

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043757**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.20**

**(21)** Номер заявки  
**201991093**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.11.10**

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

**(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЕЙ СЕКРЕЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕГО БЕЛКОВ**

**(31)** **2016-0171**

**(32)** **2016.11.15**

**(33)** **CU**

**(43)** **2019.09.30**

**(86)** **PCT/CU2017/050007**

**(87)** **WO 2018/091003 2018.05.24**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА  
МОЛЕКУЛАР (CU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Рохас Дорантес Хертрудис, Леон  
Монсон Калет, Карменате Портилла  
Таня (CU)**

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

**(56)** SAUVE K. ET AL.: "LOCALIZATION IN HUMAN INTERLEUKIN 2 OF THE BINDING SITE TO THE ALPHA CHAIN (P55) OF THE INTERLEUKIN 2 RECEPTOR", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 88, no. 11, 1 de enero de 1991 (1991-01-01), páginas 4636-4640, XP002317471, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.88.11.4636, resumen, resultados, Tabla 1, p. 4637, col. 2 par. 2, p. 4636, col. 2, par. 3, resultados p. 4639, col 2, par. 2; referenda #19 p4636, col. 2, par. 2, todo el documento

WO-A2-2005086798

ULRICH WEIGEL ET AL.: "Mutant proteins of human interleukin 2. Renaturation yield, proliferative activity and receptor binding", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 180, no. 2, 15 de marzo de 1989 (1989-03-15), páginas 295-300, XP055443620, GB ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14647.x, todo el documento, tabla 1

VISPO N. S. ET AL.: "Displaying human interleukin-2 on the surface of bacteriophage", IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 3, no. 3, 1 de octubre de 1997 (1997-10-01), páginas 185-193, XP004097002, ISSN: 1380-2933, DOI: 10.1016/51380-2933(97)00012-2, resumen, página 190; página 188, col. 1, par. 2; figura 2

ROBBENS J. ET AL.: "Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in Escherichia coli through a single amino acid change at the cleavage site", PROCESS BIOCHEMISTRY, ELSEVIER LTD, GB, vol. 41, no. 6, 28 de febrero de 2006 (2006-02-28), páginas 1343-1346, XP027984161, ISSN: 1359-5113 [recuperado el 2006-06-01], resumen, todo el documento

WO-A2-2005007121

CHA H. J. ET AL.: "Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems", BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 24, no. 3, 1 de abril de 2005 (2005-04-01), páginas 225-233, XP025371281, ISSN: 1369-703X [recuperado el 2005-07-01], mencionado en la solicitud, todo el documento, tabla 1

**(57)** Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу, основанному на введении одиночной мутации в гены, кодирующие человеческий ИЛ-2 и полученные из него мутеины, что приводит к увеличению уровня секреции у разных хозяев, не оказывая влияния на их биологические функции. В частности, эти мутации основаны на неконсервативной замене аминокислоты в положении 35 в первичной последовательности человеческого ИЛ-2; предпочтительно замены представляют собой K35E, K35D и K35Q. Другим объектом настоящего изобретения являются системы экспрессии, используемые для получения как рекомбинантного человеческого ИЛ-2, так и полученных из него мутеинов, способом, описанным в настоящем изобретении. Вышеупомянутый способ можно использовать для повышения эффективности продуцирования рекомбинантного человеческого ИЛ-2 и полученных из него мутеинов как в масштабе лаборатории, так и в промышленных масштабах. Белки, полученные этим способом, могут быть использованы в терапевтических целях, а также для размножения Т-клеток in vitro для терапии адоптивного переноса.

**043757 B1**

**043757 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу введения мутаций в ген интерлейкина-2 (IL-2), которые приводят к увеличению уровней секреции указанной молекулы и полученного из нее семейства иммуномодулирующих мутеинов, не затрагивая их биологические функции.

### Уровень техники

IL-2, изначально описанный как фактор роста T-клеток (Smith, *KA Immunol. Rev.* 51:337-357, 1980), впоследствии оказался регулятором с двойными функциями в иммунном ответе (Malek, *TR Annu. Rev. Immunol.* 26:453-479, 2008; Hoyer *KK et al., Immunol. Rev.* 226:19-28, 2008), который может стимулировать или осуществлять негативную модуляцию эффекторных функций иммунной системы. В настоящее время считается, что его основная роль связана с поддержанием иммунологической толерантности (Malek, *TR & Bayer, AL Nat. Rev. Immunol.* 4:665-674, 2004) путем стимуляции регуляторных T-клеток, которые конститутивно экспрессируют высокие уровни альфа-цепи рецептора IL-2. Хотя бета- и гамма-субъединицы образуют димерный рецептор, обладающий промежуточным средством, конститутивно присутствующий в эффекторных клетках иммунной системы, постоянное наличие высоких уровней альфа-цепи обеспечивает регуляторные T-клетки высокоаффинным тримерным рецептором, который позволяет этой клеточной популяции преимущественно использовать цитокин (Malek, *T.R. & Castro, I. Immunity.* 33: 153-165, 2010).

Функциональную дихотомию IL-2 использовали для получения противоположных терапевтических эффектов на иммунную систему и модулирования нужного иммунного ответа в различных ситуациях. Его иммунопотенцирующую способность использовали для стимуляции противоопухолевых реакций (Klapper, *J.A. et al., Cancer.* 113:293-301, 2008). С другой стороны, способность IL-2 стимулировать преимущественно T-регуляторные клетки использовали путем применения низких доз, недостаточных для стимуляции эффекторных T-клеток или получения токсических эффектов, для контроля аутоиммунных нарушений (Hartemann *A. et al, Lancet Diabetes Endocrinol.* 1:295-305, 2013) и воспалительных заболеваний (Saadoun *D. et al., N. Engl. J. Med.* 365:2067-2077, 2011), а также заболеваний "трансплантат против хозяина" (Koreth, *A. et al., N. Engl. J. Med.* 365:2055-2066, 2011).

