жирнокислотні складні ефіри поліетоксилатів сорбіту і полуксамер 188.

Поверхнево-активні речовини також зазвичай використовують для контролю конформативної стабільності білка. Використання поверхнево-активних речовин для цієї мети залежить від конкретного білка, оскільки будь-яка конкретна поверхнево-активна речовина, як правило, буде стабілізувати одні білки й дестабілізувати інші.

Полісорбати піддаються окиснювальному розкладу і часто надходять з вмістом достатньої кількості пероксидів, щоб викликати окиснення бічних ланцюгів амінокислотних залишків білка, особливо метіоніну. Отже, слід з обережністю використовувати полісорбати і, у випадку їхнього використання, вони повинні бути присутніми в найнижчій ефективній концентрації. У зв'язку з цим полісорбати ілюструють загальне правило, що допоміжні речовини повинні бути використані в мінімальних ефективних концентраціях.

Варіанти композицій, що містять мутеїн ІЛ-2, додатково містять один або більше антиоксидантів. Шкідливому окисненню білків у фармацевтичних композиціях у деякій мірі можна запобігти шляхом підтримання належного зовнішнього рівня кисню і температури, а також уникаючи впливу світла. Антиоксидантні допоміжні речовини також можуть бути використані, щоб запобігти окиснювальному руйнуванню білків. Антиоксиданти, які є належними для цієї мети, включають відновні агенти, пастки активних форм кисню/вільних радикалів і хелатуючі агенти. Антиоксиданти для терапевтичного використання у білкових композиціях згідно з цим винаходом переважно є водорозчинними і зберігають свою активність протягом усього терміну придатності продукту. ЕДТА є переважним антиоксидантом для цієї мети згідно з цим винаходом.

Антиоксиданти можуть пошкодити білки. Наприклад, відновні агенти, такі як глутатіон, зокрема, можуть порушувати внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Таким чином, антиоксиданти, які є придатними для використання в цьому винаході, вибирають так, щоб, окрім іншого, усунути або значно зменшити можливість пошкодження білків у композиції.

Композиції згідно з цим винаходом можуть включати іони металів, які є кофакторами білків і необхідні для утворення координаційних комплексів білків, такі як цинк, який необхідний для утворення деяких суспензій інсуліну. Іони металів також можуть інгібувати деякі процеси, які викликають руйнування білків. Проте іони металів також каталізують фізичні та хімічні процеси, які руйнують білки.

Іони магнію (10-120 мМ) можуть бути використані для інгібування ізомеризації аспарагінової кислоти в ізо-аспарагінову кислоту. Іони Ca^{+2} (аж до 100 мМ) можуть підвищувати стійкість дезоксирибонуклеази людини. Проте іони Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} можуть викликати дестабілізацію рлДНази. Аналогічним чином Ca^{+2} і Sr^{+2} можуть стабілізувати фактор VIII, у той час як іони Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} , Cu^{+2} та Fe^{+2} можуть призвести до його дестабілізації, а іони Al^{+3} можуть підсилити агрегацію цього чинника.

Варіанти композицій, що містять мутеїн ІЛ-2, додатково містять один або більше консервантів. Консерванти необхідні при розробці багатодозових композицій для парентерального введення, в яких передбачено більше одного відбору препарату з одного і того ж контейнера. Їхня основна функція полягає в інгібуванні росту мікроорганізмів і в забезпеченні стерильності продукту протягом усього терміну придатності або терміну використання лікарського препарату. Зазвичай, використовувані консерванти включають бензиловий спирт, фенол і м-крезол. Незважаючи на те, що консерванти довгий час використовуються разом з низькомолекулярними сполуками для парентерального введення, розробка білкових композицій, які містять консерванти, може бути складним завданням. Консерванти майже завжди чинять дестабілізуючу дію на білки (викликають агрегацію), і це стало основним чинником, що обмежує їхнє використання в багатодозових білкових композиціях. Сьогодні більшість білкових лікарських препаратів виготовлено тільки для одноразового використання. Проте у тих випадках, коли можливе використання багатодозових

композицій, вони забезпечують додаткову перевагу відносно зручності для пацієнта і підвищену конкурентоспроможність. Хорошим прикладом є гормон росту людини (hGH), стосовно якого розробка, що містить консерванти композицій, призвела до промислового випуску зручніших шприців-ручок для багаторазового використання. Нині у продажу доступні щонайменше чотири різновиди пристроїв шприців-ручок, що містять композиції на основі гормону росту людини з додаванням консервантів. Нордитропін (рідина, Novo Nordisk), нутропін AQ (рідина, Genentech) і генотропін (ліофілізована форма, картридж з двома відділеннями, Pharmacia&Upjohn) містять фенол, тоді як соматроп (Eli Lilly) виготовлений з додаванням м-крезолу.

Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, такий як, наприклад, Fc.IL-2(V91K) або Fc.IL-2(N88D), виготовлені в концентрації 10 мг/мл у розчині 10 мМ L-глутамінової кислоти, 3,0 % (мас./об.) L-проліну, при рН=5,2. Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, такий як, наприклад, Fc.IL-2(V91K) або Fc.IL-2(N88D), виготовлений у розчині 10 мМ KPi, 161 мМ L-аргініну, при рН = 7,6.

У ході виготовлення і розробки дозованих форм з додаванням консервантів слід враховувати ряд аспектів. Ефективна концентрація консерванта в лікарському продукті повинна бути оптимізована. Це потребує проведення випробувань цього консерванта у складі лікарської форми в діапазоні концентрацій, які забезпечують антимікробну ефективність без шкоди для стабільності білка.

Згідно з іншим аспектом у цьому винаході запропоновані мутеїни ІЛ-2 або гібридні білки, що містять мутеїни ІЛ-2 і фрагмент Fc, що знаходяться у формі ліофілізованих композицій. Сублімовані продукти можуть бути ліофілізовані без консерванта і відновлені розчинником, що містить консервант, під час використання. Це скорочує час, протягом якого консервант перебуває в контакт з білком, значно зменшуючи ризики, пов'язані зі стабільністю. При використанні рідких складів ефективність і стабільність консерванта повинні підтримуватися протягом усього терміну придатності продукту (приблизно від 18 до 24 місяців). Важливо відзначити, що ефективність консерванта має бути продемонстрована в кінцевій композиції, що містить активну лікарську речовину і всі допоміжні компоненти.

Композиції, що містять мутеїн ІЛ-2, як правило, призначені для конкретних шляхів і способів введення, конкретних дозувань і частоти введення, конкретних видів лікування конкретних захворювань, і мають певний діапазон біодоступності і стійкості, окрім іншого. Композиції, таким чином, можуть бути розроблені згідно з цим винаходом для доставки будь-яким відповідним шляхом, включаючи, але не обмежуючись ними, пероральний, внутрішньовушний, офтальмологічний, ректальний, вагінальний і парентеральний шляхи введення, включаючи внутрішньовенну і внутрішньоартеріальну ін'єкцію, внутрішньом'язову ін'єкцію і підшкірну ін'єкцію.

Після виготовлення фармацевтичної композиції її можна зберігати в стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердої речовини, кристалу або у вигляді зневодненого або ліофілізованого порошку. Такі композиції можна зберігати в готовій до використання формі або у формі (наприклад, ліофілізованій), яку відновлюють перед введенням. У цьому винаході також запропоновані набори для отримання стандартної лікарської форми для одноразового введення. Кожен набір за винаходом може включати перший контейнер, що містить висушений білок, і другий контейнер, що містить водну композицію. У деяких варіантах реалізації цього винаходу запропоновані набори, що містять одно- і багатокамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци, містять рідкі композиції, і шприци з ліофілізованою композицією).

Терапевтично ефективна кількість фармацевтичної композиції, що містить мутеїн ІЛ-2, призначеної для застосування, буде залежати, наприклад, від терапевтичних показань і цілей. Фахівець у цій галузі техніки зрозуміє, що відповідні рівні доз для лікування будуть варіювати, зокрема, залежно від доставленої молекули, показання, згідно з яким використовують мутеїн ІЛ-2, шляхи введення, розміру (маса тіла, площа поверхні тіла або розмір органу) та/або стану (вік і загальний стан здоров'я) пацієнта. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу лікар може титрувати дозу і змінювати шлях введення для отримання оптимального терапевтичного ефекту. Звичайна доза може варіюватися від близько 0,1 мкг/кг до близько до 1 мг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. У конкретних варіантах реалізації доза може варіюватися від 0,5 мкг/кг до близько 100 мкг/кг, можливо, від 2,5 мкг/кг до близько 50 мкг/кг.

Терапевтично ефективна кількість мутеїну ІЛ-2 переважно викликає зменшення ступеня тяжкості симптомів захворювання, збільшення частоти і тривалості безсимптомних періодів захворювання або запобігає виникненню порушень або інвалідності завдяки пригніченню захворювання.

Фармацевтичні композиції можуть бути введені за допомогою медичного пристрою. Приклади медичних пристроїв для введення фармацевтичних композицій описані в патентах США №№4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 і 5399163, які всі включені в цю заявку шляхом посилання.

5 Способи лікування аутоімунних або запальних захворювань

У деяких варіантах реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 згідно з цим винаходом використовують для лікування аутоімунного або запального захворювання. У переважних варіантах реалізації цього винаходу використовують гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc.

10 Захворювання, які особливо піддаються лікуванню з використанням мутеїну ІЛ-2, розкритого в цій заявці, включають, але не обмежуються ними, запалення, аутоімунне захворювання, atopічні захворювання, паранеопластичні аутоімунні захворювання, запалення хряща, артрит, ревматоїдний артрит, ювенільний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, олігоартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, поліартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит з системним початком, ювенільний анкілозивний спондиліт, ювенільний ентеропатичний артрит, ювенільний реактивний артрит, ювенільний синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативної ентезопатії і артропатії), ювенільний дерматоміозит, ювенільний псоріатичний артрит, ювенільну склеродермію, ювенільний системний червоний вовчак, ювенільний васкуліт, олігоартикулярний ревматоїдний артрит, поліартикулярний ревматоїдний артрит, ревматоїдний артрит з системним початком, анкілозивний спондиліт, ентеропатичний артрит, реактивний артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативної ентезопатії і артропатії), дерматоміозит, псоріатичний артрит, склеродермію, васкуліт, міозит, поліміозит, дерматоміозит, вузликосий поліартеріїт, гранулематоз Вегенера, артеріїт, ревматичну поліміалгію, саркоїдоз, склероз, первинний біліарний склероз, склерозивний холангіт, синдром Шегрена, псоріаз, бляшковий псоріаз, краплевидний псоріаз, псоріаз складок, пустульозний псоріаз, еритродермічний псоріаз, дерматит, atopічний дерматит, атеросклероз, вовчак, хвороба Стілла, системний червоний вовчак (СЧВ), міастенію, запальне захворювання кишечника (ЗЗК), хвороба Крона, виразковий коліт, целіацію, розсіяний склероз (РС), астму, ХОЗЛ, риносинусит, риносинусит з поліпами, еозинофільний езофагіт, еозинофільний бронхіт, хвороба Гієна-Барре, цукровий діабет I типу, тиреоїдит (наприклад, базедову хвороба), хворобу Аддісона, синдром Рейно, аутоімунний гепатит, ТПХ, відторгнення трансплантата, пошкодження нирок, гепатит С-індукований васкуліт, спонтанну втрату вагітності тощо.

35 У переважних варіантах реалізації аутоімунне або запальне захворювання являє собою вовчак, реакцію "трансплантат проти хазяїна", гепатит С-індукований васкуліт, цукровий діабет I типу, розсіяний склероз, спонтанну втрату вагітності, atopічні захворювання та запальні захворювання кишечника.

40 Згідно з іншим варіантом реалізації цього винаходу пацієнт, що страждає на аутоімунне або запальне захворювання або схильний до ризику розвитку такого захворювання, отримує мутеїн ІЛ-2 (наприклад, мутеїн ІЛ-2, описаний у цій заявці, такий як гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, описаний у цій заявці, або інший мутеїн ІЛ-2, відомий у цій галузі техніки, або ІЛ-2 дикого типу, можливо, як частини Fc-гібридної молекули, що належить до типу, описаного в цій заявці), з подальшим контролем відповіді пацієнта на лікування. Контрольована відповідь пацієнта може являти собою будь-яку комбінацію таких видів відповідей. Наприклад, відповідь пацієнта може являти собою змінювану або відповідь пацієнта на лікування, що піддається оцінці, або будь-яку комбінацію таких видів відповідей. Наприклад, відповідь може являти собою зміну фізіологічного стану пацієнта, такого як температура тіла або лихоманка, апетит, пітливість, головний біль, нудота, втома, голод, спрага, розумова активність або т.п. В іншому варіанті відповідь може являти собою зміну кількості клітин певного типу або продукту гена (наприклад, білка, пептиду або нуклеїнової кислоти), наприклад, у зразку периферичної крові, взятої у пацієнта. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу схема лікування пацієнта змінюється, якщо пацієнт має детектовану або відповідь на лікування, що піддається оцінюванню, або якщо така відповідь перевищує конкретний поріг. Зміна схеми лікування може являти собою зменшення або збільшення частоти дозування, або зменшення або збільшення кількості мутеїну ІЛ-2, що вводиться у вигляді одноразової дози, або припинення прийому препарату (тобто тимчасове припинення лікування або припинення на вказаний період часу, або доти, поки лікуючий лікар не визначить, що лікування повинно бути продовженим, або доти, поки контрольована відповідь пацієнта не буде свідчити про те, що лікування повинно або може бути відновленим) або припинення лікування. Згідно з одним варіантом реалізації цього винаходу відповідь являє собою зміну температури тіла або концентрації С-реактивного білка у пацієнта. Наприклад, відповідь може являти собою

підвищення температури тіла пацієнта або збільшення концентрації СРБ у зразку периферичної крові, або обидві зміни одночасно. В одному конкретному варіанті реалізації винаходу лікування пацієнта обмежують, припиняють або припиняють, якщо температура тіла пацієнта під час лікування збільшується щонайменше на 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2° або 2,5 °С. В іншому конкретному варіанті реалізації винаходу лікування пацієнта обмежують, припиняють або припиняють, якщо під час лікування концентрація СРБ у зразку периферичної крові пацієнта збільшується щонайменше на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5 або 2 мг/мл. Інші види відповідей пацієнта, які можуть контролюватися і використовуватися при прийнятті рішення про зміну, обмеження, призупинення або припинення лікування, включають виникнення або погіршення синдрому капілярного витоку (гіпотензія і серцево-судинна нестійкість), порушення функції нейтрофілів (наприклад, у результаті інфекції або при виникненні або загостренні інфекції), тромбоцитопенію, тромботичну ангіопатію, реакції в місці ін'єкції, васкуліт (наприклад, гепатит С-індукований васкуліт) або запальні симптоми, або захворювання. Інші види відповідей пацієнта, які можна контролювати і використовувати при прийнятті рішення про зміну, обмеження, посилення, призупинення або припинення лікування, включають збільшення кількості NK-клітин, T_{per} -клітин, FoxP3-CD4 T-клітин, FoxP3+CD4 T-клітин, FoxP3-CD8 T-клітин або еозинофілів. Збільшення кількості клітин цих типів можна детектувати, наприклад, як збільшення кількості таких клітин на одиницю об'єму периферичної крові (наприклад, виражене як збільшення кількості клітин на мілілітр крові) або як збільшення частки такого типу клітин, наприклад, порівняно з іншим типом клітин або кількістю клітин у зразку крові. Інший тип відповіді пацієнта, який можна контролювати, являє собою збільшення кількості мутеїну ІЛ-2, зв'язаного на поверхні CD25+ клітин у зразку периферичної крові пацієнта.

