

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390721 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.09(22) Дата подачи заявки
2021.09.03(51) Int. Cl. C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) МУТАНТНАЯ ФОРМА IL-2 И ВАРИАНТЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 202010918842.0; 202110932286.7

(32) 2020.09.04; 2021.08.13

(33) CN

(86) PCT/CN2021/116463

(87) WO 2022/048640 2022.03.10

(71) Заявитель:

ШАНЬДУН СИМЦЕРЕ
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)

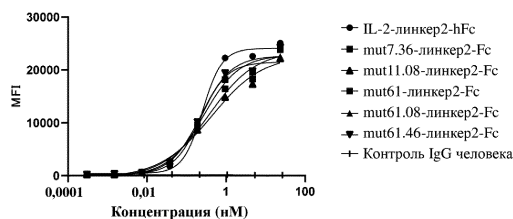
(72) Изобретатель:

Ху Инин, Цао Чжосяо, Тан Жэньхун,
Гэ Ху, Фу Яюань, Жэнь Цзиньшэн
(CN)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) В настоящем изобретении раскрыты мутантные формы IL-2 и пути их применения. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрены мутантные формы IL-2 и соответствующие слитые белки, конъюгаты, фрагменты нуклеиновых кислот, векторы, клетки-хозяева, способы получения мутантных форм или слитых белков, мутантные формы IL-2 или слитые белки, полученные в соответствии с данными способами, фармацевтические композиции, фармацевтические пути применения, способы лечения заболеваний и способы преимущественной стимуляции регуляторных Т-клеток. По сравнению с IL-2 дикого типа мутантные формы IL-2 по настоящему изобретению характеризуются более высокими значениями T_m и улучшенной стабильностью; в качестве альтернативы мутантные формы IL-2 по настоящему изобретению характеризуются увеличенным выходом белка или измененной связывающей активностью в отношении комплексов IL-2R $\beta\gamma$ по сравнению с IL-2 дикого типа.



A1

202390721

202390721

A1

МУТАНТАЯ ФОРМА ИЛ-2 И ВАРИАНТЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биомедицины, в частности, к мутантным формам ИЛ-2 и путям их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В последующих исследованиях было обнаружено, что интерлейкин-2 (ИЛ-2), первоначально идентифицированный как фактор роста Т-клеток (TCGF), связывается со своими рецепторами и активирует пролиферацию и активацию иммунных клеток, таких как Т-клетки и НК-клетки.

Рецепторы ИЛ-2 включают α -субъединицу ИЛ-2R (CD25), β -субъединицу ИЛ-2R (CD122) и γ -субъединицу ИЛ-2R (CD132). Из различных субъединиц могут образовываться рецепторные комплексы с различной степенью аффинности, включая рецептор ИЛ-2R $\alpha\beta\gamma$ с высокой степенью аффинности, рецептор ИЛ-2R $\beta\gamma$ со средней степенью аффинности и рецептор ИЛ-2R α или ИЛ-2R $\alpha\beta$ с низкой степенью аффинности. Различные клетки экспрессируют различные типы субъединиц ИЛ-2R. Например, традиционные Т-клетки (CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки) в состоянии покоя обычно экспрессируют на клеточной поверхности β -субъединицу рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R β , CD122) и γ -субъединицу рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R γ , CD132), но почти не экспрессируют α -субъединицу рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R α , CD25). Однако в дополнение к β -субъединице ИЛ-2R и γ -субъединице ИЛ-2R, α -субъединица ИЛ-2R конститутивно экспрессируется на высоком уровне в регуляторных Т-клетках (Treg).

В настоящее время исследователи пытаются применять ИЛ-2 или его мутантные формы для активации иммунных клеток или подмножества иммунных клеток для лечения опухолей или аутоиммунных заболеваний. Например, высокие дозы ИЛ-2 были одобрены для лечения злокачественной меланомы или метастатической почечно-клеточной карциномы, а конъюгат PEG-ИЛ-2, NKTR-358, был одобрен для клинических испытаний при аутоиммунных заболеваниях.

Следовательно, для разработки лекарственных средств на основе ИЛ-2 большое

значение имеет повышение стабильности и выхода IL-2 и/или изменение его связывающей способности в отношении определенных рецепторных комплексов. В свете вышеизложенного предлагается настоящее изобретение.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрены мутантные формы IL-2, слитые белки, конъюгаты, фрагменты нуклеиновых кислот, векторы, клетки-хозяева, способы получения мутантных форм или слитых белков, мутантные формы IL-2 или слитые белки, полученные в соответствии с данными способами, фармацевтические композиции, фармацевтические пути применения, терапевтические способы и способы преимущественной стимуляции регуляторных Т-клеток.