В качестве способа получения мутеинов с разными иммуномодулирующими свойствами была предложена сегрегация взаимодействий IL-2 путем введения мутаций в различные участки связывания с субъединицами рецептора. Избирательное нарушение участка связывания альфа-цепи посредством направленного мутагенеза позволило получить молекулу, называемую не-альфа, которая имеет пониженную способность стимулировать регуляторные T-клетки, но при этом сохраняет свое агонистическое действие на эффекторные клетки, несущие бета/гамма-димерный рецептор (Carmenate *T. et al., J. Immunol.* 190:6230-6238, 2013; US 9206243 B2). Эта молекула демонстрирует сильный противоопухолевый эффект у мышей. С другой стороны, нарушение посредством мутагенеза участков связывания IL-2 с бета- и/или гамма-субъединицами может генерировать антагонисты рецептора IL-2, которые селективно модулируют стимуляцию различных популяций клеток (Shanafelt, *AB et al., Nat. Biotechnol.* 18:1197-1202, 2000; WO 2011/063770). Примерами молекул этого типа являются мутеины M1 и M2, описанные в патенте США 8759486 B2.

В дополнение к мутеинам, потерявшим свою способность к взаимодействию, были описаны мутированные варианты IL-2, обладающие свойствами суперагониста, обусловленными увеличением их способности связываться с той или иной субъединицей рецептора. Увеличение сродства к бета-субъединице приводит к продуцированию молекул, обеспечивающих мощную стимуляцию эффекторных клеток и обладающих сильным противоопухолевым эффектом (Levin, *AM et al., Nature.* 484:529-533, 2012). С другой стороны, повышенное сродство IL-2 к альфа-субъединице рецептора привело к появлению других вариантов суперагонистов с превосходной способностью стимулировать пролиферативный ответ T-клеток *in vitro* (WO 2005/007121).

Описанные выше полученные из IL-2 мутеины получали путем рационального конструирования, скрининга *in silico* и направленной эволюции IL-2, отображаемой на поверхности дрожжевых клеток. Хотя и было получено отображение биологически активного IL-2 на нитевидных фагах (Buchli, *PJ и др., Arch. Biochem. Biophys.* 339:79-84, 1997; Vispo, *NS и др., Immunotechnology* 3: 185-193, 1997), эта технологическая платформа еще не использовалась для отбора новых вариантов цитокинов с модифицированными свойствами.

Помимо иммуномодулирующих свойств IL-2 и полученных из него мутеинов, важным элементом для их терапевтического использования является разработка систем, обеспечивающих их получение в достаточных количествах, в частности в масштабе лаборатории и в промышленном масштабе, или путем трансфекции или трансдукции нормальных и/или опухолевых клеток или тканей.

Основным способом рекомбинантного продуцирования IL-2 и других родственных молекул является экспрессия в цитоплазме *E.coli*, в которой образуются тельца включения, с последующими процедурами ренатурации *in vitro* (Devos *R. et al., Nucl. Acids Res.* 11:4307-4323, 1983; Weir, *MP & Sparks, J., Biochem. J.* 245: 85-91, 1987). Несмотря на уже продемонстрированную полезность этой стратегии продолжается изучение других систем экспрессии, которые сразу приводят к получению правильно свернутых

молекул, очень похожих на природный IL-2. Секреция IL-2 в некоторых из этих систем экспрессии ограничена тенденцией IL-2 к агрегации (Halfmann G. et al., J. Gen. Microbiol. 139:2465-2473, 1993; Cha, HJ et al., Biochem. Eng. J. 24: 225-233, 2005).

Авторами настоящего изобретения неожиданно было найдено несколько мутаций, которые не были описаны ранее или получение которых невозможно предсказать, исходя из анализа кристаллической структуры человеческого IL-2, но введение которых увеличивает способность различных типов клеток секретировать рекомбинантный человеческий IL-2 и многочисленные мутеины, полученные из IL-2, обладающие специфическими иммуномодулирующими свойствами. Это открытие дает основу для использования этих мутаций в промышленном масштабе.

#### **Краткое описание изобретения**

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу, который обеспечивает увеличение уровней секреции рекомбинантного человеческого IL-2 у разных хозяев, не оказывая влияния на их биологические функции. Указанный способ основан на введении уникальных мутаций в гены, кодирующие человеческий IL-2 и другие полученные из него полипептиды, которые включают, без ограничения, полученные из человеческого IL-2 мутеины, сконструированные таким образом, чтобы они действовали в качестве антагонистов, суперагонистов или селективных агонистов. Уровни секреции указанных белков, получаемых способами по настоящему изобретению, превышают по меньшей мере в три раза уровни секреции немутантных аналогов. В настоящем изобретении производные мутеины относятся к мутеинам, которые имеют более 90% идентичности с человеческим IL-2.

Способ по настоящему изобретению относится к мутациям, которые приводят к неконсервативной замене аминокислоты в положении 35 первичной последовательности белка (Lys в исходной последовательности), предпочтительно заменам K35E, K35D и K35Q.

В частности, настоящее изобретение относится к белкам, полученным описанным в настоящей заявке способом, выбранным из группы, содержащей SEQ ID NO: 1-18.

Объектом настоящего изобретения также являются генетические конструкции, которые включают описанные выше мутированные гены, слитые с другими нуклеотидными последовательностями, кодирующими синтез слитых белков, которые образованы IL-2 или другими полученными из него иммуномодулирующими полипептидами и дополнительными последовательностями белков. Дополнительные последовательности белков включают, без ограничения, капсидные белки нитевидных фагов, альбумин, Fc-область антител, цельные антитела или фрагменты антител, которые включают вариабельные домены.