Способи експансії T_{per} -клітин

Мутеїн ІЛ-2 або гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, можна використовувати для експансії T_{per} -клітин у суб'єкта або у зразку. У цьому винаході запропоновані способи збільшення відношення кількості T_{per} -клітин до кількості нерегуляторних Т-клітин. Спосіб включає приведення популяції Т-клітин у контакт з ефективною кількістю людського ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc. Величина співвідношення може бути виміряна шляхом визначення співвідношення кількості CD3+FoxP3+ клітин до кількості CD3+FoxP3- клітин у популяції Т-клітин. Як правило, T_{per} -клітини в крові людини складають 5-10 % від загальної кількості CD4+CD3+ Т-клітин, проте при захворюваннях, перерахованих вище, ця частка може бути вищою або нижчою. У переважних варіантах реалізації цього винаходу частка T_{per} -клітин збільшується щонайменше на 10 %, щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 100 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 300 %, щонайменше на 400 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 600 %, щонайменше на 700 %, щонайменше на 800 %, щонайменше на 900 % або щонайменше на 1000 %. Максимальна величина відносного збільшення частки T_{per} - клітин може варіювати для конкретних захворювань. Проте максимальна частота T_{per} -клітин, яка може бути отримана за допомогою лікування мутеїном ІЛ-2, становить 50 % або 60 % від загальної кількості CD4+CD3+ Т-клітин. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу мутеїн ІЛ-2 або гібридний білок, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, вводять суб'єкту, при цьому в периферичній крові суб'єкта збільшується співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин.

Оскільки мутеїн ІЛ-2 і гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і Fc, переважно стимулюють експансію T_{per} -клітин порівняно з іншими типами клітин, вони також можуть бути використані, щоб збільшити відношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості природних клітин-кілерів (NK) у периферичній крові суб'єкта. Величина співвідношення може бути виміряна шляхом визначення співвідношення кількості CD3+FoxP3+ клітин до кількості CD16+ та/або CD56+ лімфоцитів, які стосуються типу CD19- і CD3-.

У цьому винаході також передбачено, що мутеїни ІЛ-2 або гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, можуть надавати терапевтичну дію відносно захворювання або розладу у пацієнта без істотного збільшення співвідношення кількості T_{per} -клітин до кількості нерегуляторних Т-клітин або NK-клітин у периферичній крові пацієнта. Терапевтична дія може бути обумовлено локалізованою активністю мутеїну ІЛ-2 або гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc, у вогнищі запалення або аутоімунного захворювання.

ПРИКЛАДИ

Описані надалі приклади, включаючи конкретні приклади і приклади можливого використання, наведені з метою ілюстрування конкретних варіантів реалізації або ознак винаходу і не призначені для обмеження його обсягу.

Приклад 1. Зниження числа мутацій, які надають високу афінність відносно CD25

Мутеїни ІЛ-2 з підвищеною афінністю відносно CD25 і зменшеною активністю передачі сигналів за участю ІЛ-2R β переважно стимулюють експансію і функцію T_{рег}-клітин. Щоб зменшити потенційну імуногенність було проведено пошук мінімального числа мутацій, необхідних для досягнення високої афінності відносно CD25. Кристалічна структура ІЛ-2 в комплексі з трьома його рецепторами (код PDB-2B5I) показує, що заміни V69A і Q74P розташовані в спіральній структурі, яка взаємодіє з CD25. Цей факт може пояснити, чому заміни V69A і Q74P часто виділяли в двох незалежних скринінгових дослідженнях, спрямованих на пошук мутацій ІЛ-2, що забезпечують високу афінність зв'язування з CD25 (Rao et al. 2005; Thanos et al. 2006). Мета дослідження, описаного в цьому прикладі, полягала у визначенні того, які з інших мутацій в мутеїні ІЛ-2 "2-4", виявлених у скринінговому дослідженні, проведеному Rao et al., є найважливішими для підвищення афінності до величини, що перевищує ту, яку спостерігали для V69A і Q74P окремо. Наступні білки піддавали скринінгу за допомогою проточної цитометрії для оцінювання зв'язування з CD25 на поверхні активованих T-клітин. Всі конструкції також включали C-кінцеву мітку FLAG і полігістидинову мітку для очищення і детектування. Конкретні мутації наведені в дужках.

HaMut1D (V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:8)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut2D (N30S, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:9)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut3D (K35R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:10)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut4D (T37A, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:11)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut5D (K48E, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:12)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPEKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut6D (E68D, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:13)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEDA
 LNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D (N71R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:14)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEA
 LRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut8D (K35R, K48E, E68D, N88D, C125A) (SEQ ID NO:15)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPEKATELKHLCLEEEELKPLEDV
 LNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Конструкція HaMut7D зв'язувалася з CD25 з афінністю, величина якої була аналогічна такій для вихідного ізоляту "2-4" (~ 200 пМ), це вказує на те, що мутація N71R була здатна значно збільшувати афінність до величини, що перевищує ту, яку спостерігали для V69A, Q74P окремо (HaMut1D, ~2 нМ). Афінність інших конструкцій була аналогічна або незначно вища, ніж афінність HaMut1D, за винятком HaMut8D, величина афінності якої була лише трохи вища, ніж у ІЛ-2 дикого типу.

Приклад 2. Мутеїни ІЛ-2, гібридизовані з фрагментом Fc IgG1 для покращення періоду напіввиведення

Щоб зменшити частоту дозування, необхідну для збагачення популяції T_{рег}-клітинами при використанні мутеїну ІЛ-2, проводили оцінювання різних гібридних білків між ІЛ-2 і фрагментами Fc IgG1. Фрагменти Fc містили точкові мутації, щоб усунути ефекторні функції, опосередковані IgG1, такі як лізис клітини-мішені. Мутації фрагмента Fc для усунення ефекторних функцій включали A327Q, Ala Ala (L234A+L235A) або N297G. Оскільки мутеїни ІЛ-2, селективні відносно T_{рег}-клітин, мають частково знижену активність ІЛ-2, залишалось важливим гібридизувати ІЛ-2 з фрагментом Fc таким способом, який не проявляє суттєвого впливу на передачу сигналів за участю ІЛ-2R. Таким чином, мутеїни ІЛ-2 досліджували, щоб оцінити їхню здатність активувати ІЛ-2R після гібридизації з фрагментом Fc або в негібридизованому стані.

Щоб визначити, чи призведе димеризація ІЛ-2 при гібридизації з фрагментом Fc до збільшення інтенсивності передачі сигналів за участю ІЛ-2R внаслідок підвищеної авідності відносно ІЛ-2R, слабший мутеїн ІЛ-2 (haD5) (US20110274650) гібридизували з аміно-кінцем

фрагмента Fc, відокремленого лінкерною послідовністю GGGGS (SEQ ID NO: 5). Цей мутеїн містив 3 мутації, що впливають на передачу сигналів за участю ІЛ-2R (E15Q, H16N, N88D), 8 мутацій, що надають високу афінність відносно CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al. 2005), і C125S, щоб запобігти помилковому спаровуванню цистеїну і агрегації. Гібридизація з фрагментом Fc таким чином повністю усунула біологічну активність haD5, у той час як його високоафінне зв'язування з поверхневим CD25 посилювалося, ймовірно, внаслідок підвищення авідності в результаті димеризації.

Мутеїни ІЛ-2 також гібридизували з N- або C-кінцем гетеродимеру Fc так, що тільки один ланцюг димеру Fc ніс домен ІЛ-2. Гетеродимерне спаровування між двома асиметричними ланцюгами Fc посилювалося за рахунок електростатичних взаємодій між введеними залишками лізину на одному ланцюзі Fc і введеними залишками аспарагінової кислоти на іншому ланцюзі Fc. Мутеїн ІЛ-2, haD6 гібридизували з N-кінцем одного ланцюга Fc або іншого ланцюга, в тому випадку, якщо одна конфігурація була переважнішою, дві отримані білкові конструкції позначили haD6.FcDD і haD6.FcKK. Мутеїн haMut7D також гібридизували з C-кінцем гетеродимеру Fc з використанням одного або двох лінкерів GGGGS (SEQ ID NO: 5) (FcKK (G4S) haMut7D, FcKK (G4S) 2haMut7D). Гібридизація мутеїну ІЛ-2, haD6, з N-кінцем гетеродимеру Fc призвела до часткової втрати активності порівняно з вільним мутеїном haD6 в експериментах відносно дослідження фосфорилування pSTAT5 і проліферації Т-клітин. Навпаки, гібридизація haMut7D з C-кінцем гетеродимеру Fc з використанням одного або двох лінкерів GGGGS (SEQ ID NO: 5) не змінювала активність haMut7D.

Також було вивчено вплив гібридизації мутеїну ІЛ-2 з C-кінцем гомодимеру Fc. Загальний пул мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) при густині 300 мільйонів клітин на 100 мл активували в колбах T75 для вирощування тканинних культур з використанням 100 нг/мл антитіла до CD3 (ОКТ3). На третій день культивування клітини промивали 3 рази і залишали в стані спокою у свіжому середовищі протягом 3 днів. Потім клітини стимулювали з використанням варіантів ІЛ-2 в 10-кратному діапазоні доз для титрування від 1 пМ до 10 нМ у кінцевому об'ємі 50 мкл. Рівень фосфорилування STAT5 вимірювали за допомогою набору буферів BD Phosflow™. Загалом, 1 мл лізуючого/фіксуєчого буфера BD Phosflow™ додавали, щоб зупинити стимуляцію. Клітини фіксували протягом 20 хв при 37 °C і пермеабілізували ×1 буфером для пермеабілізації BD Phosflow™ Perm на льоду перед проведенням фарбування CD4, CD25, FoxP3 і pSTAT5.

Як видно з ФІГ. 1, біологічна активність мутеїнів haMut1D і haMut7D не змінювалася в результаті гібридизації з C-кінцем гомодимеру Fc. Таким чином, гібридизація між N-кінцем ІЛ-2 і C-кінцем Fc не погіршує агоністичну активність мутеїнів ІЛ-2, навіть стосовно гомодимеру Fc.ІЛ-2. У цих конструкціях мутацію C125A використовували замість C125S для поліпшення виробничого процесу.

Приклад 3. Регулювання активності мутеїну ІЛ-2 для забезпечення переважної експансії T_{per}-клітин

Вихідна панель мутеїнів ІЛ-2 містила N88D окремо або в комбінації з 1 або 2 додатковими мутаціями, що впливають на передачу сигналів за участю ІЛ-2R. Для того, щоб виявити мутеїни, що мають аналогічну або незначно вищу агоністичну активність, порівняно з серією N88D, була розроблена друга панель мутеїнів, які всі містили поодинокі точкові мутації. Панель, що включає 24 сигнальні мутації, була виявлена на основі передбачуваних амінокислот, що взаємодіють з ІЛ-2Rβ (кристалічна структура, код PDB-2B5I). Конкретні заміни вибирали на підставі прогнозованого зниження вільної енергії зв'язування між мутеїном та ІЛ-2Rβ. Величину вільної енергії зв'язування розраховували з використанням обчислювального алгоритму EGAD (лабораторія Генделя, Каліфорнійський університет в Сан-Дієго, США). Величину вільної енергії зв'язування мутованого варіанта визначають як $\Delta\Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$. Де μ (= 0,1, як правило) позначає коефіцієнт похибки, що використовували для нормування прогнозованих змін афінності зв'язування, щоб отримати нахил кривої 1, при порівнянні з експериментальними величинами енергії (Pokala and Handel 2005). Вільну енергію дисоціації (ΔG) визначали як різницю величин енергії між пов'язаним станом (ΔG_{bound}) і вільним станом (ΔG_{free}). Величину енергії дисоціації ΔG_{mut} розраховували для кожної заміни.

Панель мутеїнів ІЛ-2, що містять наступні заміни (H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R або E95I), експресували у вигляді C-кінцевих гібридних білків з гетеродимером Fc. Ці конструкції також містили мутації haMut7, для додання високої афінності зв'язування з CD25 (V69A, N71R, Q74P) і C125A, щоб забезпечити ефективний фолдинг білкового ланцюга.

Панель піддавали скринінгу для визначення активності за допомогою кількісного дослідження рівня фосфорилування STAT5 у Т-клітинах, описаного в Прикладі 2, при цьому

було виявлено, що активність H16E, D84K, V91N, V91K і V91R була нижчою, ніж активність ІЛ-2 дикого типу, і вищою, ніж активність N88D (ФІГ. 2).

H16E, D84K, V91N, V91K і V91R мали активність, яка була нижчою, ніж активність ІЛ-2 дикого типу, і вищою, ніж активність N88D.

5 Відібрані мутеїни також досліджували в кількісних дослідженнях проліферації Т-клітин і NK-клітин.

Для проведення досліджень проліферації Т-клітин загальний пул МКПК при густині 3 млн. клітин/мл активували 100 нг ОКТ3. На 2-й день клітини промивали 3 рази і залишали в стані спокою у свіжому середовищі протягом 5 діб. Потім клітини позначали з використанням сукцинімідилового ефіру карбоксифлуоресцеїну (CFSE) та додатково культивували в 24-ямокковому планшеті при густині 0,5 млн./ямку в середовищі, що містить ІЛ-2, протягом 7 діб перед проведенням дослідження способом проточної цитометрії (FACS). Проліферація підгрупи Т-клітин проілюстрована на ФІГ. 3 як розведення CFSE (медіана інтенсивності флуоресценції CFSE).

15 Для дослідження проліферації NK-клітин підгрупу CD16⁺NK-клітин, відібраних за допомогою магніто-активованого клітинного сортиру, культивували в середовищі, що містить ІЛ-2, протягом 3 днів при густині 0,1 млн./ямку в 96-ямоккових планшетах. За 0,5 мкКи Н³-тимідину вносили в кожен ямку протягом останніх 18 годин інкубації. Результати дослідження проілюстровані на ФІГ. 4.

20 Мutowані варіанти H16E, D84K, V91N, V91K і V91R були здатні стимулювати експансію T_{рег}-клітин, аналогічно тому, як це спостерігали для ІЛ-2 дикого типу, проте були в близько 10 разів менш активні відносно інших Т-клітин (ФІГ. 3) і в близько 100 разів менш активні відносно NK-клітин (ФІГ. 4).

25 Була сконструйована окрема панель гібридних білків Fc.ІЛ-2, в яких відстань між гетеродимером Fc і мутеїном haMut7 (V69A, N71R, Q74P, C125A) зменшили шляхом скорочення амінокислотної послідовності на кілька залишків.

Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 22)

30 Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 23)

Trunc2 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 24)

Trunc3 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 25)

Trunc4 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 26)

Trunc5 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 27)

Trunc6 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 28)

35 Trunc7 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 29)

Trunc8 Fc...TQKSLSLSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 30)

Активність варіантів Trunc1-Trunc4 була аналогічна такій для повнорозмірної вихідної конструкції Fc.haMut7, згідно з результатами вимірювання рівня фосфорилування STAT5 і проліферації Т-клітин і NK-клітин, як описано для ФІГ. 2, 3 і 4. Варіанти Trunc5 і Trunc6 стимулювали слабші відповіді, інтенсивність яких, однак, була сильнішою, ніж інтенсивність відповідей, стимульованих мутацією N88D (haD і haMut7D), і була практично аналогічна інтенсивності відповідей, стимульованих V91K. Активність варіанта Trunc7 була слабшою, ніж активність мутеїнів, що містять N88D, Trunc8 мав дуже низьку активність. Але при випробуванні на NK-клітинах Trunc5 і Trunc6 проявили себе як сильніші агоністи, ніж V91K, це свідчить про те, що селективності відносно T_{рег}-клітин легше досягнути при використанні мутацій, що впливають на шляхи передачі сигналів, ніж при створенні стеричних перешкод за допомогою проксимального фрагмента Fc.