В первом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена мутантная форма IL-2, содержащая одну или несколько мутаций в Q13, L18, G27, Y31, A73, H79, P82, I89, N90, V91, V93, F117 или R120 по сравнению с IL-2 дикого типа.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутация представляет собой делецию, вставку или замену, предпочтительно замену.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 содержит одну или несколько мутаций из Q13L, L18I, G27W, Y31V, A73L, H79Q, P82L, I89L, N90Y, V91A, V93I, F117W или R120F.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a)-(h):

- (a) мутации в Y31/A73/H79; предпочтительно Y31V/A73L/H79Q;
- (b) мутация в Q13; предпочтительно Q13L;
- (c) мутация в R120; предпочтительно R120F;
- (d) мутации в L18/V91/F117; предпочтительно L18I/V91A/F117W;
- (e) мутации в L18/I89/V93; предпочтительно L18I/I89L/V93I;
- (f) мутации в G27/R120; предпочтительно G27W/R120F;
- (g) мутации в P82/R120; предпочтительно P82L/R120F;
- (h) мутации в N90/R120; предпочтительно N90Y/R120F;

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под любым из SEQ ID NO: 2-9.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 характеризуется значением T_m, превышающим таковое у IL-2 дикого типа.

В некоторых конкретных вариантах осуществления IL-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 1.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в H16, D20, N88, V91 или Q126, например, H16E, D20A, D20H, D20Y, N88A, N88I, N88G, N88R, N88D, V91R, V91K, Q126L или Q126F.

Предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий), выбранной(-ых) из групп (i)-(iv):

- (i) мутация в H16; предпочтительно H16E;
- (ii) мутация в D20; предпочтительно D20A;
- (iii) мутация в V91; предпочтительно V91R;
- (iv) мутации в H16/V91; предпочтительно H16E/V91R.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a)-(n):

- (a) мутации в H16/Y31/A73/H79; предпочтительно H16E/Y31V/A73L/H79Q;
- (b) мутации в H16/R120; предпочтительно H16E/R120F;
- (c) мутации в H16/L18/V91/F117; предпочтительно H16E/L18I/V91A/F117W;
- (d) мутации в H16/L18/I89/V93; предпочтительно H16E/L18I/I89L/V93I;
- (e) мутации в H16/G27/R120; предпочтительно H16E/G27W/R120F;
- (f) мутации в H16/P82/R120; предпочтительно H16E/P82L/R120F;
- (g) мутации в D20/Y31/A73/H79; предпочтительно D20A/Y31V/A73L/H79Q;
- (h) мутации в D20/R120; предпочтительно D20A/R120F;
- (i) мутации в V91/Y31/A73/H79; предпочтительно V91R/Y31V/A73L/H79Q;
- (j) мутации в V91/Q13; предпочтительно V91R/Q13L;
- (k) мутации в V91/R120; предпочтительно V91R/R120F;

(l) мутации в V91/L18/I89/V93; предпочтительно V91R/L18I/I89L/V93I;

(m) мутации в H16/V91/Y31/A73/H79; предпочтительно H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q;

(n) мутации в H16/V91/L18/I89/V93; предпочтительно H16E/V91R/L18I/I89L/V93I.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма П-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под любым из SEQ ID NO: 22-27, SEQ ID NO: 29-30, SEQ ID NO: 32-35 или SEQ ID NO: 37-38.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма П-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в N26, N29, N30, N71, Q11, L132, L70, P82, G27 или F28.

Предпочтительно мутантная форма П-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C, L132C, L70C, P82C, G27C или F78C.

Более предпочтительно мутантная форма П-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a)-(g):

(a) N26Q;

(b) N29S;

(c) N30S;

(d) N71Q;

(e) Q11C/L132C;

(f) L70C/P82C;

(g) G27C/F78C.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма П-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации в F42, Y45 или L72, предпочтительно F42A, Y45A или L72G.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма П-2 характеризуется сниженной связывающей способностью в отношении комплекса субъединиц П-2Rβγ по сравнению с П-2 дикого типа; предпочтительно снижается связывающая способность комплекс субъединиц П-2Rβγ/связывающая способность комплекс субъединиц П-