В конкретном варианте осуществления хозяева, которые используются для получения описанных выше молекул, включают, без ограничения, клетки E.coli, дрожжей и млекопитающих, такие как, помимо прочего, HEK-293, CHO, NSO. Способ по настоящему изобретению можно использовать для повышения эффективности продуцирования IL-2 и других полученных из IL-2 полипептидов как в масштабе лаборатории, так и в промышленном масштабе. Белки, полученные способом по настоящему изобретению, можно использовать в терапевтических целях.

В другом варианте осуществления задачей настоящего изобретения является как *in vitro*, так и *in vivo* модификация физиологии нормальных и опухолевых клеток и/или тканей через экспрессию человеческого IL-2 и/или семейства иммуномодулирующих мутеинов, полученных из него (отдельно или слитых с другими белками). Примером является трансдукция Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов или НК-клеток для терапии adoptивного переноса; или прямая трансдукция/трансфекция опухолевой ткани. В этих случаях, способ по настоящему изобретению можно использовать для увеличения секреции представляющих интерес молекул.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу, который обеспечивает повышенные уровни секреции рекомбинантного человеческого IL-2 у разных хозяев, не оказывая влияние на их биологические функции. Указанный способ основан на введении уникальных мутаций в гены, кодирующие человеческий IL-2 и другие полученные из него полипептиды, которые включают, без ограничения, полученные из человеческого IL-2 мутеины, сконструированные таким образом, чтобы они действовали в качестве антагонистов, суперагонистов или селективных агонистов.

Идентификация мутаций, увеличивающих способность белков, получаемых из человеческого IL-2, отображаться на нитевидных фагах.

Полипептиды, полученные из человеческого IL-2, с уникальными мутациями, которые приводят к увеличению их уровней отображения на нитевидных фагах, могут быть выбраны из библиотек, состоящих из более чем  $10^8$  молекул, презентированных на нитевидных фагах. Гены, соответствующие указанным полипептидам, могут быть вставлены в векторы экспрессии фагемидного типа (слитые с одним из генов, кодирующих капсидные белки нитевидного фага) и использованы для получения вирусных частиц, которые отображают на своей поверхности варианты белка. Исходные библиотеки могут включать разные степени диверсификации всей последовательности или в наборе заранее определенных положений. Каждый из первичных остатков в этих положениях может быть заменен смесью из 20 аминокислот или подмножеством выбранных остатков. Диверсификация может быть достигнута путем случайного или сайт-направленного мутагенеза.

Отбор фагов с повышенными уровнями экспрессии человеческого IL-2 может быть осуществлен путем инкубации смеси фагов из библиотек вместе с молекулой-селектором, иммобилизованной на твердой поверхности, удалении несвязанных фагов путем промывки и элюции связанных фагов в условиях, которые предотвращают взаимодействия между белками. В качестве молекулы-селектора можно использовать одну из субъединиц рецептора рекомбинантного IL-2 или моноклональное антитело, направленное против IL-2 или пептида, генетически слитого с ним. В аналогичных условиях может быть выполнено несколько последовательных циклов отбора. Анализ последовательностей ДНК, встроенных в выбранные фagemиды, может выявить закономерности, позволяющие идентифицировать более распространенные замены, потенциально связанные с увеличением способности отображаться на фагах.

Уровни отображения мутированных вариантов IL-2 можно оценить с помощью анализов связывания, таких как ELISA, на иммобилизованной молекуле захвата, не селективно распознающей различные мутантные варианты IL-2 и нативный эталон. В качестве молекулы захвата для этого типа анализов предпочтительным является антитело против маркерной пептидной последовательности, генетически слитой с вариантами IL-2, такой как пептид с-тус, слитой со всеми чужеродными белками в системе экспрессии на основе фagemидного вектора rCSM. Общность эффектов мутаций, выявленных при скрининге, описанном выше, в семействе полученных из IL-2 мутеинов можно продемонстрировать путем введения указанных замен в последовательности разных мутированных вариантов, описанных для человеческого IL-2, которые включают разное количество замен различной природы, с целью селективного воздействия на взаимодействия с различными субъединицами рецептора IL-2 с последующей модификацией их иммуномодулирующих функций. Все эти модифицированные мутеины отображают на нитевидных фагах путем вставки кодирующих их генов в фagemидные векторы. Оценка уровней отображения каждого мутеина на нитевидных фагах может быть выполнена методом ELISA, как описано для IL-2. В качестве эталона для расчета степени увеличения отображения на фаге, ассоциированной с введением замен, идентифицированных как часть настоящего изобретения, используются исходные мутеины без каких-либо дополнительных замен и их отображение на фагах. Альтернативно, способ по настоящему изобретению может быть осуществлен путем использования других платформ комбинаторной биологии, таких как отображение на клетках дрожжей или млекопитающих, для выбора вариантов IL-2 и/или полученных из него мутеинов с повышенными уровнями презентации на клеточной мембране.

В ходе описанного выше процесса отбора в положении 35 могут возникать повторяющиеся неконсервативные мутации (в частности, K35E, K35D и K35Q).

Использование идентифицированных мутаций для увеличения уровней секреции человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов в виде растворимых белков и их ренатурация из телец включений.