Приклад 4. Мутації, що забезпечують високу афінність відносно CD25, стосовно гомодимеру Fc

50 Мутації, які надавали високу афінність зв'язування з CD25, вважалися переважними, оскільки вони підвищували тропізм відносно Т-клітин, що експресують високі рівні CD25, сприяли утворенню стійкого зв'язку мутеїн ІЛ-2:CD25 і забезпечували тривалішу передачу сигналів. Проте зменшення кількості мутацій може знизити можливу імуногенність. Мутеїни, що містять N88D або V91K, з і без мутацій haMut1 V69A і Q74P, що забезпечують високу афінність, експресували у вигляді С-кінцевих гібридів гомодимеру Fc і порівнювали їхню біологічну активність. У дослідженні рівня фосфорилування pSTAT5 гомодимеризація не чинила впливу на інтенсивність сигналу порівняно з мономерним мутеїном. Реверсія мутацій V69A і Q74P, що забезпечують високу афінність, також не впливала на передачу сигналів за участю pSTAT5. У дослідженнях проліферації Т-клітин мутації, що забезпечують високу афінність, зменшували активність звичайних CD4 Т-клітин і CD8 Т-клітин, але не регуляторних Т-клітин (ФІГ. 5). Мутації,

що забезпечують високу афінність, також не змінювали проліферативні відповіді NK-клітин (ФІГ. 6).

Щоб визначити, чи впливають мутації, що забезпечують високу афінність, на відповіді Т-клітин в умовах *in vivo*, гуманізованим мишам (NOD.SCID.II2rg-нульові миші, імунну функцію яких відновлювали людськими CD34⁺ гемопоетичними стовбуровими клітинами) вводили гібридні білки, що містять мутеїн ІЛ-2 і Fc, і контролювали експансію T_{рег}-клітин. NOD.SCID.II2rg-нульових (NSG) мишей у віці 7-ї тижнів (Jackson Labs, Бар-Харбор, Мен, США) опромінювали (180 рад) і відновлювали імунну функцію шляхом введення 94000 ембріональних CD34⁺ гемопоетичних стовбурових клітин печінки людини. Через 21 тиждень мишей розподіляли на 6 груп на підставі рівномірного розподілу частки химеризму (згідно з результатами проточної цитометрії лімфоцитів периферичної крові) і вводили 1 мкг зазначених гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і фрагмент Fc або фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) шляхом підшкірних ін'єкцій на 0-у і 7-у добу. На 11-у добу кількість Т-клітин визначеної підгрупи в крові визначали за допомогою проточної цитометрії. При низькій дозі 1 мкг на тварину мутації, що забезпечують високу афінність, не покращували експансію T_{рег}-клітин понад те, що спостерігали для мутацій N88D або V91K окремо (ФІГ. 7).

Експансія T_{рег} була селективною в тому, що частка Fc α 3-CD4⁺ Т-клітин не збільшувалася відносно загальної кількості лейкоцитів периферичної крові (ЛПК), що представляють собою суміш В- і Т-клітин людини, і мієлоїдних клітин миші. Крім того, при вищих дозах мутації, що забезпечують високу афінність, сприяли збільшенню кількості CD25⁺Fc α 3⁺ Т-клітин, таким чином зменшуючи селективність відносно T_{рег}-клітин. Так, стосовно гомодимеру Fc мутації, що забезпечують високу афінність, не розглядали як необхідні для стимулювання переважної експансії T_{рег}-клітин.

Fc.WT IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(C125A) (SEQ ID NO:16)
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

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

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EALNLAQSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.V91K (або Fc.II-2(V91K)) IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

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

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EALNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.N88D (або Fc.II-2(N88D)) IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Приклад 5. Триваліший зв'язок мутеїнів ІЛ-2.Fc з CD25 на поверхні клітин

У ході досліджень на гуманізованих мишах був отриманий несподіваний результат, який

свідчить про те, що, незважаючи на свою знижену здатність передавати сигнали, мутеїни індукували стійкіше збагачення популяції T_{рег}-клітинами порівняно з Fc.ІЛ-2 дикого типу. Значніше збагачення T_{рег}-клітинами і активацію FoxP3 порівняно з тими, які спостерігали при використанні Fc.WT, виявляли при дозі 1 мкг/миша (ФІГ.7) і при нижчій дозі 0,5 мкг/миша (ФІГ. 8). Таке збільшення активності в умовах *in vivo*, можливо, було зумовлено зниженням поглинання T-клітинами, що призвело до збільшення кількості гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2.Fc, доступного для тривалішої передачі сигналів.

Проте в ході досліджень фармакокінетики в умовах *in vitro* і *in vivo* не було отримано доказів істотного збільшення тривалості збереження Fc.V91K або Fc.N88D порівняно з Fc.WT у супернатантах, отриманих з культур активованих T-клітин, або в сироватці мишей, що отримували досліджувані сполуки. Оскільки Fc-гібридні білки несли два домени мутеїну ІЛ-2, то підвищене рециркулювання в ендосомах може призвести до тривалішого зв'язку з клітинною поверхнею внаслідок збільшення авідності відносно CD25. Так, було виявлено, що Fc.V91K і Fc.N88D ефективніше ніж Fc.WT зберігаються на поверхні раніше активованих T-клітин після короткочасного впливу гібридних білків (ФІГ. 9А і В).

Первинні МКПК попередньо стимулювали протягом двох днів, використовуючи 100 нг/мл ОКТ3. Клітини збирали, промивали чотири рази і залишали в стані спокою протягом ночі в культуральному середовищі. Потім клітини стимулювали 400 пМ Fc.ІЛ-2 протягом 30 хв при 37 °С. Після стимуляції клітини збирали для визначення в Т0 після одного промивання або промивали ще три рази в 12 мл теплового середовища і культивували протягом чотирьох годин. Для детектування, пов'язаного з клітинами Fc.ІЛ-2, клітини фарбували FITC-кон'югованими антитілами до людського IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Грув, Пенсильванія, США) і кон'югованими з алофікоціаніном антитілами до CD25 (ФІГ. 9А).

Збільшення тривалості передачі сигналів за участю ІЛ-2R при використанні Fc.V91K і Fc.N88D, порівняно з Fc.WT, спостерігали за допомогою внутрішньоклітинного імунного детектування фосфо-STAT5 в аналогічних часових точках. Середні величини інтенсивності флуоресценції фосфо-STAT5 в FoxP3+CD4+ T-клітинах наведені на ФІГ. 9В.

Приклад 6. Оптимізація гібридної послідовності

У доклінічних дослідженнях на мишах було показано, що величини впливу гібридних білків, що містять мутеїни ІЛ-2 і Fc, були різними, коли концентрації інтактною молекули в сироватці крові порівнювали з такими для фрагмента Fc людини окремо, що вказує на циркуляцію катаболіту Fc людини. Для оптимізації стабільності та фармакокінетики гібридних білків, що містять мутеїни ІЛ-2 і Fc, в умовах *in vivo* проводили дослідження модифікацій гібридної послідовності, щоб визначити їхній вплив на протеолітичне розщеплення гібридних білків, що містять мутеїни ІЛ-2 і фрагмент Fc, в системному кровотоці та під час повторної переробки в ретикулоендотеліальній системі. Перераховані далі конструкції оцінювали відносно їхнього впливу на протеолітичну деградацію в умовах *in vitro* і *in vivo*.

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

(N297G_delK)_G4S ...TQKSLSLSPG_GGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID NO: 32)

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

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

Стабільність вимірювали за допомогою кількісних імунологічних досліджень шляхом порівняння концентрації загального пулу Fc людини і концентрації інтактного гібридного білка, що містить Fc і мутеїн ІЛ-2, у різних часових точках. Протеоліз гібридного білка, що містить мутеїни ІЛ-2 і Fc, підтверджували за допомогою вестерн-блоттингу, використовуючи антитіла до ІЛ-2 і антитіла до Fc людини, з подальшим зв'язуванням катаболітів імунологічними способами і дослідженням способом мас-спектрометрії. При проведенні мас-спектрометричних досліджень катаболітів (Ala_Ala)_G4S із зразків, отриманих в умовах *in vitro* і *in vivo*, С-кінцевий Lys фрагмента Fc був визначений як сайт протеолітичного розщеплення. Делеція або мутація С-кінцевого лізину у фрагменті Fc ((N297G_delK)_G4S і (N297G_KtoA)_AAPT) забезпечила тривалішу стабільність в мишачій сироватці при 37 °С в умовах *in vitro* порівняно з конструкціями Fc, що містять С-кінцевий лізин ((Ala_Ala)_G4S). Подібна триваліша стабільність у сироватці крові в умовах *in vitro* призвела до більшої величини впливу у мишей, згідно з результатами вимірювання області під кривою концентрація-час (AUC) у сироватці крові для гібридного білка, що містить мутеїн ІЛ-2 і Fc. Тривалішу стабільність гібридних білків, що містять мутеїн ІЛ-2 і позбавлений С-кінцевого лізину фрагмент Fc, також спостерігали в сироватці крові яванських макак і людини в умовах *in vitro*. Мутація Thr-3 на Ala ((N297G_KtoA)_AAPA) в ІЛ-2 призвела до зниження стабільності в умовах *in vitro* при 37 °С (порівняно з (N297G_KtoA)_AAPT) у сироватці крові мишей і в окремих експериментах, що включали інкубацію з рекомбінантним катепсином D і L людини. Подібна знижена стабільність у сироватці крові в умовах *in vitro* призвела до

зменшення впливу (AUC) у мишей в умовах *in vivo* для (N297G_KtoA)_AAPA порівняно з (N297G_KtoA)_AAPT. Мас-спектрометричні дослідження катаболітів (N297G_KtoA)_AAPA із зразків, отриманих в умовах *in vitro* і *in vivo*, виявило, що залишки Lys 8 і Lys 9 мутеїну ІЛ-2 сприйнятливі до протеолізу, який не був виявлений для еквівалентних зразків (N297G_KtoA)_AAPT. Зниження стабільності при 37 °С (N297G_KtoA)_AAPA до величини характерної для (N297G_KtoA)_AAPT також спостерігали в сироватці крові яванських макак і людини в умовах *in vitro*.

Зважаючи на важливість глікозилування в цій області і для того, щоб потенційно поліпшити виробничу технологічність гібридного білка, гібридні послідовності змінювали, як описано надалі, щоб посилити N-пов'язане, але не O-пов'язане глікозилування:

Вихідна конструкція

IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(V91K, C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 32)

Змінена конструкція

IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(T3N, V91K, C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(T3N, S5T, V91K, C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSTSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 36)

IgG1Fc(N297G_delK):GGNGT:hulL-2(T3A, V91K, C125A) TQKSLSLSPGGGGGTAPASSSTKKTQLQ_n (SEQ ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK):YGNGT:hulL-2(T3A, V91K, C125A) TQKSLSLSPGYGGGTAPASSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 38)

Приклад 7. Визначення фармакокінетики та фармакодинаміки у яванських макак

При використанні стандартних способів лікування, спрямованих на стимуляцію імунної системи під дією ІЛ-2, необхідні перерви між циклами введення лікарських препаратів (відсутність впливу), щоб уникнути небажаних побічних ефектів. На відміну від цього, способи лікування, спрямовані на стимулювання або експансію T_{per}-клітин, можуть потребувати тривалого впливу зі стійкими залишковими рівнями лікарських препаратів (C_{min} у сироватці крові), достатніми для стимуляції T_{per}-клітин, але з максимальними величинами впливу (C_{max} у сироватці крові), які нижчі рівня лікарського препарату, який призводить до активації імунної системи. Цей приклад описує стратегії дозування мутеїнів, що мають збільшений період напіввиведення, у яванських макак для досягнення тривалішого впливу на мішень (C_{min} у сироватці крові), при збереженні максимальних величин впливу (C_{max} у сироватці крові) нижче рівня лікарського препарату, який, як очікується, буде необхідний для запальної активації імунної системи.

У чотирьох групах (A-D) яванських макак вводили Fc.V91K (IgG1Fc(N297G_delK):G4S:hulL-2(V91K, C125A), причому в трьох групах (A-C) введення здійснювали підшкірним шляхом і в одній групі (D) шляхом внутрішньовенних ін'єкцій. У кожній з груп чотирьом біологічно інтактним самцям яванських макак вводили досліджувані сполуки з використанням стратегії дозування, описаної нижче. Підшкірне введення мутеїнів зі збільшеним періодом напіввиведення може забезпечити інтенсивніше всмоктування в лімфатичній системі, що призводить до отримання нижчих величин впливу (C_{max} у сироватці крові) та/або надійнішої фармакологічного відповіді (експансія T_{per}). Стратегія дозування для групи А складається з введення трьох послідовних доз 10 мкг/кг на 0, 2, 4-у добу в циклі 1, і 10 мкг/кг на 14-ту добу, що забезпечує триваліший вплив на мішень, аналогічний тому, який спостерігають при вищій початковій дозі 50 мкг/кг, при збереженні низької максимальної величини впливу (C_{max}). Стратегія дозування для групи В включає введення доз 50 мкг/кг на 0-ву і 14-ту добу для порівняння з групою А. Стратегія дозування для групи С включає введення дози 50 мкг/кг на 0-ву і 28-му добу. Зазначені дозування дозволяють визначити, чи проявляють залишкові концентрації досліджуваних препаратів вплив на мішень, який є достатнім для підтримки переважної експансії T_{per}-клітин, а також чи забезпечує перерва між циклами введення препарату будь-яку перевагу. Стратегія дозування для групи D з внутрішньовенним введенням включає введення дози 50 мкг/кг на 0-ву добу, що дозволяє порівняти максимальні величини впливу (C_{max}) та різниці у ступені збагачення T_{per}-клітинами з цими показниками при підшкірному введенні.

Фармакокінетичні параметри (кількісне імунологічне дослідження інтактною молекули і загального рівня Fc людини), рівні антитіл до лікарського препарату, рівні відщепленої розчинної форми CD25 і цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1β, ФНП-α, ІФН-γ, ІЛ-10, ІЛ-5, ІЛ-4 та ІЛ-13) вимірювали в наступних часових точках для кожної зазначеної дозової групи:

Група А: перед введенням дози (перший цикл; доза 1), 48 (перший цикл перед введенням дози; доза 2), 96 (перший цикл перед введенням дози; доза 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336

(другий цикл перед введенням дози), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 і 1008 годин.

Група В: перед введенням дози (перший цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336 (другий цикл перед введенням дози), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 і 1008 годин.

5 Група С: перед введенням дози (перший цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672 (другий цикл перед введенням дози), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080 і 1176 годин.

Група D: перед введенням дози (перший цикл), 0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 і 672 годин.

10 Фармакодинамічні параметри (імунологічне фенотипування і підрахунок T_{reg} -клітин, нерегуляторних CD4 і CD8 T-клітин і NK клітин в периферичній крові) вимірюють у таких часових точках для кожної зазначеної дозової групи:

Група А: перед введенням дози (перший цикл; доза 1), 96 (перший цикл перед введенням дози; доза 3), 168, 336 (другий цикл перед введенням дози), 456 і 576 годин.

15 Група В: перед введенням дози (перший цикл), 120, 240, 336 (другий цикл перед введенням дози), 456 і 576 годин.

Група С: перед введенням дози (перший цикл), 120, 240, 672 (другий цикл перед введенням дози), 792 і 912 годин.

Група D: перед введенням дози (перший цикл), 120 і 240 годин.

20 Показники загального і біохімічного аналізу крові оцінюють у всіх тварин і у всіх дозових групах перед введенням дози і через 24 години після введення початкової дози в кожній дозовій групі. Оцінюють наступні параметри.