2афу.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма характеризуется сниженной способностью стимуляции нерегуляторных Т-клеток или НК-клеток (естественных киллеров) по сравнению с IL-2 дикого типа; причем стимуляция может быть выбрана из внутриклеточного фосфорилирования STAT5 или клеточной пролиферации.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки (Treg) в периферической крови или популяцию Т-клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или НК-клетками (естественными киллерами); причем указанная предпочтительная стимуляция может быть выбрана из предпочтительной стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках, предпочтительной стимуляции пролиферации регуляторных Т-клеток, увеличения отношения регуляторных Т-клеток к нерегуляторным Т-клеткам или увеличения отношения регуляторных Т-клеток к НК-клеткам.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предусмотрена мутантная форма IL-2, содержащая одну или несколько мутаций в H16, D20 или V91 по сравнению с IL-2 дикого типа; предпочтительно мутантная форма IL-2 содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий), выбранной(-ых) из групп (i)-(iv):

- (i) мутация в H16; предпочтительно H16E;
- (ii) мутация в D20; предпочтительно D20A;
- (iii) мутация в V91; предпочтительно V91R;
- (iv) мутации в H16/V91; предпочтительно H16E/V91R.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 21, 28, 31 или 36.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в N26, N29, N30, N71, Q11, L132, L70, P82, G27 или F28.

Предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C, L132C, L70C, P82C, G27C или F28C.

Более предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a)-(g):

- (a) N26Q;
- (b) N29S;
- (c) N30S;
- (d) N71Q;
- (e) Q11C/L132C;
- (f) L70C/P82C;
- (g) G27C/F78C.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма IL-2 характеризуется сниженной связывающей способностью в отношении комплекса субъединиц IL-2R $\beta\gamma$ по сравнению с IL-2 дикого типа; предпочтительно снижается отношение связывающая способность комплекс субъединиц IL-2R $\beta\gamma$ /связывающая способность комплекс субъединиц IL-2 $\alpha\beta\gamma$.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма характеризуется сниженной способностью стимуляции нерегуляторных T-клеток или NK-клеток (естественных киллеров) по сравнению с IL-2 дикого типа; и стимуляция может быть выбрана из внутриклеточного фосфорилирования STAT5 или клеточной пролиферации.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутантная форма предпочтительно стимулирует регуляторные T-клетки (Treg) в периферической крови или популяцию T-клеток по сравнению с нерегуляторными T-клетками или NK-клетками; причем указанная предпочтительная стимуляция может быть выбрана из предпочтительной стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных T-клетках, предпочтительной стимуляции пролиферации регуляторных T-клеток, увеличения отношения регуляторных T-клеток к нерегуляторным T-клеткам или увеличения отношения регуляторных T-клеток к NK-клеткам.

В некоторых конкретных вариантах осуществления мутация предусматривает делецию, вставку или замену, предпочтительно замену.

В некоторых конкретных вариантах осуществления IL-2 дикого типа имеет

аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 1.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предусмотрен слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид представляет собой мутантную форму IL-2, описанную выше, а второй полипептид представляет собой полипептид, отличный от IL-2.

В некоторых конкретных вариантах осуществления второй полипептид представляет собой Fc, молекулу, связывающую опухолевый антиген, или субъединицу рецептора IL-2; необязательно Fc представляет собой Fc IgG человека, например, Fc IgG1 человека; предпочтительно Fc IgG1 человека содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий), выбранной(-ых) из групп (a)-(i):

- (a) C220S;
- (b) N297G;
- (c) C220S и N297G;
- (d) A327Q;
- (e) L234A и L235A;
- (f) A287C и L306C;
- (g) A259C и L306C;
- (h) R292C и V302C;
- (i) V323C и I332C;

более предпочтительно Fc IgG1 человека имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 11;

необязательно опухолевый антиген предусматривает EDB-FN (экстрадомен фибронектина), Muc1, p53, FAP, GD2, EpCAM, тенаascin-C, CD20, CEA, MAdCAM-1 или WT1 (белок 1 опухоли Вильмса); необязательно молекула, связывающая опухолевый антиген, представляет собой антитело, такое как scFv, sdFv, Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv;

необязательно субъединица рецептора IL-2 представляет собой α -субъединицу рецептора IL-2.

В некоторых конкретных вариантах осуществления С-конец первого полипептида соединен с N-концом второго полипептида с помощью линкера или без него; или N-конец

первого полипептида соединен с С-концом второго полипептида с помощью линкера или без него;

предпочтительно линкер выбран из $(G_4S)_n$, $(GGNGT)_n$ или $(YGNGT)_n$, и n выбран из 1, 2, 3, 4 или 5;

более предпочтительно С-конец первого полипептида соединен с N-концом второго полипептида посредством линкера $(G_4S)_3$.