После идентификации группы мутаций, которые приводят к увеличенному отображению на нитевидных фагах человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов можно продемонстрировать влияние этих же замен на секрецию растворимых белков путем введения их в соответствующие кодирующие гены, клонированные в растворимые векторы экспрессии для клеток дрожжей или млекопитающих. Оценка концентраций белков, секретлируемых в супернатант клетками-хозяевами, содержащими указанные векторы экспрессии, позволяет продемонстрировать увеличение уровня секреции IL-2 и полученных из него мутеинов, ассоциированное с введением мутаций, которые используются в способе по настоящему изобретению, по сравнению с оригинальными аналогами, которые не включают указанные замены.

Альтернативно, увеличение продуцирования человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов следует оценивать по трансфекции и/или трансдукции нормальных и/или опухолевых клеток и/или тканей *in vivo* или *in vitro*.

Описанные выше исследования, в которых используется способ по настоящему изобретению, можно проводить, используя IL-2 и полученные из него мутеины в виде отдельных молекул или слитых с дополнительными полипептидными последовательностями, такими как альбумин, Fc-область иммуноглобулинов человека, цельные антитела или фрагменты антитела, полученные на основе его вариативных областей.

Мутации, описанные в настоящем изобретении, также могут быть использованы для улучшения процессов ренатурации *in vitro* человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов, сформированных в виде телец включения в цитоплазме *E.coli*. Увеличение эффективности ренатурации можно оценить путем вычисления удельной биологической активности на массу белка относительно немутированного варианта.

Демонстрация совместимости используемых мутаций с биологическими функциями IL-2 и селективной модуляцией его взаимодействий с субъединицами рецептора.

Оценка биологической активности вариантов IL-2, модифицированных способом по настоящему изобретению, может включать методы *in vitro* и *in vivo* с целью подтверждения сохранения их способности индуцировать пролиферацию, дифференцировку и активацию различных типов клеток, таких как субпопуляции Т-лимфоцитов, НК-клетки и клеточные линии лимфоидного происхождения, рост которых зависит от IL-2. Влияние нативного IL-2 на пролиферацию Т-лимфоцитов, экспрессирующих тримерный рецептор, можно определить с помощью анализа пролиферации клеточной линии CTLL-2 *in vitro*, используя колориметрический метод восстановления красителя аламарский голубой или метод про-

точной цитометрии. Влияние *in vitro* нативного IL-2 на дифференцировку Т CD4+ лимфоцитов в Т регуляторные лимфоциты и способность этих молекул размножаться и активировать NK-клетки *in vitro* определяют методом проточной цитометрии.

Совместимость мутаций, используемых в способе по настоящему изобретению, с селективной модуляцией взаимодействия IL-2 с его рецептором может быть подтверждена путем введения указанных замен в структуру мутеинов, ранее созданных и/или выбранных для увеличения или уменьшения их способности связываться с любой из субъединиц рецептора IL-2. Наличие требуемых изменений в свойствах связывания можно продемонстрировать путем непосредственного определения таких замен в экспериментах ELISA на микротитрационных планшетах, покрытых каждой из субъединиц рецептора. Ранее описанные анализы, используемые для характеристики иммуномодулирующей и/или противоопухолевой активности различных мутеинов *in vitro* и *in vivo*, можно использовать в качестве дополнительных инструментов проверки. В случае не-альфа мутеина (Carmenate, Т. у otros, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013) можно подтвердить, что он сохраняет способность стимулировать пролиферацию *in vitro* Т CD8+ лимфоцитов на том же уровне, что и нативный IL-2. В случае мутеина с повышенной способностью связываться с бета-субъединицей рецептора, обладающего суперагонистической активностью (супер-бета-мутеин), можно подтвердить, что он поддерживает более высокую способность стимулировать пролиферацию NK-клеток *in vitro*, чем нативный IL-2. В обоих случаях пролиферация может быть определена методом проточной цитометрии. Дифференциальное влияние на пролиферацию популяций *in vivo* можно определить в экспериментах по включению бромдезоксипуридина. Можно продемонстрировать, что в экспериментальной модели метастазирования, в которой используется линия меланомы MB16F0, оба мутеина вызывают более сильный противоопухолевый эффект *in vivo*, чем нативный IL-2.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Оценка уровней отображения на фаге мутированного IL-2 методом ELISA. Все препараты фага доводили до эквивалентной концентрации  $10^{13}$  вирусных частиц/мл.

Фиг. 2. Оценка методом ELISA уровней секреции слитых белков, образованных либо IL-2, либо полученными из него мутеинами и Fc-областью человеческого IgG1. Клетки трансфицировали полиэтиленгликолином и генетическими конструкциями, кодирующими слитые белки, которые содержали:

- a) IL-2 с мутацией K35E и без нее;
- b) не-альфа IL-2 (NA) с и без дополнительной мутации K35E;
- c) супер-бета IL-2 (SB) с и без K35E;
- d) не-гамма M1 IL-2 (NG M1) с и без K35E;
- e) не-гамма M2 IL-2 (NG M2) с и без K35E.

Фиг. 3. Сохранение молекулярных взаимодействий нативного IL-2 в варианте K35E (ELISA).

Фиг. 4. Сохранение биологической активности IL-2 с заменой K35E в анализе пролиферации CTLL-2.

Фиг. 5. Способность IL-2 с K35E увеличивать IL-2-зависимые клеточные популяции *in vivo*;

5a - фотография селезенки мышей, которым инъецировали вариант IL-2 с K35E и PBS;

5b - гистограммы проточной цитометрии популяции клеток памяти с фенотипом CD3+CD8+ (CD44hi) в селезенке.

Фиг. 6. Совместимость замены K35E с потерей способности связываться с альфа-субъединицей рецептора IL-2, уже описанной для мутеина, полученного из IL-2 (ELISA). Микротитрационные планшеты покрывали альфа-субъединицей человека (a) и мыши (b).