Гематологічні показники:

о Кількість лейкоцитів (загальний і абсолютний вміст лейкоцитів)

о Кількість еритроцитів

25 о Гемоглобін

о Гематокрит

о Середня еритроцитарна концентрація гемоглобіну, середній об'єм еритроцитів, середня еритроцитарна концентрація гемоглобіну (розрахункова)

о Абсолютна кількість ретикулоцитів

30 о Кількість тромбоцитів

о Морфологія клітин крові

о Ширина розподілу еритроцитів за об'ємом

о Середній об'єм тромбоцитів

Показник біохімічного аналізу крові:

35 о Лужна фосфатаза

о Загальний білірубін (прямої білірубін, якщо загальний білірубін перевищує 1 мг/дл)

о Аспартатамінотрансфераза

о Аланінамінотрансфераза

о Гамма-глутамілтрансфераза

40 о Азот сечовини

о Креатинін

о Загальний білок

о Альбумін

о Глобулін і співвідношення А/Г (альбумін/глобулін) (розрахункове)

45 о Глюкоза

о Загальний холестерин

о Тригліцериди

о електроліти (натрій, калій, хлорид)

о Кальцій

50 о Фосфор

Приклад 8. Неглікозилований фрагмент Fc IgG1

Природні антитіла IgG містять сайт глікозилювання в константній області 2 важкого ланцюга (CH2). Наприклад, людські антитіла IgG1 містять сайт глікозилювання в позиції Asn297 (нумерація згідно з системою ЕС). Сьогодні стратегії створення неглікозилованих антитіл включають заміну залишку Asn амінокислотою, фізико-хімічні властивості якої аналогічні таким Asn (наприклад, Gln), або залишком Ala, який імітує бічний ланцюг Asn без полярних груп. У цьому прикладі описані переваги заміни Asn гліцином (N297G). Фрагменти Fc із заміною N297G являють собою неглікозиловані молекули з поліпшеними біофізичними властивостями і параметрами, що стосуються виробничої технологічності (наприклад, відновлення в процесі очищення).

60

Вивчення кількох відомих кристалічних структур фрагментів Fc і антитіл IgG виявило значну конформаційну гнучкість навколо глікозилизованого петлевого сегмента, особливо в позиції залишку Asn297, який є глікозилованим. У багатьох відомих кристалічних структурах залишок Asn297 набував конформації з позитивним значенням торсійних кутів основного ланцюга. Gly має високу схильність набувати конформації з позитивним значенням торсійного кута основного ланцюга у зв'язку з відсутністю атомів бічного ланцюга. Таким чином, на підставі цієї конформації і структурного фактора Gly може являти собою переважнішу заміну для Asn, ніж N297Q або N297A.

Мутаційний обмін Asn297 на Gly призводить до отримання неглікозилованих молекул з істотно поліпшеною здатністю до відновлення (або ефективністю) у процесі очищення і поліпшеними біофізичними властивостями. Наприклад, відсоток відновлення (кінцевий вихід) з пулу, сорбованого на білку А, становив 82,6 % для мутації N297G порівняно з 45,6 % для N297Q і 39,6 % для N297A. Дослідження з використанням колонки, що містить гідролізовані пептидні фрагменти соєвого білка з пов'язаними фосфоліпідами, показало, що нижчий відсоток відновлення для мutowаних варіантів N297Q і N297A був пов'язаний з подовженням спадаючої частини піку, яка вказує на присутність високомолекулярних агрегатів та/або фрагментів з неправильним упакуванням ланцюгів. Цей результат був повторно підтверджений у великомасштабній серії експериментів з реакційним об'ємом, що дорівнює 2 л.

У біофармацевтичній промисловості молекули, які потенційно можна використовувати у великомасштабному виробничому процесі, наприклад, потенційно придатні для випуску на ринок як лікарські засоби, оцінюють за рядом характеристик, щоб знизити ризик того, що молекула непридатна для великомасштабного виробництва й очищення. При оцінюванні виробничої технологічності заміна N297G проявила стійкість до змін рН. При випробуванні N297G відсутні проблеми, пов'язані з агрегацією; в той час як заміни N297Q і N297A викликали 20 % і 10 % збільшення агрегації, відповідно. Незважаючи на те, що заміна N297G демонструвала кращі характеристики виробничої технологічності, її показники були аналогічні таким для N297Q і N297A у всіх функціональних дослідженнях, в яких вона була досліджена. Наприклад, у дослідженнях ADCC-індукуючої здатності було показано, що N297G не має цитотоксичності, аналогічно N297Q і N297A.

Приклад 9. Стабілізований глікозилований фрагмент Fc IgG1

Цей приклад описує спосіб покращення стабільності каркаса антитіл IgG шляхом введення сконструйованого дисульфідного(их) зв'язку(ів). Природні антитіла IgG є стабільними молекулами. Проте для деяких видів терапевтичного застосування може знадобитися введення мутацій або створення неглікозилованих молекул. Наприклад, неглікозиловані молекули IgG можуть бути використані для терапевтичних показань, при яких необхідно уникати ADCC і зв'язування з рецепторами Fcγ. Тим не менше, неглікозиловані молекули IgG1 мають значно нижчу температуру плавлення (температура плавлення домену CH2 зменшується на приблизно 10 °C; з 70 °C до 60 °C), ніж глікозиловані молекули IgG1. Виявлена нижча температура плавлення негативно впливає на різні біофізичні властивості неглікозилизованого IgG1. Наприклад, неглікозиловані IgG1 більш схильні до утворення агрегатів при низькому значенні рН порівняно з глікозилованим IgG1.

Для конструювання дисульфідних зв'язків спочатку використовували метод, оснований на структурних даних, що включає розрахунок відстані між C-альфа атомами, щоб виявити 54 пари залишків у фрагменті Fc, придатних для мутаційної заміни залишком Cys. Ці 54 сайти дали скоротили до 4 пар залишків (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C і V323C-I332C). Використовувані критерії включали (i) позиції в межах області CH2, (ii) позиції, віддалені від петель, вигинів ланцюга і вуглеводних фрагментів, (iii) позиції, віддалені від рецептора Fcγ і сайтів взаємодії з FcRn, (iv) позиції, доступні для розчинника (переважно заглиблені позиції) і т.д.

Парні заміни цистеїном створювали для використання в послідовності неглікозилизованого фрагмента Fc N297G. Пептидне картування в невідновних умовах показало, що три з чотирьох сконструйованих сайтів формували дисульфідні зв'язки, згідно з прогнозом і передбачуваним дизайном зазначеного фрагмента. Мутація V259C-L306C не формувала дисульфідні зв'язки і призвела до неправильного спаровування з нативним дисульфідом, вже присутнім в області CH2. Інші три пари мутацій: R292C-V302C, A287C-L306C і V323C-I332C формували дисульфідні зв'язки належним чином, згідно з прогнозом і передбачуваним дизайном. Додавання дисульфідного зв'язку до мутації N297G призвело до поліпшення термостабільності приблизно на 15 °C порівняно з мутацією N297G окремо. З таких варіантів потенційних дисульфідних зв'язків як R292C-V302C, A287C-L306C і V323C-I332C, мутації R292C-V302C і A287C-L306C мали хороші фармакокінетичні параметри при введенні щурам ($T_{1/2}$ становив одинадцять діб і

дев'ять діб, відповідно). Ці результати відрізнялися від опублікованого раніше фармакокінетичного профілю, що спостерігали у щурів, для дисульфідного зв'язку в області CH2 (Gong et al., J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210), згідно з яким $T_{1/2}$ становив п'ять діб.

5 Конструювання дисульфідного зв'язку в області CH2 покращує стабільність неглікозилованої молекули до величини, характерної для глікозилованих молекул IgG1 (покращення температури плавлення на 10 °C-15 °C, згідно з результатами диференціальної скануючої калориметрії). Сконструйовані сайти, описані в цій заявці, не призводять до неупорядкованого формуванню дисульфідних зв'язків, і дисульфідні зв'язки формуються згідно з прогнозом приблизно в 100 % популяції. Ще важливішим є той факт, що на відміну від сайту дисульфідного зв'язку в області 10 CH2, описаного в опублікованих літературних джерелах, дисульфідні зв'язки, описані в цій заявці, не впливають на параметри фармакокінетики у щурів.

Приклад 10

Вплив мутації V91K і N88D на відповіді в Т-клітинах і NK-клітинах яванських макак і людини порівнювали в умовах *in vitro*. За присутності CD25 (популяція CD4⁺CD25⁺ Т-клітин, 15 інтенсивність сигналу яких вище порогового значення, при реєстрації відповідей pSTAT5 у зразку цільної крові) вплив мутації V91K на передачу сигналів за участю ІЛ-2R у яванських макак був незначним порівняно зі зниженням активності передачі сигналів за участю ІЛ-2R людини. Тим не менше, за відсутності CD25 (у популяції CD25⁻ Т-клітин, інтенсивність сигналу 20 яких вище порогового значення, при реєстрації відповідей pSTAT5 в цільній крові і в дослідженні проліферації NK-клітин) мутація V91K викликала більш виражене зменшення передачі сигналів за участю ІЛ -2R у яванських макак. Навпаки, Fc.N88D викликала зменшення передачі сигналів в CD25⁺ Т-клітинах цільної крові яванських макак, яке було більш схожим з впливом мутації Fc.V91K на передачу сигналів в Т-клітинах цільної крові людини. Дані в Таблиці 2, отримані в 25 умовах *in vitro*, показують, що терапевтичне вікно, що спостерігали для слабшого агоніста Fc.N88D у яванських макак, дозволить передбачити вплив мутації Fc.V91K у людини.

Таблиця 2

Узагальнені дані відносно впливу мутацій V91K або N88D на відповіді в клітинах людини і яванських макак в умовах *in vitro*

	pSTAT5 у цільній крові		Проліферація NK-клітин
	CD25 ⁺ Т-клітини	CD25 ⁻ Т-клітини	
V91K у яванських макак	∅	↓	↓
V91K у людини	↓	↓↓	↓↓
N88D у яванських макак	↓	↓↓	↓↓
N88D у людини	↓↓	↓↓	↓↓↓

Приклад 11

30 Два дослідження в умовах *in vivo* були проведені на яванських макаках. Перше дослідження на яванських макаках було розроблено для порівняння інтервалів між введенням Fc.V91K, що становило два тижні і чотири тижні, щоб визначити, чи змінює повний або частковий фармакокінетичний (ФК) і фармакодинамічний (ФД) спад терапевтичної активності величину відповіді на другу дозу (ФІГ. 10A і B). У дослідженнях використовували першу дозу, яка згідно з 35 прогнозами, забезпечує потужну відповідь T_{рег}-клітин (50 мкг/кг), і другу дозу, щоб вивчити нижні межі терапевтичного вікна (10 мкг/кг). Оскільки не було відомо, чи була доза 10 мкг/кг занадто низькою, дози вводили на 1, 3 і 5-у добу, щоб збільшити ймовірність відповіді. Ця схема дозування забезпечила отримання величини впливу після 5-ї доби, яка була аналогічна величині, що досягнули при введенні одноразової дози 50 мкг/кг підшкірно (п/ш), але з більш низьким значенням C_{max}. Група, що отримувала дозу 50 мкг/кг внутрішньовенно (в/в), також була 40 включена для вивчення потенційних відмінностей параметрів ФД залежно від вищої величини впливу препарату в лімфатичній системі порівняно з кровоносною системою. Результати цього дослідження показали, що кожен з рівнів доз індукував активну експансію T_{рег}-клітин, яке не супроводжувалося небажаними явищами (НЯ) або експансією T_{еф} або NK-клітин, і що величини 45 відповідей на другу дозу, яку вводили на 14-ту або 28-му добу, були еквівалентними.

Таблиця 3

Дизайн першого дослідження на яванських макаках

Група	К-сть тварин	Дозування (доба)	Доза Fc.V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 мкг/кг підшкірно
2	4	1, 15	50 мкг/кг підшкірно
3	4	1, 29	50 мкг/кг підшкірно
4	4	1	50 мкг/кг внутрішньовенно

Друге дослідження на яванських макаках було розроблено, щоб вивчити межі терапевтичного вікна для Fc.V91K у дозах, що дорівнюють 1, 3, 100, 200 мкг/кг (п/ш), і порівняти їх з показниками для слабкого агоніста Fc.N88D у дозах 3, 10, 100, 200 мкг/кг (п/ш) і пролейкіну® в дозах 3, 10, 30, 100 мкг/кг (п/ш, 1 р./добу протягом 5 діб). Дози пролейкіну® вибирали на підставі опублікованих даних досліджень з участю людей і на приматах, за винятком людини (Hartemann et al., 2013, Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305; Saadoun et al., 2011, NEJM 365:2067-77; Aoyama et al., 2012, Am J Transplantation 12:2532-37), і вводили 1 р./добу протягом 5 діб, щоб імітувати клінічні дослідження з використанням низьких доз ІЛ-2 для лікування ВГС-індукованого васкуліту та цукрового діабету 1 типу (ЦД1).

Таблиця 4

Дизайн другого дослідження на яванських макаках

Група	К-сть тварин	Досліджуваний препарат	1-й цикл лікування Доба введення доз: доза (п/ш)	2-й цикл лікування Доба введення доз: доза (п/ш)
1	4	Пролейкін®	Доби 1-5: 3 мкг/кг	Доби 14-18: 30 мкг/кг
2	4	Пролейкін®	Доби 1-5: 10 мкг/кг	Доби 14-18: 100 мкг/кг
3	4	Fc.V91K	Доба 1: 1 мкг/кг	Доба 14: 100 мкг/кг
4	4	Fc.V91K	Доба 1: 3 мкг/кг	Доба 14: 200 мкг/кг
5	4	Fc.N88D	Доба 1: 3 мкг/кг	Доба 14: 100 мкг/кг
6	4	Fc.N88D	Доба 1: 10 мкг/кг	Доба 14: 200 мкг/кг

На Фігурах 11A-F проілюстровані зміни кінетики клітинних відповідей, температури тіла і концентрації СРБ у сироватці крові. Часова шкала на осі абсцис починається з 0-ї доби, а не 1-ї доби, як доби введення першої дози.

У сукупності результати двох досліджень на яванських макаках показали, що мутеїни ІЛ-2 ініціювали більш значуще збагачення популяції T_{reg} -клітинами з ширшим терапевтичним вікном, ніж при використанні пролейкіну® (ФІГ. 12A і B). При використанні пролейкіну® збагачення T_{reg} -клітинами здійснювалося одночасно з експансією НК-клітин і еозинофілів. Безвідносно до будь-якої конкретної теорії автори вважають, що експансія еозинофілів є відомою відповіддю на лікування з використанням ІЛ-2 і, швидше за все, викликаною ІЛ-2-індукованим вивільненням ІЛ-5 з CD25⁺ вроджених лімфоїдних клітин. Експансія CD4 і CD8 T_{eff} -клітин мала місце при дозах, які викликали збільшення кількості T_{reg} -клітин на 25-35 % від загальної популяції CD4 T-клітин. На відміну від цього Fc.V91K і Fc.N88D з більшою селективністю індукували експансію T_{reg} -клітин порівняно з НК-клітинами і еозинофілами, і дози, які стимулювали експансію T_{eff} -клітин, були вищі за ті, які викликали збагачення T_{reg} -клітинами до >40 % від загальній популяції CD4 T-клітин.

Згідно з даними з клінічних досліджень з використанням низьких доз ІЛ-2, описаних у літературних джерелах, небажані явища (НЯ), що виникали першими, включали грипозні симптоми і лихоманку. Таким чином, додатково з порівнянням терапевтичних вікон, мета цього дослідження полягала у виявленні біомаркерів, які передували лихоманці. Як показано на ФІГ. 12C, було виявлено, що при використанні двох високих доз пролейкіну® рівень СРБ корелював з температурою тіла. При найвищій дозі Fc.V91K було виявлено помірне підвищення температури тіла, і при введенні наступної нижчої дози спостерігали невелике збільшення СРБ. Таким чином, рівень СРБ може бути використаний для контролю відповіді суб'єкта на лікування з використанням молекули згідно з цим винаходом та/або для визначення верхньої межі

підвищення дози у пацієнта.

У тварин, які отримували пролейкін®, також спостерігали деякі види токсичності, які були або менш вираженим, або були відсутні у тварин, які отримували Fc.V91K або Fc.N88D (ФІГ. 12D). Було встановлено, що рівні тромбоцитів, нейтрофілів і альбуміну знижувалися в результаті лікування пролейкіном®, тоді як дози Fc.V91K або Fc.N88D, які викликали аналогічне або більш виражене збагачення популяції T_{рег}-клітинами, незначно знижували ці параметри або не чинили на них впливу. У сукупності ці дані показують, що терапевтичне вікно для лікування пацієнтів з використанням Fc.V91K або Fc.N88D, як очікується, буде значно більшим, ніж при використанні пролейкіну®.