В некоторых конкретных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную под любым из SEQ ID NO: 13-20 или SEQ ID NO: 39-56.

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат, содержащий мутантную форму или слитый белок, описанные выше, и дополнительно содержащий стабилизатор, лекарственное средство или индикаторную молекулу, конъюгированную с мутантной формой или слитым белком; где стабилизатор может быть выбран из полиэтиленгликоля, такого как монометоксиполиэтиленгликоль.

В пятом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий мутантную форму или слитый белок, описанные выше.

В шестом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий фрагмент нуклеиновой кислоты, описанный выше.

В седьмом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор, описанный выше.

В некоторых конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку; причем прокариотическая клетка или эукариотическая клетка могут быть выбраны из *Escherichia coli*, дрожжей, клеток насекомых или клеток млекопитающих, и клетки млекопитающих могут быть выбраны из линии клеток СНО или линии клеток НЕК293.

В восьмом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения мутантной формы или слитого белка, описанных выше, где способ включает культивирование вышеупомянутой клетки-хозяина и выделение мутантной формы П-2 или слитого белка, экспрессируемых клеткой-хозяином.

В девятом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены мутантная форма PL-2 или слитый белок, полученные в соответствии с вышеупомянутым способом.

В десятом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая вышеупомянутые мутантную форму, слитый белок, конъюгат, фрагмент нуклеиновой кислоты, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество;

предпочтительно фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для инъекции, например, для внутривенной или подкожной инъекции; более предпочтительно в дозе фармацевтической композиции содержится эффективное количество слитого белка, подлежащего введению субъекту; наиболее предпочтительно эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг.

В одиннадцатом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение вышеупомянутых мутантной формы, слитого белка, конъюгата, фрагмента нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина в изготовлении лекарственного препарата;

предпочтительно лекарственный препарат представляет собой лекарственный препарат для инъекции, например, для внутривенной или подкожной инъекции;

предпочтительно в дозе лекарственного препарата содержится эффективное количество слитого белка, подлежащего введению субъекту; наиболее предпочтительно, эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг;

предпочтительно лекарственный препарат применяется для лечения аутоиммунного заболевания, пролиферативного заболевания или вирусной инфекции;

более предпочтительно аутоиммунное заболевание предусматривает ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку, кожную красную волчанку, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, синдром Шегрена, полимиозит, дерматомиозит, склеродермию, псориаз, бляшечный псориаз, очаговую алопецию, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, аутоиммунный гепатит, диабет I типа, аутоиммунный васкулит, экзему или астму;

более предпочтительно пролиферативное заболевание предусматривает неоплазию, солидную опухоль, гематологическую опухоль, злокачественный асцит или злокачественный плевральный выпот; где солидная опухоль может быть доброкачественной или злокачественной, первичной или метастатической, злокачественная солидная опухоль может представлять собой рак или саркому, например, эпителиально-клеточную карциному, эндотелиально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, тератому, опухоль легкого, рак, индуцированный папилломавирусом, аденокарциному, карциному, меланому, ангиосаркому, нейробластому, метастатический рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак из клеток Меркеля, рак яичника, почечно-клеточный рак, метастатический рак почки, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря; гематологическая опухоль может представлять собой лейкоз, лимфому, множественную миелому, как, например, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов;

более предпочтительно вирусная инфекция выбрана из инфекции, вызванной HIV, инфекции, вызванной новым коронавирусом, или вирусной инфекции, вызванной HPV.

В двенадцатом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения аутоиммунного заболевания, пролиферативного заболевания или вирусной инфекции, где способ включает стадию введения субъекту эффективного количества вышеупомянутых

мутантной формы IL-2, слитого белка, конъюгата, фрагмента нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции;

предпочтительно стадию введения выполняют посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции;

предпочтительно эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг;

предпочтительно аутоиммунное заболевание предусматривает ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку, кожную красную волчанку, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, синдром Шегрена, полимиозит, дерматомиозит, склеродермию, псориаз, бляшечный псориаз, очаговую алопецию, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, аутоиммунный гепатит, диабет I типа, аутоиммунный васкулит, экзему или астму;