Фиг. 7. Совместимость замены K35E с улучшенной способностью связываться с бета-субъединицей рецептора IL-2, уже описанной для мутеина, полученного из IL-2 (ELISA).

#### Примеры

Пример 1. Отбор и характеристика нитевидных фагов, отображающих функциональный мутированный человеческий IL-2.

Создавали библиотеку с мягкой рандомизацией, нацеленную на несколько положений в человеческом IL-2. Выбранные положения включали положения, имеющие остатки с боковыми цепями, задействованными в участке связывания альфа-субъединицы рецептора (K35, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, Q74 и Y107). Диверсификацию человеческого IL-2 выполняли, используя мутагенез по Кункелю с мутагенными олигонуклеотидами, содержащими смесь оснований в каждом положении-мишени (spiked), с 85% сохранением исходного нуклеотида в каждом положении-мишени плюс 15% эквимольной смеси оставшихся трех нуклеотидов для достижения общей умеренной степени разнообразия в выбранной области. Таким образом, полученная библиотека, состоящая из  $10^9$  клонов, содержала в целом 20 аминокислот в каждом положении участка связывания, при этом каждая молекула в библиотеке имела только несколько замен, что ограничивало поиск новых полипептидов до пространства функциональных последовательностей, более близких к исходной молекуле. Библиотечные фаги очищали осаждением полиэтиленгликолем, используя хорошо известные процедуры (Marks, J. et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Очищенные вирусные частицы инкубировали в иммунотрубках (Nunc, Denmark), покрытых рекомбинантной альфа субъединицей рецептора IL-2 (R&D), что позволило выделить функциональные мутированные варианты IL-2 благодаря их способности отображаться на фагах. Две независимые процедуры пэннинга выполняли на субъединицах рецептора IL-2 человека и мыши.

После вымывания несвязанных фагов связанные фаги элюировали путем добавления щелочного раствора триэтиламина. Бактерии TG1 инфицировали выбранными фагами, которые амплифицировали, используя хелперный фаг M13KO7, и которые использовали в качестве исходного материала для нового цикла отбора. Выполняли четыре цикла отбора фагов. Секвенирование вставок в выбранных фагемидах (из третьего и четвертого циклов отбора) выявило сходство в полученных мутированных вариантах. Несмотря на преобладание исходного не мутированного гена IL-2 (широко представленного в исходной библиотеке), присутствовала небольшая доля вариантов, имеющих замены K35E, K35D и K35Q, что свидетельствует о влиянии неконсервативных замен в положении 35 на отображение функционального IL-2 на нитевидных фагах. K35E была самой частой заменой. Это открытие оказалось неожиданным, так как анализ кристаллической структуры комплекса IL-2/рецептор (коды PDB 2B5I и 2ERJ) указывает на участие оригинального остатка K35 в ионных взаимодействиях в полярной периферической области участка связывания альфа-субъединицы. Таким образом, способность неконсервативных замен (инверсия заряда в двух случаях) сохранять взаимодействие с молекулой-селектором оказалось неожиданной.

Пример 2. Увеличение секреции и отображения на фагах человеческого IL-2 с неконсервативными заменами в положении 35

Сравнивали способность разных вариантов IL-2, выбранных из библиотеки, секретироваться в периплазму *E.coli* и отображаться на фагах. Нативный IL-2 использовали в качестве эталонной молекулы. Мутагенезом по Кункелю также был сконструирован K35R-содержащий вариант (консервативная замена в положении 35), который использовали в качестве дополнительного контроля. Все белки получали путем вставки кодирующих их генов в фагемидный вектор pCSM (слитый с геном 3 M13) и последующего продуцирования фага из бактерий TG1, трансформированных полученными генетическими конструкциями (Rojas, G. et al., *Immunobiology*. 218:105-113, 2013). Уровни отображения каждого варианта на фагах оценивали методом ELISA на микротитрационных планшетах, покрытых моноклональным антителом 9E10. Связанные фаги детектировали, используя анти-M13 антитело, связанное с пероксидазой хрена. Было показано, что замены K35E, K35D и K35Q приводят к увеличению уровня отображения человеческого IL-2 по сравнению с исходной молекулой (фиг. 1). Это увеличение было 10-кратным в случае замен K35E и K35D с инверсией заряда и 7-кратным в случае замены K35Q. С другой стороны, консервативная замена K35R не оказывала влияния на способность IL-2 отображаться (фиг. 1). Для дальнейших исследований была выбрана замена K35E.

Пример 3. Изучение влияния замены K35E на секрецию и отображение на фагах на панели мутированных вариантов IL-2

K35E вводили в гены нескольких мутированных вариантов человеческого IL-2 (в формате отображения на фагах) мутагенезом по Кункелю. Панель включала четыре уже описанных мутеина для осуществления различных иммуномодулирующих функций: один неальфа мутеин с селективной агонистической функцией в отношении эффекторных Т-клеток (Carmenate, T. et al., *J. Immunol.* 190:6230-6238, 2013; US 9,206,243 B2), один антагонистичный мутеин, который теряет способность связываться с гамма субъединицей рецептора IL-2 (не-гамма) (US 8,759,486 B2), и два суперагонистичных мутеина с повышенной способностью связываться либо с бета (супер-бета), либо с альфа (супер-альфа) субъединицей рецептора IL-2 (Levin AM и др., *Nature*. 484:529-533, 2012; WO 2005/007121). Фаги, отображающие каждый из этих белков, получали и очищали (вместе с исходными молекулами без K35E), и уровни отображения чужеродных белков оценивали методом ELISA на микротитрационных планшетах, покрытых моноклональным антителом 9E10. Препарат фага, отображающего нативный IL-2, использовали в качестве эталона (при условии наличия в нем 100 произвольных единиц/мл) для построения стандартной кривой для расчета относительных уровней отображения для каждого варианта. В табл. 1 показано увеличение уровня отображения для каждого мутеина, ассоциированного с введением K35E.