Приклад 12

В окремих часових точках у зразках сироватки, отриманих з першого дослідження на яванських макаках, описаного в прикладі 11, визначали присутність антитіл до лікарського препарату (ADA) (ФІГ. 13). Наведено дані про співвідношення сигнал/шум для ADA в зразках, в яких специфічність Fc.V91K підтверджували за допомогою конкурентного дослідження. Часові точки, в яких проводили випробування ADA, показані вертикальними лініями вище осі ОХ. У групі 1 в одній тварини ADA вироблялися щонайменше через п'ятнадцять днів після введення останньої дози, у групі 2 жодна тварина не мала позитивних результатів визначення ADA, і в групі 3 ADA послідовно з'явилися у трьох тварин через п'ятнадцять або більше днів після введення першої дози. Після повторного введення препарату в групах 1 і 2 в дозі 50 мкг/кг на 162-у добу жодна інша тварина не мала позитивного результату визначення ADA через чотири тижні (190-а доба). У двох тварин у групі 3, у яких були отримані найсильніші сигнали ADA (210, 212), знизилися показники фармакодинаміки, що відповідало зменшенню величини C_{max}, що спостерігається у цих тварин після введення другої дози. Жодна з тварин у четвертій групі (50 мкг/кг, в/в) не мала позитивного результату визначення ADA. ADA були специфічні відносно як ІЛ-2, так і фрагмента Fc, що можна було б очікувати через розходження за вісьмома амінокислотним залишкам між послідовністю ІЛ-2 яванських макак і ІЛ-2 людини (V91K, C125A). Нейтралізуючу активність ADA не досліджували.

Перелік послідовностей

<110> AMGEN INC.

<120> МУТЕЇНИ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 ДЛЯ ЕКСПАНСІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ Т-КЛІТИН

<130> A-1826-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/784,669

<151> 2013-03-14

<160> 38

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>

<221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val чи Ala

<400> 1

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

5

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

10

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

35

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 133

40

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

45

<221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val чи Ala

<400> 2

50

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

55

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

60

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

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 5
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 10 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 15 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 20 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 25
 <210> 3
 <211> 227
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 3
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 40 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 45 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 50 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 55 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 60 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

5 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

10 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

15 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

20 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

25 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

30 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

35 Pro Gly Lys
225

<210> 4
<211> 226
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

40 <400> 4
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

45 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

50 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

55 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

60 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

5 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

10 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

15 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

20 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

25 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

30 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

35 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

40 Pro Gly
 225

<210> 5
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

50 <400> 5
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

55 <210> 6
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 6
 Gly Gly Asn Gly Thr
 1 5
 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 10

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 15

<400> 7
 Tyr Gly Asn Gly Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 133
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 20

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид
 25

<400> 8
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 35

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

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 45

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 50

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 55

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 60

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

5 <210> 9
<211> 133
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 9
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
15 1 5 10 15

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

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

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

30 Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

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

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
40 100 105 110

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

45 Ile Ser Thr Leu Thr
130

50 <210> 10
<211> 133
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 10
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
60 1 5 10 15

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

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

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

20 Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

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

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

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

40 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

45 <210> 11
 <211> 133
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

55 <400> 11
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

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

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

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

75 Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu

Ile Ser Thr Leu Thr
130

5 <210> 13
<211> 133
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 13
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
15 1 5 10 15

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

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

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

30 Pro Leu Glu Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

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

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
40 100 105 110

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

45 Ile Ser Thr Leu Thr
130

50 <210> 14
<211> 133
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 14
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
60 1 5 10 15

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

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

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

20 Pro Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

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

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

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

40 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

45 <210> 15
 <211> 133
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

55 <400> 15
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

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

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

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

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

5 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

10 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

15 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

20 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

25 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

30 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

35 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

40 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

45 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

50 Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

55 Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

60 Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

65 Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

70 Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 17
 <211> 364
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 17
 10 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

15 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

20 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

25 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

30 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

35 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

40 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

45 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

50 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

55 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

60 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

5

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

10

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

15

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

20

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

25

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

30

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

35

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

40

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

45

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 18
 <211> 364
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

50

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

55

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

60

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

5 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

10 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

15 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

20 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

25 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

30 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

35 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

45 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

50 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

55 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

60 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

65 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

70 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

75 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300
 5

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320
 10

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335
 15

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350
 20

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360
 25

<210> 19
 <211> 364
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид
 <400> 19
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 35

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 40

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 50

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 55

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 60

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 60

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

115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 5 130 135 140

 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 10 145 150 155 160

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 15 165 170 175

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 20 195 200 205

 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 25 210 215 220

 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 30 225 230 235 240

 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

 35 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

 40 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

 Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 45 290 295 300

 Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
 50 305 310 315 320

 Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

 55 Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

 60 Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

355 360

5 <210> 20
 <211> 364
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 20
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

15 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

20 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

25 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

30 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

35 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

45 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

50 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

55 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

60 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

5 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

10 Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

15 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

20 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

25 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

30 Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

35 Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
 305 310 315 320

40 Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

45 Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

50 Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

55 <210> 21
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетична мітка 6xHis

<400> 21
 His His His His His His
 1 5

<210> 22
 <211> 42
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

5

<400> 22

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
20 25 30

15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
35 40

<210> 23

20

<211> 30

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

25

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 23

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25 30

35

<210> 24

<211> 29

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

40

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 24

45

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
1 5 10 15

50

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 25

55

<211> 28

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

60

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 25
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
 1 5 10 15

5
 Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

10 <210> 26
 <211> 27
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

15 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 26
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 20 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25
 25

<210> 27
 <211> 26
 <212> БІЛОК
 30 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

35 <400> 27
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

40 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 28
 45 <211> 25
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 28
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15

55
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

60

<210> 29
 <211> 24
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

 <400> 29
 10 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 1 5 10 15

 Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 15 20

 <210> 30
 <211> 23
 20 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 25
 <400> 30
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 30 Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20

 35 <210> 31
 <211> 29
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 40 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

 <400> 31
 45 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 50 20 25

 <210> 32
 <211> 28
 55 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 60 <400> 32

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

5 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

10 <210> 33
 <211> 24
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

15 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

20 <400> 33
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

25 <210> 34
 <211> 24
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

30 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

35 <400> 34
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser
 1 5 10 15

40 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

45 <210> 35
 <211> 28
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

55 <400> 35
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

60 Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 36

<211> 28
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 36
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

20 <210> 37
 <211> 28
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

25 <400> 37
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15

30 Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

35 <210> 38
 <211> 28
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

40 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 38
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15

45 Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Мутеїн інтерлейкіну-2 людини (ІЛ-2), що містить заміну V91K і амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 1, при цьому зазначений мутеїн ІЛ-2 переважно стимулює регуляторні Т-клітини порівняно з іншими клітинами.

2. Мутеїн ІЛ-2 людини за п. 1, який **відрізняється** тим, що вказаний мутеїн містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній у SEQ ID NO: 1.

3. Мутеїн ІЛ-2 людини за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що вказаний мутеїн містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 1.

4. Мутеїн ІЛ-2 людини за пп. 1, 2 або 3, який **відрізняється** тим, що амінокислота в позиції 125 є або аланіном, або цистеїном.
5. Fc-злитий білок, що містить фрагмент Fc і мутеїн ІЛ-2 людини за будь-яким з пп. 1-4.
- 5 6. Fc-злитий білок за п. 5, який **відрізняється** тим, що зазначений фрагмент Fc являє собою фрагмент Fc IgG1 людини.
7. Fc-злитий білок за п. 6, який **відрізняється** тим, що зазначений фрагмент Fc IgG1 людини містить одну або більше мутацій, що змінюють ефекторну функцію зазначеного фрагмента Fc.
8. Fc-злитий білок за п. 7, який **відрізняється** тим, що зазначений IgG1 людини містить заміну в позиції N297.
- 10 9. Fc-злитий білок за п. 8, який **відрізняється** тим, що зазначена заміна в позиції N297 являє собою N297G.
10. Fc-злитий білок за будь-яким з пп. 6-9, що містить заміну або делецію С-кінцевого лізину в зазначеному фрагменті Fc IgG людини.
11. Fc-злитий білок за п. 10, який **відрізняється** тим, що зазначений С-кінцевий лізин зазначеного фрагмента Fc IgG людини видалений.
- 15 12. Fc-злитий білок за будь-яким з пп. 5-11, який **відрізняється** тим, що фрагмент Fc і мутеїн ІЛ-2 людини з'єднані в зазначеному білку за допомогою лінкеру.
13. Fc-злитий білок за п. 12, який **відрізняється** тим, що зазначений лінкер являє собою GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7).
- 20 14. Fc-злитий білок за будь-яким з пп. 5-13, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 додатково містить вставки, заміни або делеції амінокислотних залишків, що змінюють характер глікозилювання зазначеного Fc-злитого білка при його експресії в клітинах ссавців.
15. Fc-злитий білок за п. 14, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3.
- 25 16. Fc-злитий білок за п. 15, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3N або Т3А.
17. Fc-злитий білок за п. 16, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 містить заміну Т3N.
18. Fc-злитий білок за п. 17, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5.
- 30 19. Fc-злитий білок за п. 18, який **відрізняється** тим, що зазначений мутеїн ІЛ-2 додатково містить мутацію S5T.
20. Fc-злитий білок за будь-яким з пп. 5-19, який **відрізняється** тим, що зазначений Fc-злитий білок містить димер Fc.
- 35 21. Fc-злитий білок за п. 20, який **відрізняється** тим, що зазначений Fc-злитий білок містить два мутеїни ІЛ-2.
22. Fc-злитий білок за п. 20, який **відрізняється** тим, що зазначений Fc-злитий білок містить один мутеїн ІЛ-2.
23. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує мутеїн ІЛ-2 людини за будь-яким з пп. 1-4.
- 40 24. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує Fc-злитий білок за будь-яким з пп. 5-22.
25. Вектор експресії, що містить виділену нуклеїнову кислоту за пп. 23 або 24, функціонально зв'язану з промотором.
26. Клітина-хазяїн, що містить виділену нуклеїнову кислоту за будь-яким з пп. 23-25.
- 45 27. Клітина-хазяїн за п. 26, в якій виділена нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з промотором.
28. Клітина-хазяїн за п. 26 або 27, де зазначена клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину.
29. Клітина-хазяїн за п. 28, де зазначена клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*.
30. Клітина-хазяїн за п. 26 або 27, де зазначена клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину.
- 50 31. Клітина-хазяїн за п. 30, де зазначена клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця.
32. Клітина-хазяїн за п. 31, де зазначена клітина-хазяїн являє собою лінію клітин яєчника китайського хом'ячка (СНО).
33. Спосіб отримання мутеїну ІЛ-2 людини, що включає культивування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 26-32 в умовах, що забезпечують експресію зазначеного промотору, і відбирання мутеїну ІЛ-2 людини із зазначеної культури.
- 55 34. Спосіб отримання Fc-злитого білка, що включає культивування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 26-32 в умовах, що забезпечують експресію зазначеного промотору, і відбирання Fc-злитого білка із зазначеної культури.

35. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин в контакт з ефективною кількістю мутеїну ІЛ-2 людини за будь-яким з пп. 1-4.
- 5 36. Спосіб за п. 35, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- клітин збільшується.
37. Спосіб за п. 36, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.
38. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин в
10 контакт з ефективною кількістю Fc-злитого білка за будь-яким з пп. 5-22.
39. Спосіб за п. 38, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- клітин збільшується.
40. Спосіб за п. 39, який **відрізняється** тим, що співвідношення CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3-клітин збільшується щонайменше на 50 %.
- 15 41. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну ІЛ-2 людини за будь-яким з пп. 1-4.
42. Спосіб за п. 41, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- клітин збільшується.
- 20 43. Спосіб за п. 42, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- збільшується щонайменше на 50 %.
44. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-злитого білка за будь-яким з пп. 5-22.
- 25 45. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- збільшується.
46. Спосіб за п. 45, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3+ FoxP3- клітин збільшується щонайменше на 50 %.
- 30 47. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості природних клітин-кілерів (NK-клітин) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну ІЛ-2 людини за будь-яким з пп. 1-4.
48. Спосіб за п. 47, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується.
- 35 49. Спосіб за п. 48, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується щонайменше на 50 %.
50. Спосіб збільшення співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості природних клітин-кілерів (NK) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-злитого білка за будь-яким з пп. 5-22.
- 40 51. Спосіб за п. 50, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD 16, збільшується.
52. Спосіб за п. 51, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості CD3+ FoxP3+ клітин до кількості CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, збільшується щонайменше на 50 %.
- 45 53. Спосіб лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання, що включає введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості мутеїну ІЛ-2 за будь-яким з пп. 1-4.
54. Спосіб лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання, що включає введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості Fc-злитого білка за будь-яким з пп. 5-22.
- 50 55. Спосіб лікування суб'єкта, що має запальне або аутоімунне захворювання за п. 53 або 54, який **відрізняється** тим, що введення викликає зменшення щонайменше одного симптому зазначеного захворювання.
- 55 56. Спосіб за п. 55, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта збільшується після введення.
57. Спосіб за п. 55, який **відрізняється** тим, що співвідношення кількості регуляторних Т-клітин (T_{per}) до кількості нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта залишається, по суті, незмінним після введення.

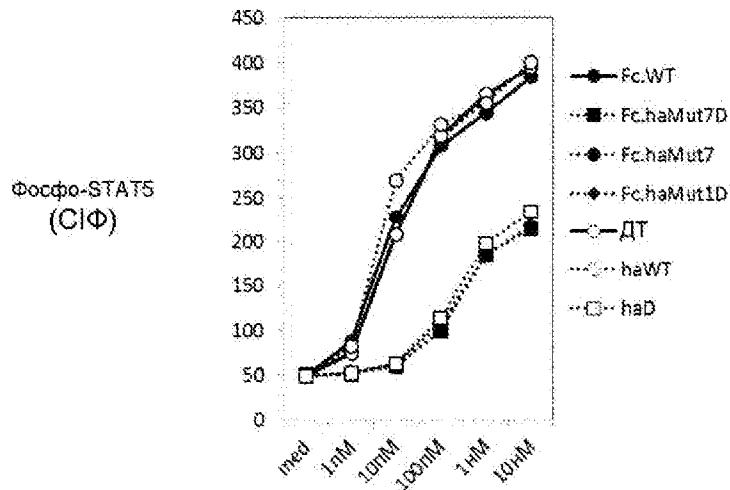
58. Спосіб за будь-яким з пп. 53-57, який **відрізняється** тим, що зазначене запальне або аутоімунне захворювання являє собою вовчак, реакцію "трансплантат проти хазяїна", васкуліт, індукований гепатитом С, цукровий діабет I типу, розсіяний склероз, спонтанний викидень, атонічне захворювання або запальні захворювання кишечника.

5 59. Спосіб контролю відповіді суб'єкта на лікування мутеїном інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) людини за п. 1, що включає детектування у зазначеного суб'єкта зміни, причому зазначена зміна являє собою:

- a) підвищення температури тіла,
- b) збільшення концентрації С-реактивного білка в периферичній крові зазначеного суб'єкта,
- 10 c) зниження кількості тромбоцитів у периферичній крові зазначеного суб'єкта,
- d) зниження кількості нейтрофілів у периферичній крові зазначеного суб'єкта або
- e) зменшення концентрації альбуміну в периферичній крові зазначеного суб'єкта, при цьому після детектування зазначеної зміни зазначене лікування припиняють, призупиняють, зменшують частоту дозування або знижують кількість введеного препарату.