предпочтительно пролиферативное заболевание предусматривает неоплазию, солидную опухоль, гематологическую опухоль, злокачественный асцит или злокачественный плевральный выпот; где солидная опухоль необязательно выбрана из доброкачественной или злокачественной, первичной или метастатической, злокачественная солидная опухоль необязательно выбрана из рака или саркомы, например, эпителиально-клеточной карциномы, эндотелиально-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, тератомы, опухоли легкого, рака, индуцированного папилломавирусом, аденокарциномы, карциномы, меланомы, ангиосаркомы, нейробластомы, метастатического рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака из клеток Меркеля, рака яичника, почечно-клеточного рака, метастатического рака почки, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря; гематологическая опухоль необязательно выбрана из лейкоза, лимфомы,

множественной миеломы, как, например, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов;

более предпочтительно вирусная инфекция выбрана из инфекции, вызванной HIV, инфекции, вызванной новым коронавирусом, или вирусной инфекции, вызванной HPV.

В тринадцатом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ предпочтительной стимуляции популяции Т-клеток или регуляторных Т-клеток в периферической крови, где способ включает стадию приведения популяции Т-клеток или периферической крови в контакт с вышеупомянутыми мутантной формой IL-2, слитым белком, конъюгатом, фрагментом нуклеиновой кислоты, вектором, клеткой-хозяином или фармацевтической композицией;

предпочтительно указанная указанная предпочтительная стимуляция предусматривает:

(a) предпочтительную стимуляцию фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или НК-клетками;

(b) предпочтительную стимуляцию пролиферации регуляторных Т-клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или НК-клетками и/или

(c) увеличение отношения регуляторных Т-клеток к нерегуляторным Т-клеткам или увеличение отношения регуляторных Т-клеток к НК-клеткам.

Термины и определения

Если в настоящем изобретении не определено иное, научные и технические термины, связанные с настоящим изобретением, будут иметь значения, обычно понятные специалистам в данной области техники.

Если не указано иное, используемые в данном документе термины "IL2" или "IL-2" относятся к любому природному или рекомбинантному IL-2, полученному от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы), и домашних или сельскохозяйственных млекопитающих. "IL2" или "IL-2" в настоящем изобретении включают любую форму, охватывающую от непроцессированного IL-2 (например, IL-2, содержащий сигнальный пептид на N-конце) до

зрелого IL-2 в клетке. "IL2" или "IL-2" в настоящем изобретении также включают природные варианты и фрагменты IL-2, такие как сплайс-варианты или аллельные варианты. Используемые в данном документе термины "IL2" или "IL-2" также включают не встречающиеся в природе мутантные формы, такие как мутантные формы IL-2, искусственно модифицированные с помощью генной инженерии.

Термин "IL-2 дикого типа" является таким же, как и для мутантной формы IL-2, за исключением того, что каждая аминокислота в положениях мутации в мутантной форме IL-2 сохраняется в качестве аминокислоты дикого типа. Например, если мутантная форма IL-2 представляет собой непротессированный IL-2, то форма дикого типа мутантной формы представляет собой непротессированный IL-2, если мутантная форма IL-2 представляет собой зрелый IL-2, то форма дикого типа мутантной формы представляет собой зрелый IL-2; если мутантная форма IL-2 представляет собой укороченную форму IL-2, то форма дикого типа мутантной формы представляет собой соответствующую укороченную форму IL-2 с последовательностью дикого типа. Например, "IL-2 дикого типа" в настоящем изобретении может иметь следующую аминокислотную последовательность:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHL
QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFXQSIISTLT (SEQ ID NO: 60); где 125-й аминокислотный остаток "X" представляет C, S, A или V.

Используемый в данном документе термин "мутация" предусматривает аминокислотную замену, делецию, вставку или любую их комбинацию. "Мутация" в настоящем изобретении может представлять собой аминокислотную мутацию, полученную с помощью генетических или химических способов, известных в данной области техники, включая без ограничения сайт-направленный мутагенез, ПЦР, генный синтез и т. п.

Нумерация "сайта мутации" в мутантной форме IL-2 начинается с первого аминокислотного остатка (A) "IL-2 дикого типа", показанного под SEQ ID NO: 60. Например, "мутация Q13" в настоящем изобретении относится к мутантной форме IL-2, в которой происходит мутация аминокислотного остатка (Gln, Q) в положении 13 в IL-2 дикого типа, показанного под SEQ ID NO: 60. Например, "мутация Q13L" в настоящем

изобретении относится к мутантной форме IL-2, в которой аминокислота Q (Gln) в положении 13 в IL-2 дикого типа, показанного под SEQ ID NO: 60, мутирована в L (Leu).