Таблица 1. Увеличение уровней отображения тестируемых мутеинов, ассоциированных с введением замены K35E

Мутеин	Увеличение относительных уровней отображения на фагах, ассоциированное с введением K35E
не-альфа	6x
не-гамма M1	29x
супер-бета H9	18x
супер-альфа	14x

Пример 4. Замена K35 усиливает секрецию клетками-хозяевами человека слитых белков на основе IL-2 и полученных из него мутеинов

Создавали генетические конструкции для слияния генов человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов с геном Fc-области человеческого IgG1 в контексте вектора экспрессии pCMX. Также готовили дополнительную панель эквивалентных конструкций, имеющих мутацию K35E. НЕК 293 Т-клетки (адаптированные для выращивания в суспензии) трансфицировали каждой из вышеописанных генетиче-

ских конструкций, смешанных соответствующим образом с полиэтиленгликолем. Объем трансфекции составлял 50 мл.

Супернатанты из трансфицированных клеток собирали через шесть дней культивирования. Присутствие IL-2-производных рекомбинантных белков оценивали методом ELISA на микротитрационных планшетах, покрытых моноклональным антителом к IL-2.2 (направленным против линейного эпитопа, присутствующего на всех мутеинах). Захваченные слитые белки детектировали с помощью антитела против человеческого Fc, связанного с пероксидазой хрена. Уровни слитых белков в супернатантах были выше для тех молекул, которые содержали замену K35E, по сравнению с их исходными аналогами (фиг. 2а-е). Такие рекомбинантные белки очищали методом аффинной хроматографии с белком А. В табл. 2 показаны выходы после очистки.

Таблица 2. Выходы после очистки IL-2 и полученных из него мутеинов, слитых с Fc-областью иммуноглобулинов человека, из НЕК 293 Т-клеток, трансфицированных в суспензии

Молекула	Исходный вариант	Вариант K35E	K35E-ассоциированное увеличение
IL-2/Fc	0,28 мг	4,24 мг	15x
Не-альфа/Fc	0,16 мг	1,44 мг	9x
Супер-альфа/Fc	1,72 мг	5,08 мг	3x
Супер-бета/Fc	0,04 мг	1,08 мг	27x
Не-гамма M1/Fc	0,04 мг	0,24 мг	6x
Не-гамма M2/Fc	0,04 мг	0,2 мг	5x

Пример 5. Замена K35E является совместимой с молекулярными взаимодействиями нативного IL-2

Связывающую способность рекомбинантного мутированного IL-2 (K35E) в формате гомодимера, слитого с Fc-областью человека, оценивали методом ELISA на микротитрационных планшетах, покрытых разными молекулами, о которых известно, что они взаимодействуют с нативным IL-2. Панель молекул покрытия включала четыре моноклональных антитела, распознающих разные эпитопы на IL-2, а также альфа-субъединицу рецептора IL-2 (человеческого или мышинного происхождения). Захваченный слитый белок детектировали с помощью антитела против человеческого Fc, связанного с пероксидазой хрена. Аналогичный слитый гомодимер, включающий немутированный IL-2, продуцируемый в той же системе экспрессии, использовали в качестве контроля. Присутствие K35E не влияло на связывание мутированного гомодимера как с антителами, так и с рецепторами, напротив, оно вызывало противоположный эффект. Реакционная способность мутированного варианта по отношению ко всем молекулам покрытия была выше, чем у его немутированного рекомбинантного аналога (фиг. 3), что указывает на то, что антигенность и функциональность варианта K35E являются более близкой к таковым нативного IL-2, чем немутированного рекомбинантного белка, полученного в аналогичных условиях.

Пример 6. K35E в Fc-слитых IL-2 сохраняет способность стимулировать пролиферацию клеток CTLL-2

Оценивали способность мутированного IL-2 (K35E) в формате Fc-слитого гомодимера (очищенного из НЕК 293 Т-клеток, трансфицированных в суспензии) индуцировать пролиферацию CTLL-2. Рекомбинантный человеческий IL-2 использовали в качестве контроля. Клетки выращивали в присутствии разных концентраций обоих белков и пролиферацию измеряли, используя колориметрический анализ восстановления красителя аламарский голубой (фиг. 4). Удельную активность рассчитывали в каждом случае по дозе молекул, которая вызывала половину максимальной пролиферации, с использованием программного обеспечения GraphPad. Удельная активность Fc-слитого мутированного IL-2 (включающего K35E) составляла  $4 \times 10^6$  МЕ/мг и находилась в том же диапазоне, что и у эталонного рекомбинантного IL-2 ( $2,3 \times 10^6$  МЕ/мг). Этот результат указывает на сохранение биологической активности IL-2 в присутствии K35E.

Пример 7. K35E Fc-слитого IL-2 обладает способностью стимулировать размножение *in vivo* Т-клеток памяти с фенотипом CD8

Мыши C57BL/6 получали пять ежедневных доз  $4 \times 10^4$  МЕ Fc-слитого мутированного IL-2 (K35E) в течение 5 последовательных дней с целью изучения способности этого белка стимулировать *in vivo* пролиферацию популяций IL-2-зависимых клеток. После обработки животных умерщвляли, и их селезенки анализировали. Кроме того, определяли размер популяции клеток памяти с фенотипом CD3+CD8+ (CD44<sup>hi</sup>) методом проточной цитометрии.