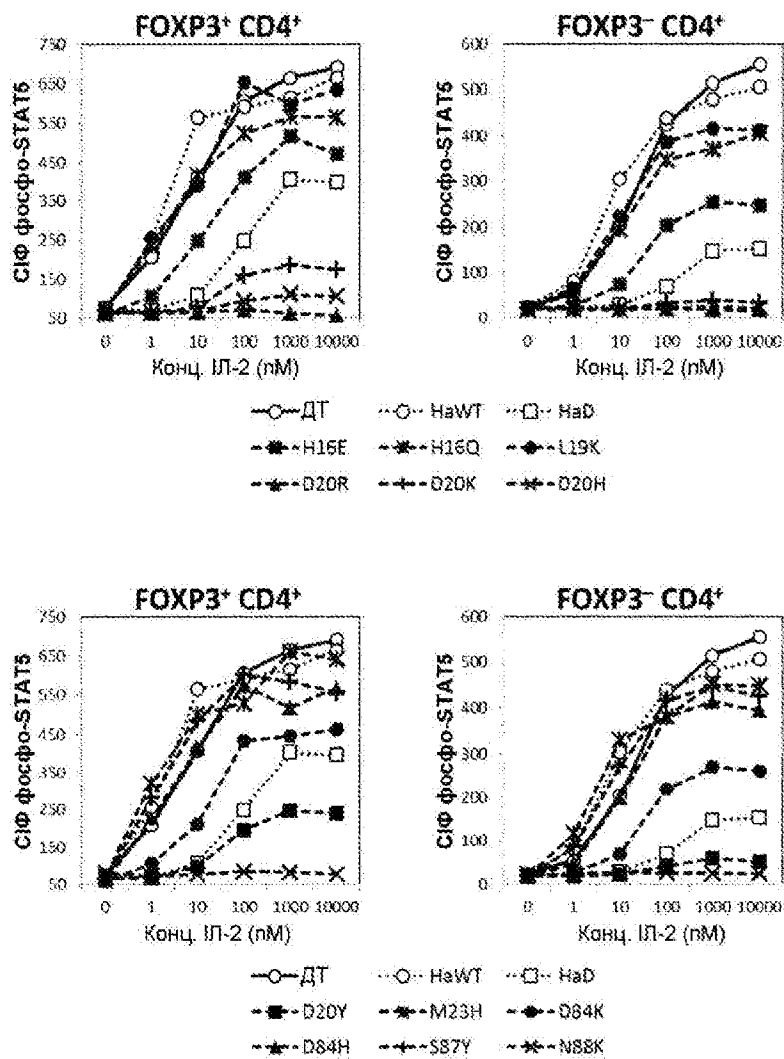
15 60. Спосіб за п. 59, який **відрізняється** тим, що зазначена зміна включає:

- a) підвищення температури тіла щонайменше на 0,5 °С,
- b) збільшення концентрації СРБ у периферичній крові зазначеного суб'єкта щонайменше на 0,2 мг/мл,
- 20 c) зниження кількості тромбоцитів у периферичній крові зазначеного суб'єкта щонайменше в 0,8 разів,
- d) зниження кількості нейтрофілів у периферичній крові зазначеного суб'єкта щонайменше в 0,8 разу або
- e) зменшення концентрації альбуміну в периферичній крові зазначеного суб'єкта щонайменше в 0,4 разу.

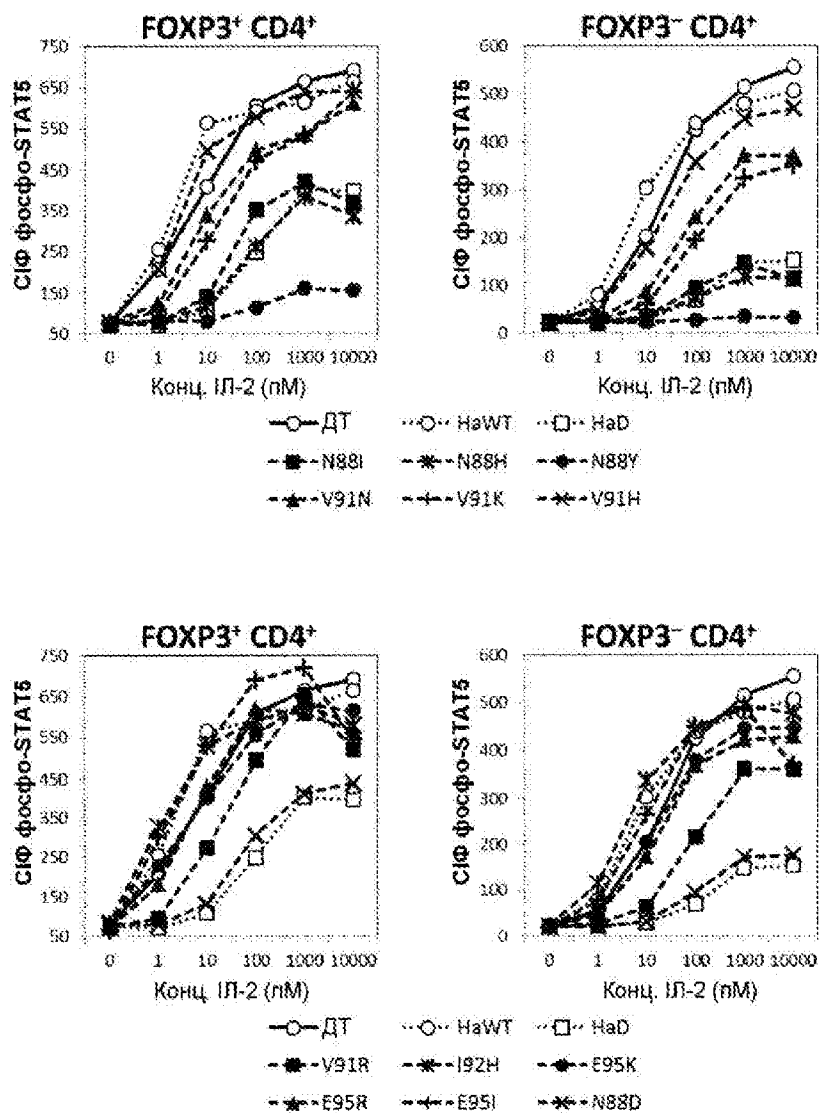


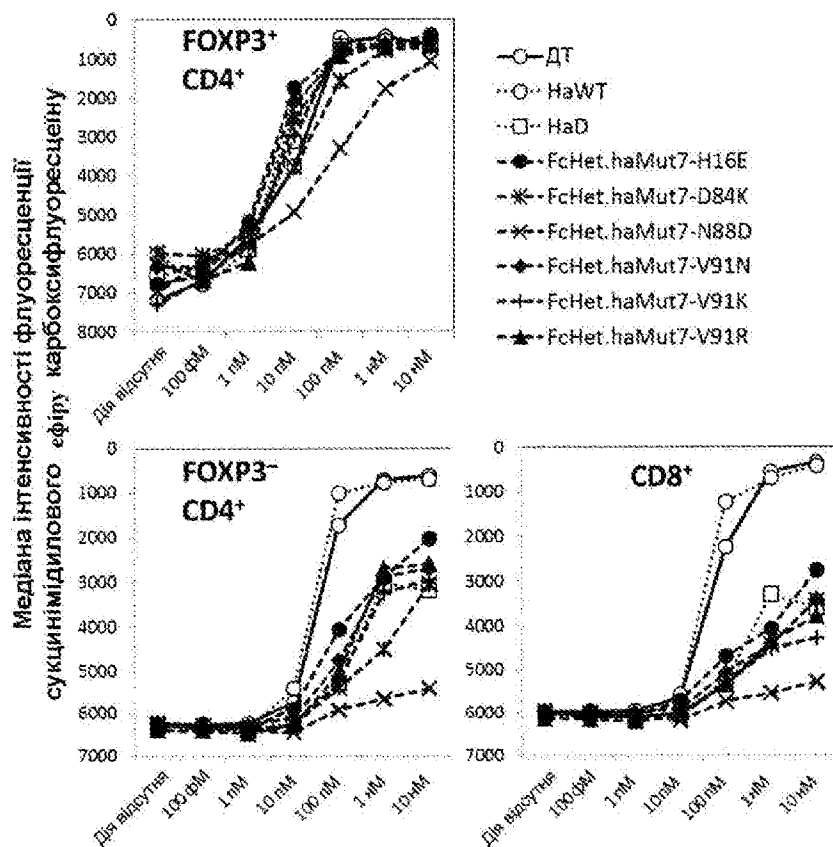
ФІГ. 1

ФІГ. 2А

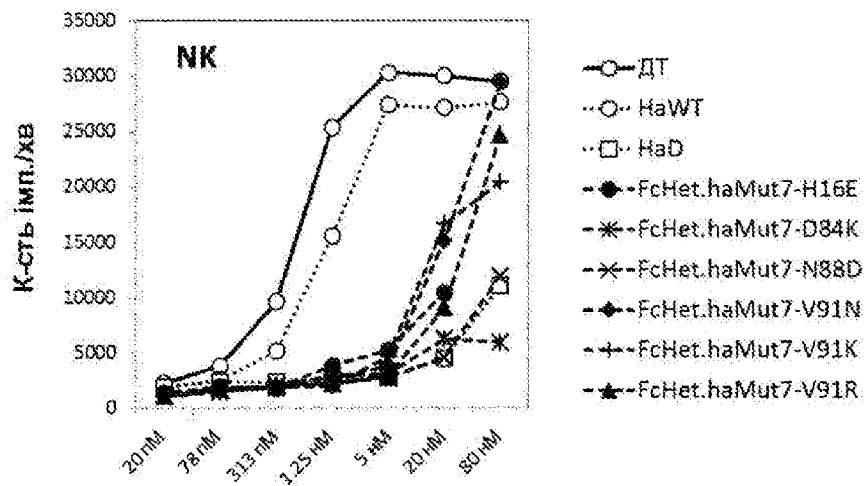


ФІГ. 2В

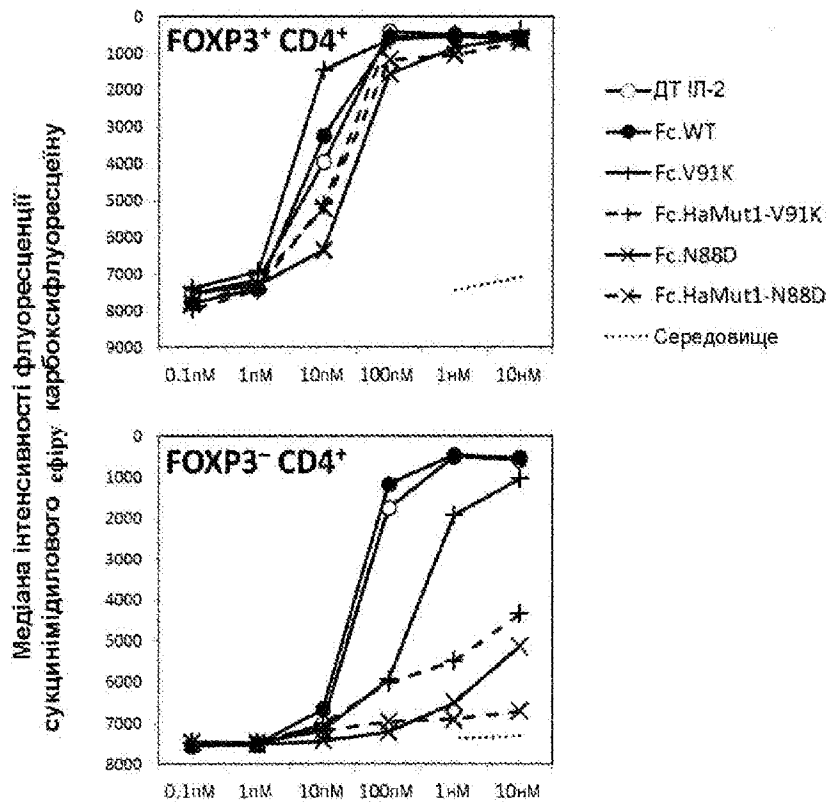




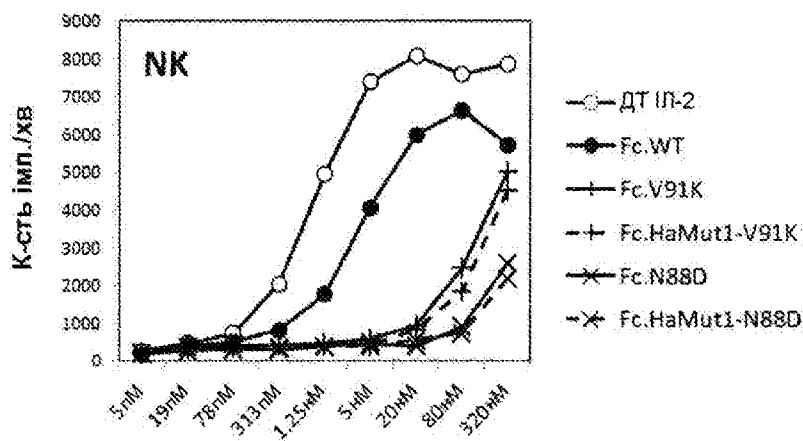
ФІГ. 3



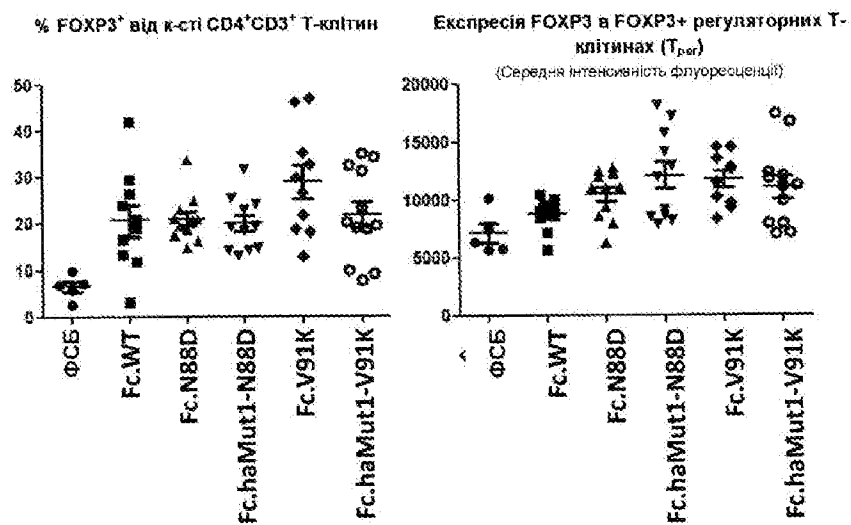
ФІГ. 4



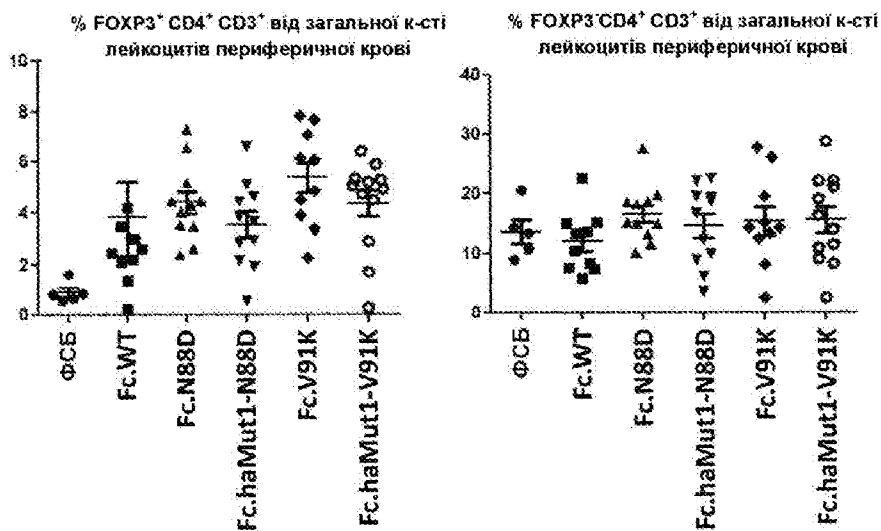
ФІГ. 5



ФІГ. 6



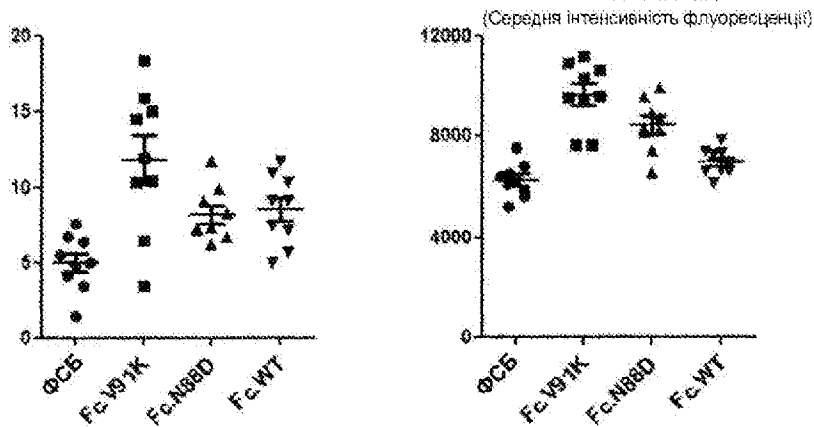
ФІГ. 7А



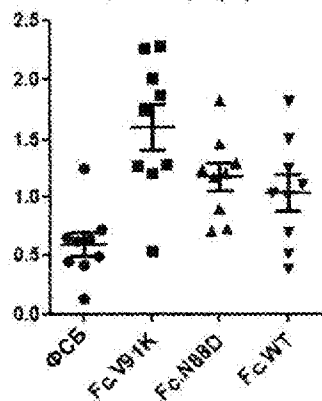
ФІГ. 7В

ФІГ. 8

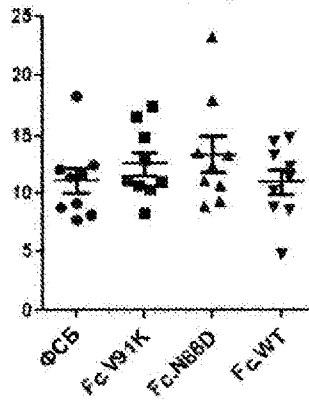
% FOXP3⁺ від к-сті CD4⁺CD3⁺ T-клітин Експресія FOXP3 в FOXP3+ регуляторних T-клітинах (T_{reg})