Контролем в эксперименте служила группа мышей, которым вводили забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

Рекомбинантный Fc-слитый IL-2 (K35E) оказывал ожидаемое влияние на популяцию CD8 Т-клеток памяти, судя по увеличению селезенки (фиг. 5а) и удвоению в ней относительного количества Т-клеток памяти с фенотипом CD8 (фиг. 5b).

Пример 8. Замена K35E является совместимой с потерей способности связываться с альфа-субъединицей рецептора IL-2, которая определяет свойства селективного агониста.

Сравнивали связывающие свойства как человеческого IL-2, так и не-альфа мутеина, описанного ранее (Carmenate T. et al., J. Immunol. 190:6230-6238, 2013; US 9,206,243), который содержит замены R38A, F42A, Y45A и E62A, приводящие к потере способности связывать альфа-субъединицу рецептора IL-2, для снижения его стимулирующего воздействия на T-регуляторные клетки, не оказывая при этом влияния на эффекторные клетки, имеющие гетеродимерный бета/гамма-рецептор. Оба рекомбинантных белка имели дополнительную мутацию K35E и были получены в виде слитых белков, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека. Микротитрационные планшеты покрывали рекомбинантной альфа-субъединицей рецептора IL-2 человеческого (а) и мышиноного (б) происхождения. Захваченные слитые белки детектировали с помощью антитела против человеческого Fc, связанного с пероксидазой хрена. Введение K35E привело к появлению новой не-альфа молекулы с более высоким уровнем экспрессии по сравнению с исходным аналогом (фиг. 2b) и значительно более низкой способностью связывать альфа-цепь человека и мыши по сравнению с немутированным IL-2, также имеющим замену K35E (фиг. 6). Эти результаты являются первым доказательством совместимости K35E с селективной модуляцией взаимодействий и иммуномодулирующих функций IL-2.

Пример 9. Замена K35E является совместимой с увеличением способности связывать бета-субъединицу рецептора IL-2, уже описанной для суперагонистического варианта

Связывающую способность IL-2 и супер-бета-мутеина, содержащего мутации L80F, R81D, L85V, I86V и I92F (имеющего дополнительную мутацию K35E и слитого с Fc-областью человеческого IgG1), оценивали методом ELISA на планшетах, покрытых бета-субъединицей рецептора IL-2. Захваченные слитые белки детектировали с помощью антитела против человеческого Fc, связанного с пероксидазой хрена. Введение K35E привело к появлению новой молекулы с более высокими уровнями экспрессии по сравнению с исходным супер-бета-мутеином (фиг. 2c) и с улучшенной способностью связывать бета-субъединицу, что является основой его суперагонистической функции (фиг. 7). Этот результат расширил доказательства совместимости замены K35E с конструкцией новых полученных из IL-2 молекул с модификациями в их взаимодействиях с рецепторными субъединицами и иммуномодулирующих функциях.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

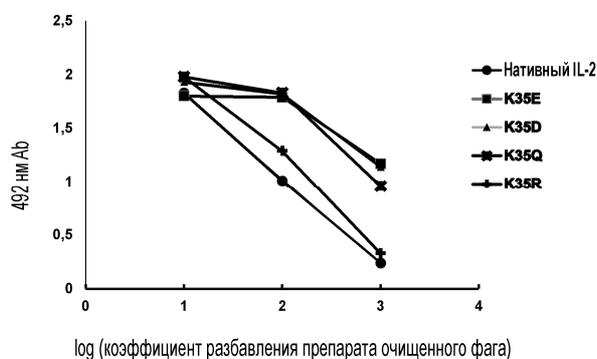
1. In vitro способ повышения уровней секреции рекомбинантного человеческого IL-2 и полученных из него мутеинов в хозяине, характеризующийся введением одной неконсервативной мутации в положении 35 их первичной последовательности, где указанная мутация выбрана из группы, состоящей из K35E, K35D и K35Q,

где указанный рекомбинантный человеческий IL-2 соответствует последовательностям из кодов PDB 2ERJ и 2B5I,

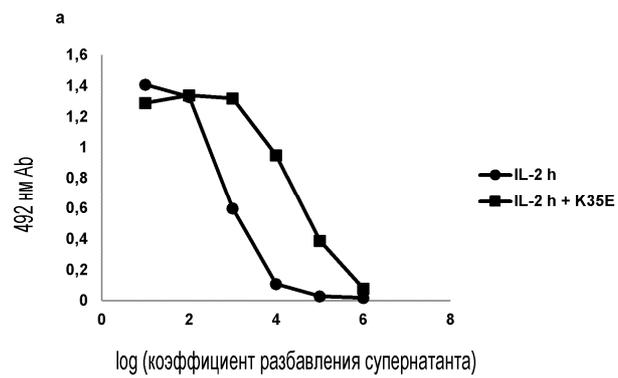
и где указанного хозяина выбирают из группы, содержащей E.coli, клетки млекопитающих и дрожжи.

2. Способ по п.1, где рекомбинантный человеческий IL-2 и полученные из него мутеины слиты с любым из белков, выбранных из группы, включающей капсидные белки нитевидных фагов, альбумин, Fc-область антител, полные антитела и фрагменты антител, включающие их вариабельные домены.

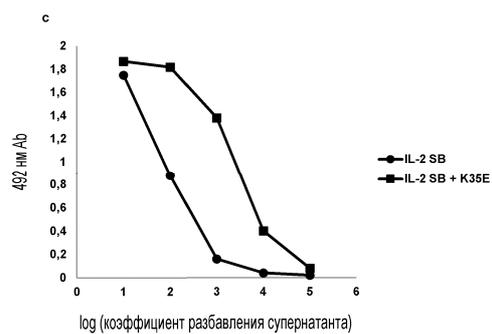
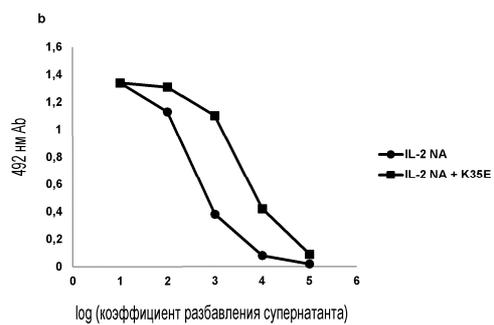
3. Белок, полученный способом по п.1, выбранный из группы, содержащей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.



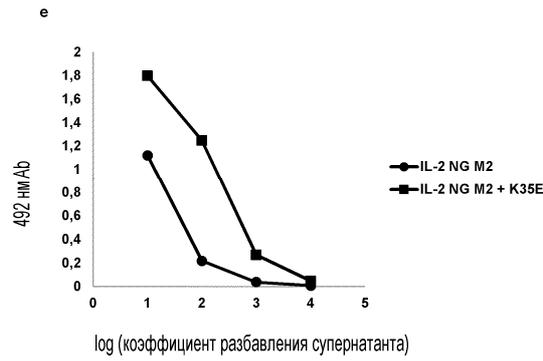
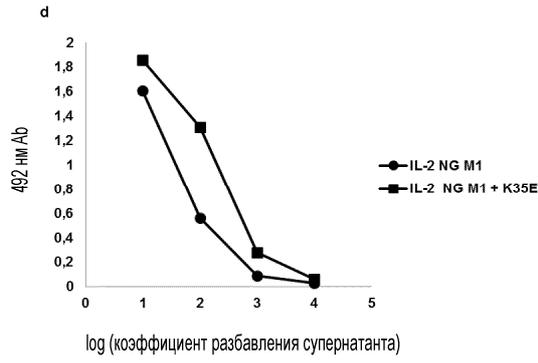
Фиг. 1



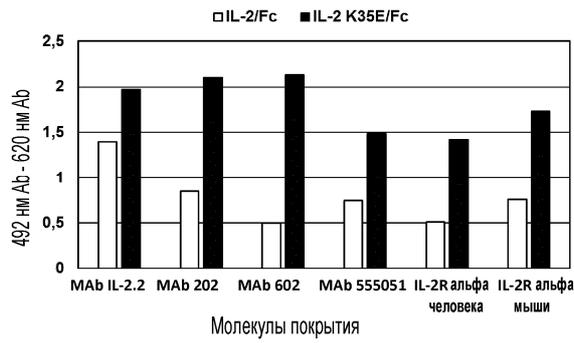
Фиг. 2а



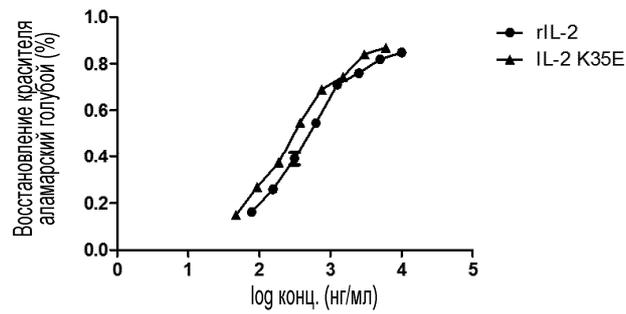
Фиг. 2b, c



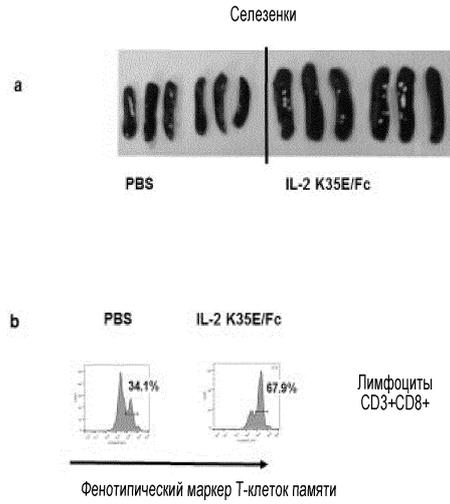
Фиг. 2d, e



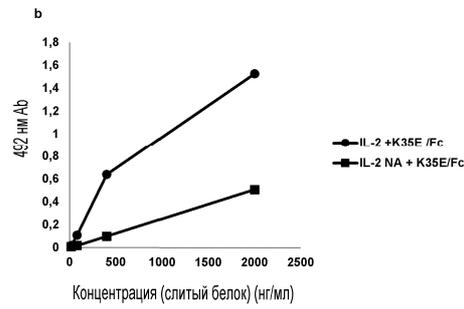
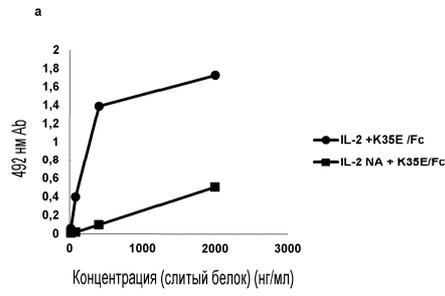
Фиг. 3



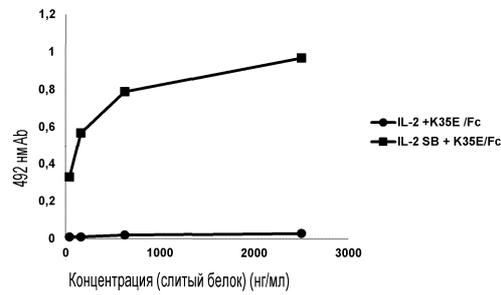
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