% FOXP3⁺CD4⁺CD3⁺ від загальної к-сті лейкоцитів периферичної крові

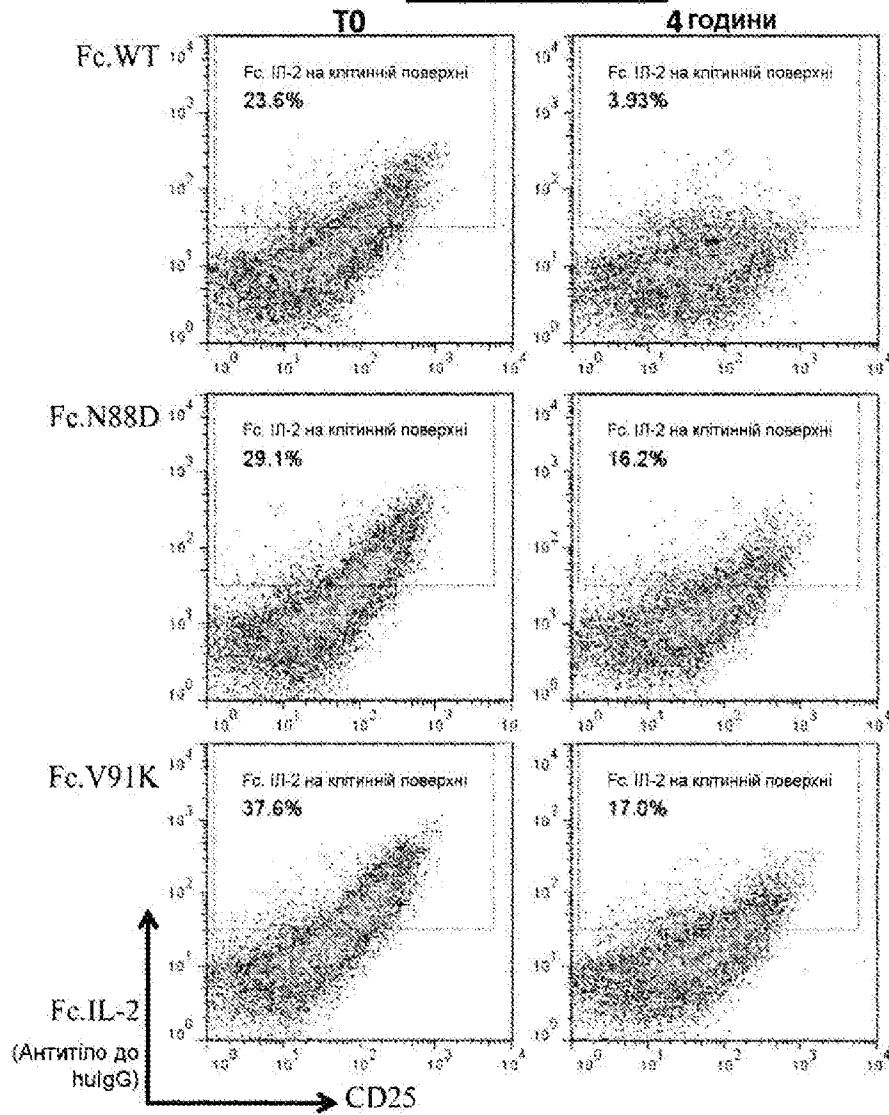


% FOXP3⁺CD4⁺CD3⁺ від загальної к-сті лейкоцитів периферичної крові

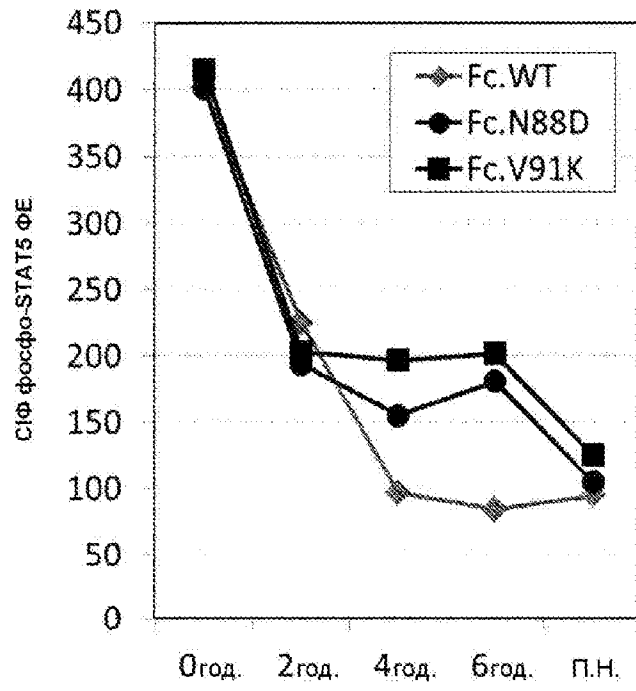


ФІГ. 9А

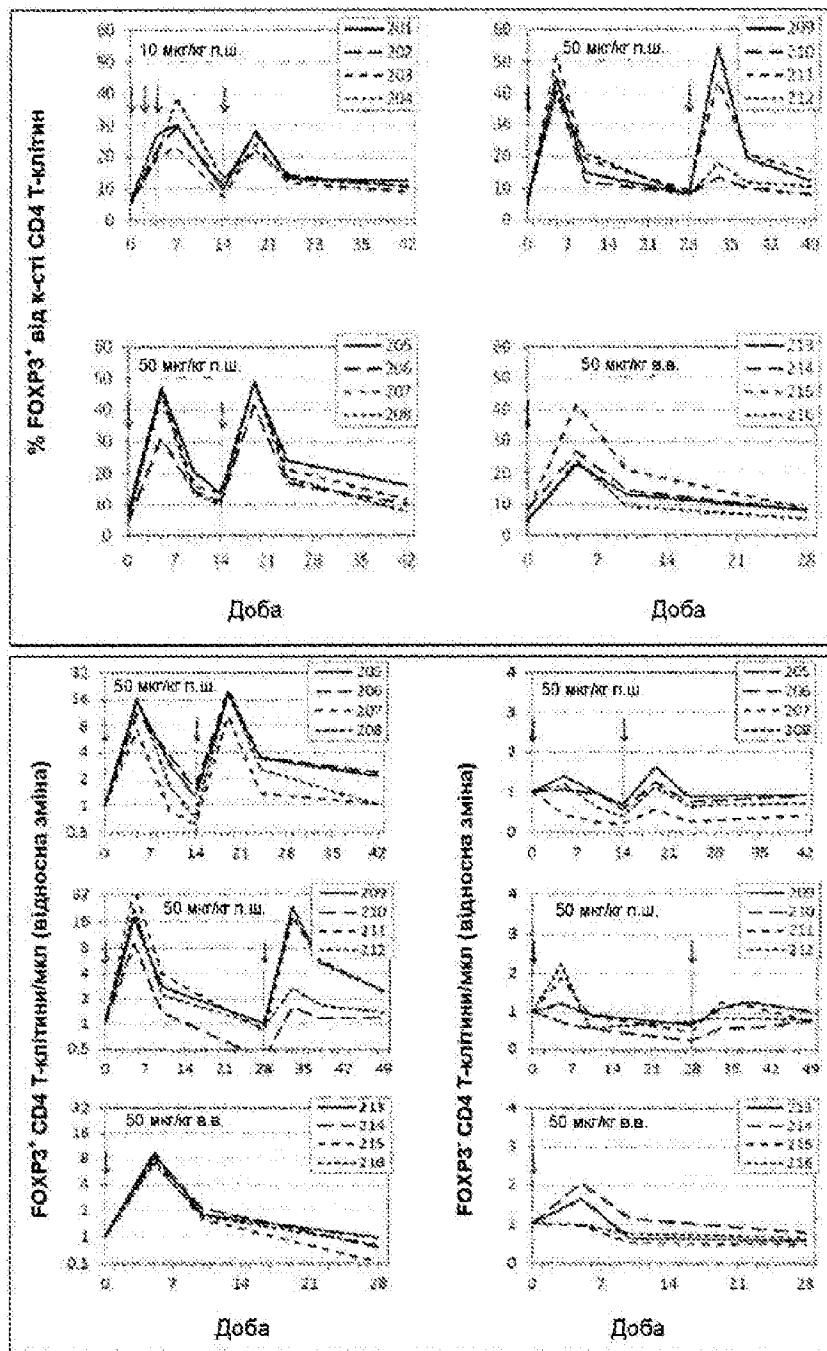
Селекція CD3+ CD4+



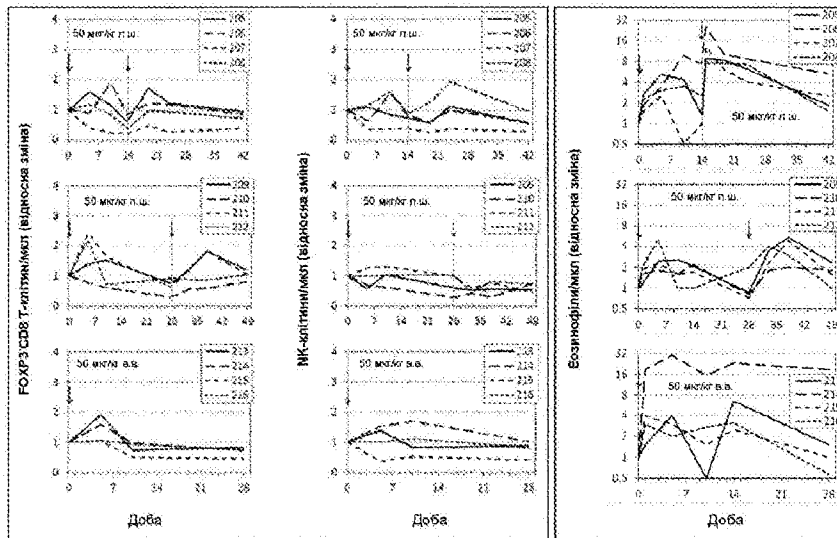
Фиг. 9В



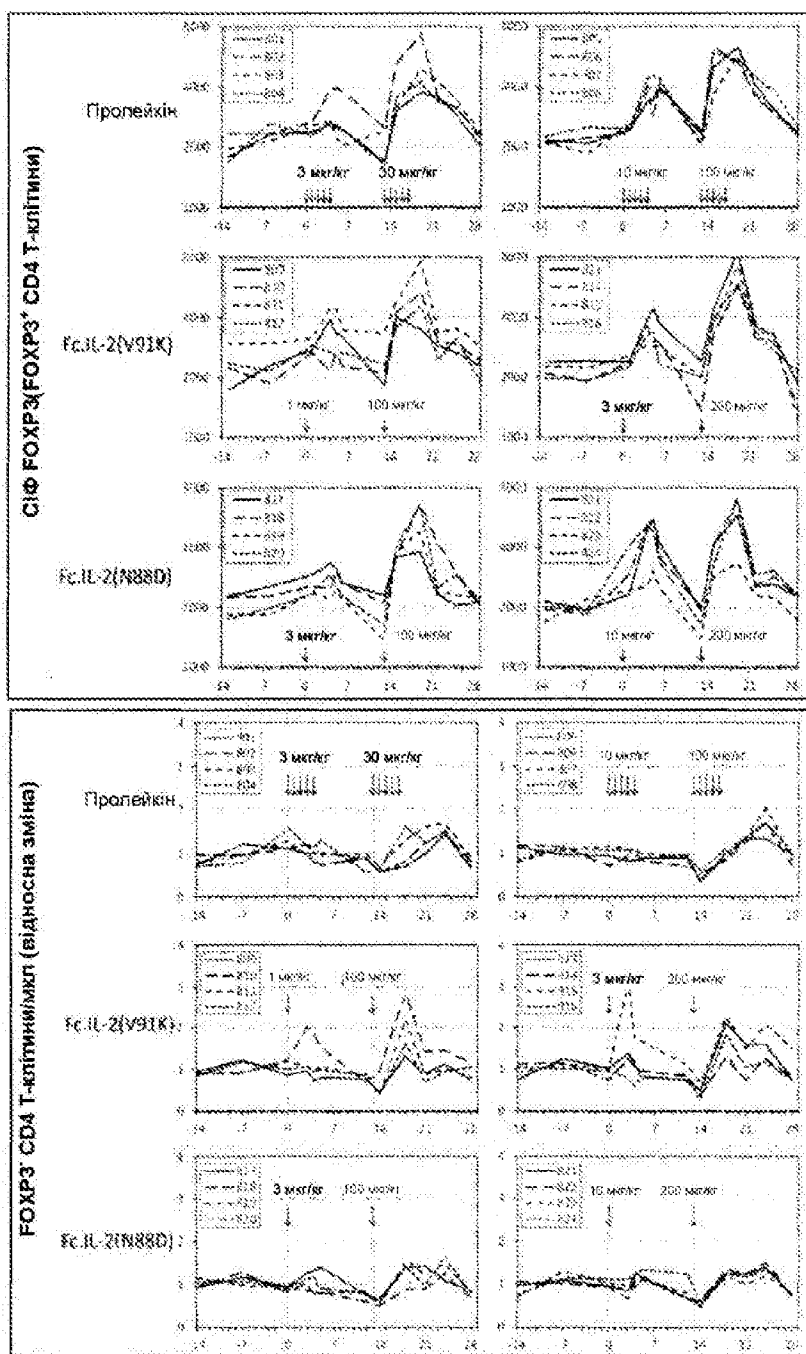
ФІГ. 10А



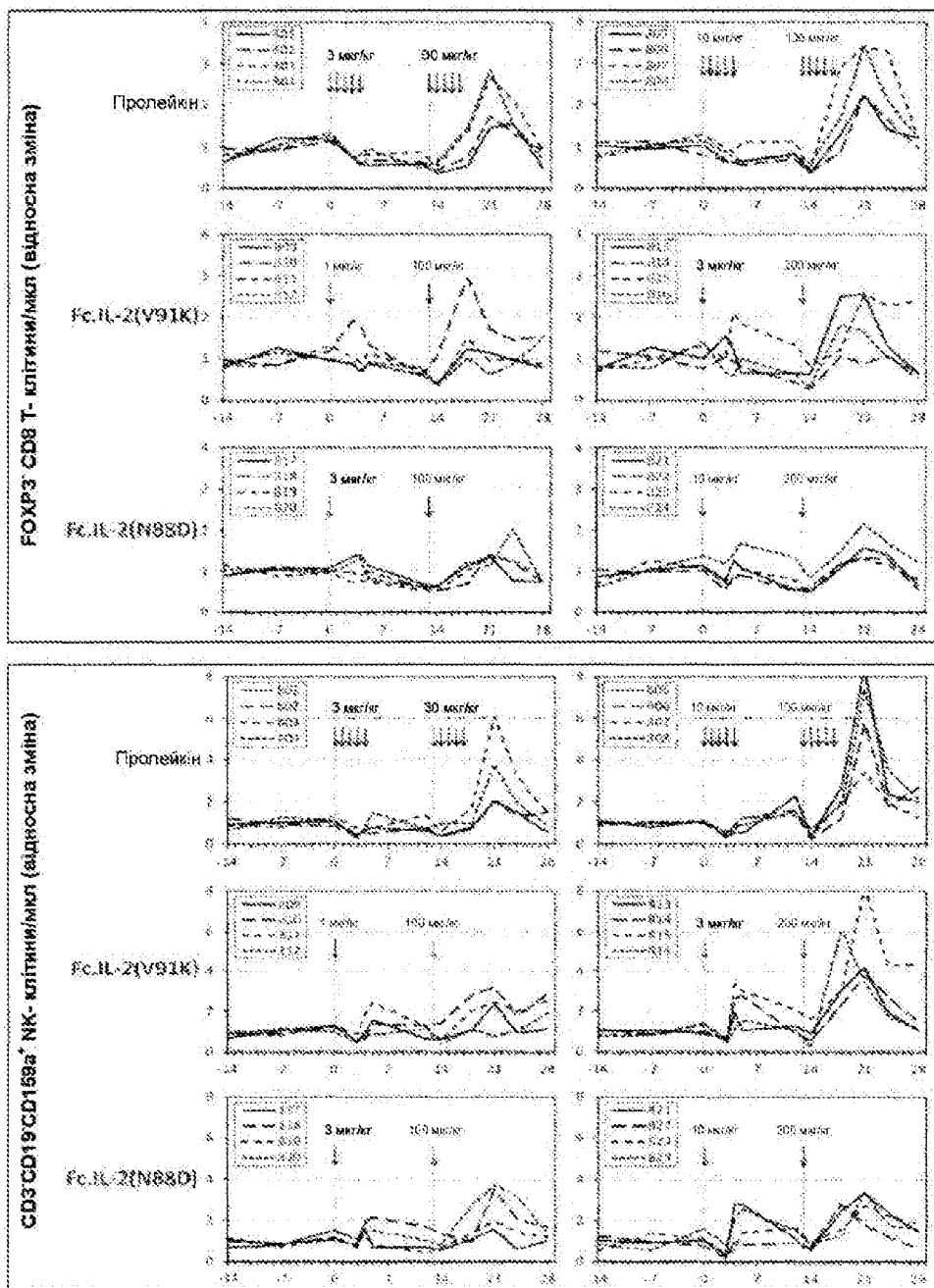
ФІГ. 10В



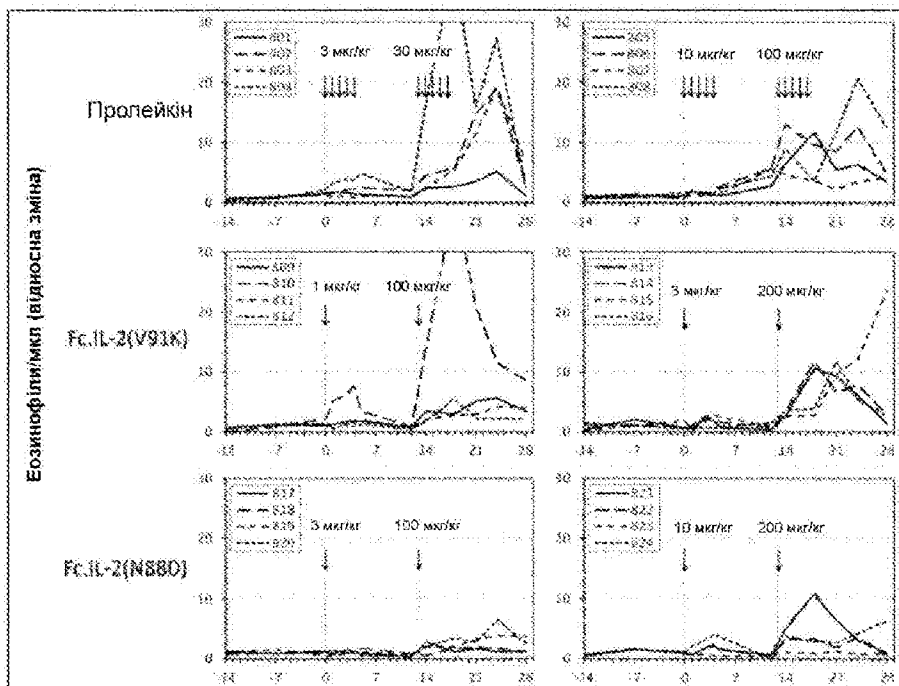
ФІГ. 11В



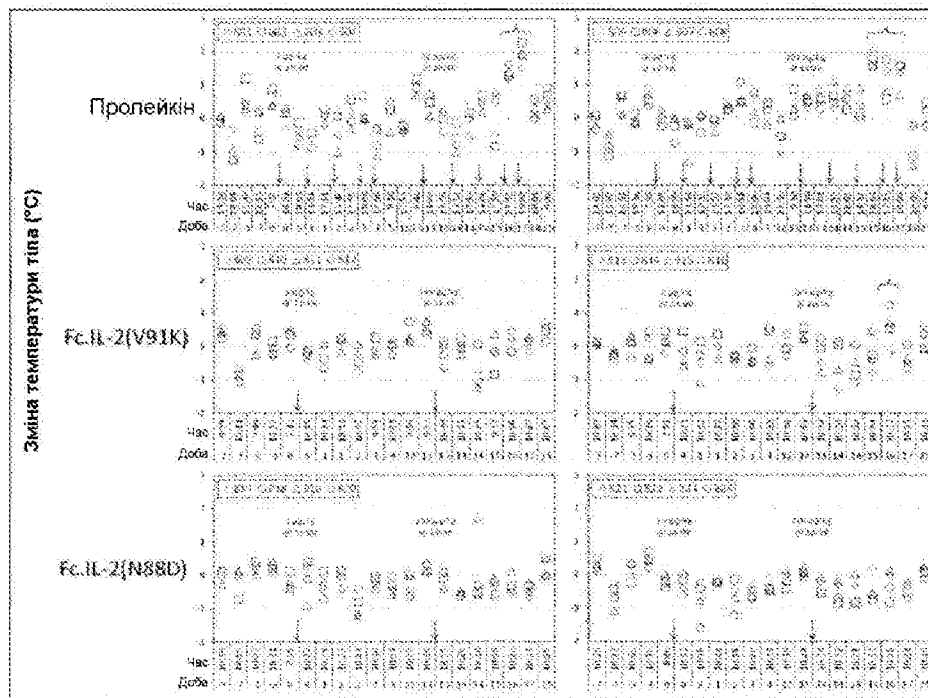
ФІГ. 11С



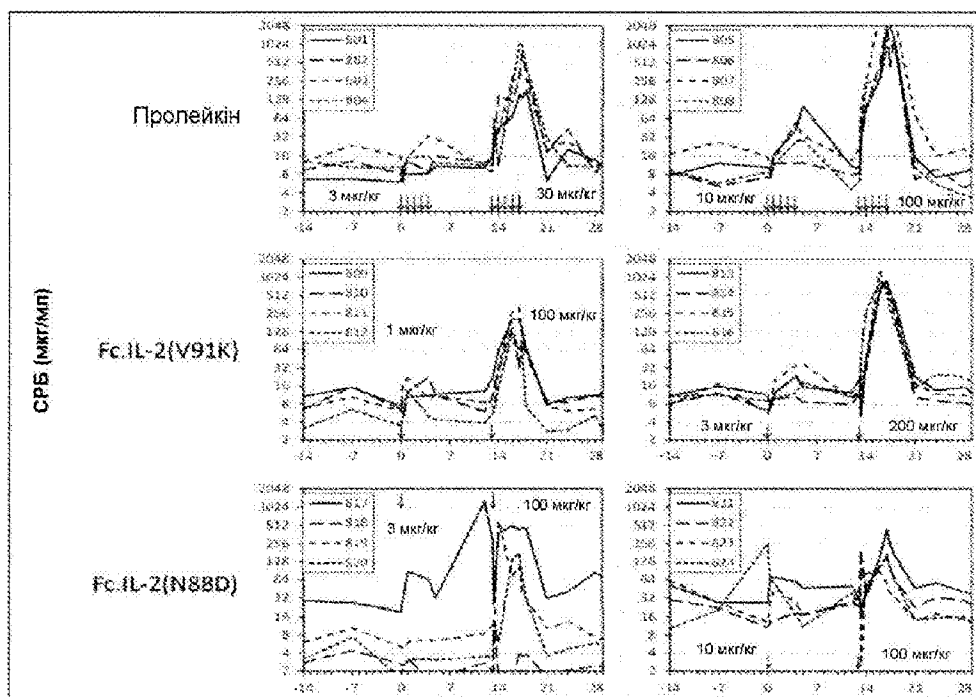
ФІГ. 11D



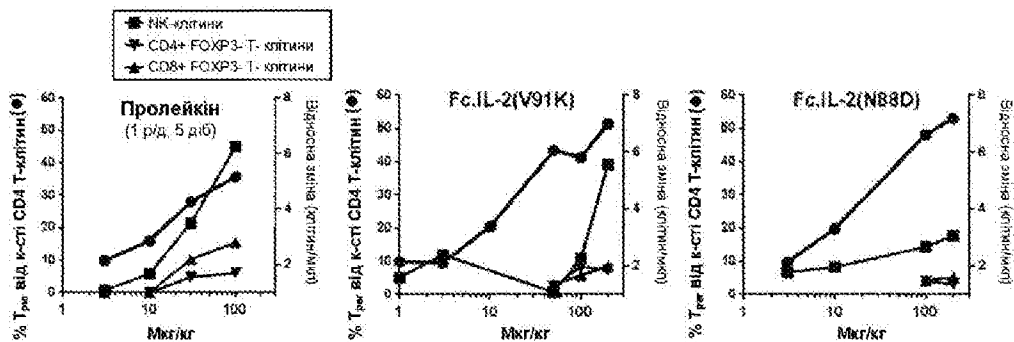
ФІГ. 11E



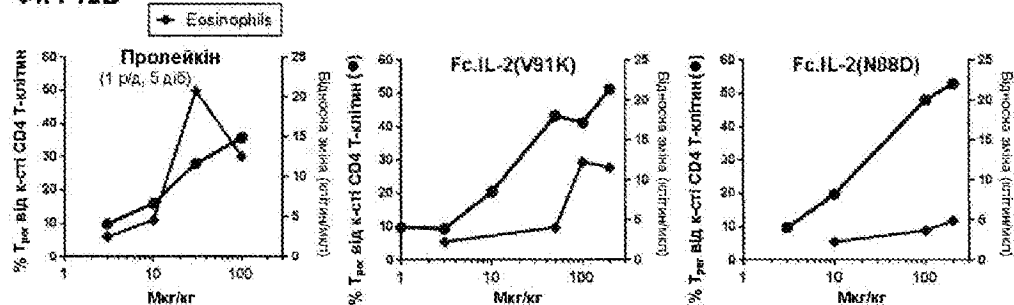
Фіг.11F



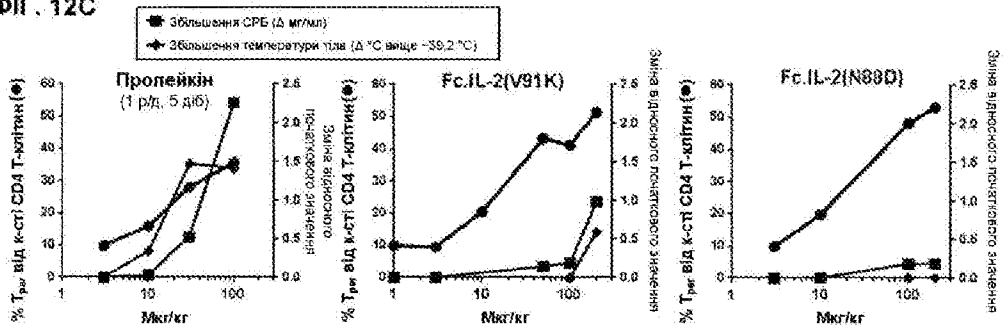
ФІГ. 12А



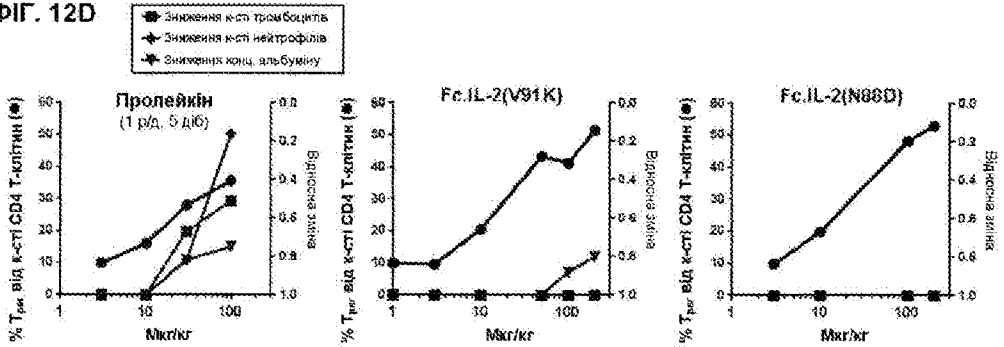
ФІГ. 12В



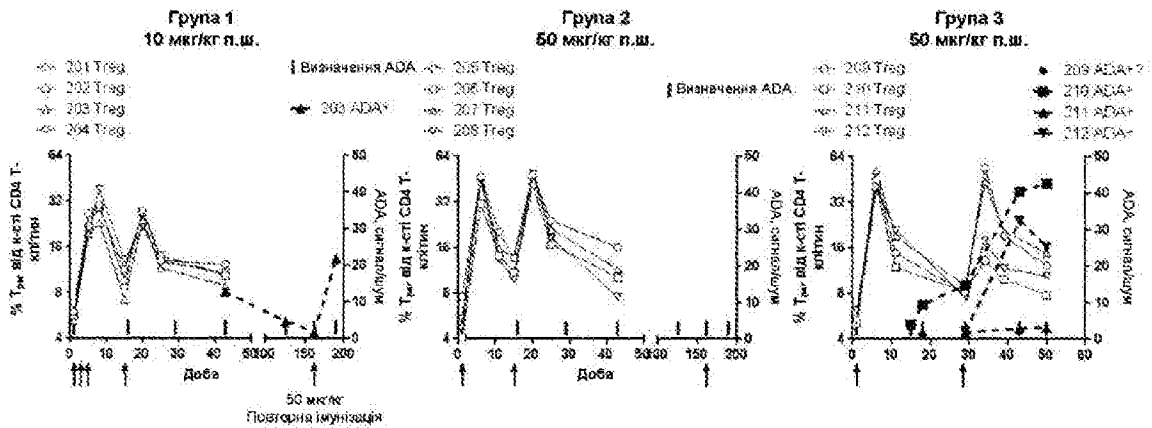
ФІГ. 12С



ФІГ. 12D



ФІГ. 13



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601