Используемый в данном документе знак пунктуации "/", используемый между сайтами мутаций, означает "и", что указывает на то, что мутации до и после "/" сосуществуют в одной и той же мутантной форме IL-2 в одно и то же время. Например, "Y31/A73/H79" означает, что мутации происходят одновременно в Y31, A73 и H79 в одной и той же мутантной форме IL-2, и "Y31V/A73L/H79Q" означает, что Y31V, A73L и H79Q сосуществуют в одно и то же мутантной форме IL-2 в одно и то же время.

Используемый в данном документе термин "Tm" (температура плавления) относится к температуре, при которой подвергается денатурации 50% белка. "Tm" в настоящем изобретении может определяться с помощью любых способов определения значения Tm белка, которые хорошо известны в данной области техники. Например, значение Tm белка можно определить с помощью способа, показанного в примере 3 или 6 настоящего изобретения.

Термин "слитый белок" в настоящем изобретении относится к белковому продукту, полученному путем соединения кодирующих областей двух или более генов с помощью генетической рекомбинации, химических или других подходящих способов, и экспрессии белкового продукта, полученного с помощью генетической рекомбинации, под контролем той же регуляторной последовательности. В слитом белке по настоящему изобретению кодирующие области двух или более генов могут быть слиты в одном или нескольких положениях с помощью последовательности, кодирующей линкер(-ы). Линкер(-ы) можно применять для конструирования слитого белка по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "линкер" относится к пептиду, применяемому для связывания IL-2 с другой белковой молекулой или белковым фрагментом для обеспечения правильного фолдинга и стабильности белка. Указанная другая молекула включает без ограничения Fc. Предпочтительно "линкер" в настоящем изобретении представляет собой (GGGGS)_n, где n может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. Если линкерная последовательность является слишком короткой, это может повлиять на фолдинг структуры более высокого порядка двух белков, так что два белка будут мешать друг другу. Если

линкерная последовательность является слишком длинной, она может приводить к иммуногенности, поскольку линкерная последовательность сама по себе представляет собой новый антиген.

Используемый в данном документе термин "второй полипептид" может представлять собой одноцепочечный полипептид, такой как антитело scFv. "Второй полипептид" также включает полипептид из нескольких цепей, в котором по меньшей мере одна полипептидная цепь слита с Π -2 или его мутантной формой, а другая(-ие) полипептидная(-ые) цепь(-и) соединена(-ы) с по меньшей мере одной полипептидной цепью, которая слита с помощью ковалентной(-ых) или нековалентной(-ых) связи(-ей). Например, в случае Fab антитела тяжелая цепь Fab может быть слита с Π -2 или его мутантной формой, и легкая цепь соединена с тяжелой цепью с помощью дисульфидной(-ых) связи(-ей).

Используемый в данном документе термин "Fc" относится к константной области цепи иммуноглобулина, в частности к карбоксильному концу константной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части. Fc не характеризуется антигенсвязывающей активностью и является областью, в которой антитела взаимодействуют с эффекторными молекулами или клетками. Используемый в данном документе "Fc" может представлять собой любую Fc или ее вариант, которые получены от человека или отличных от человека млекопитающих. Например, Fc иммуноглобулина может содержать комбинацию из двух или более доменов (CH1, CH2, CH3 или CH4) тяжелых цепей и шарнирной области иммуноглобулина. Fc может быть получена от различных видов, предпочтительно из иммуноглобулина человека. В соответствии с аминокислотной последовательностью константной области тяжелых цепей иммуноглобулина можно разделить на разные классы, в основном включающие пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), такие как IgG-1, IgG-2, IgG-3 и IgG-4; IgA-1 и IgA-2. Предпочтительно "Fc" содержит по меньшей мере одну шарнирную область иммуноглобулина, а также домены CH2 и CH3 из IgG. Более предпочтительно, "Fc" содержит домен CH2, домен CH3 и шарнирную область иммуноглобулина IgG1, и начальное аминокислотное положение шарнирной области может меняться. Если не указано иное, аминокислотные остатки Fc, константной области или антитела по

настоящему изобретению нумеруются в соответствии с системой нумерации EU, также известной как EU-индекс, описанной в *Kabat et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Public Health Service, National Institutions of Health, Bethesda, Md., 1991.

"Антитело" по настоящему изобретению применяется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антитела, включая без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и антигенсвязывающие фрагменты, при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность. Антитела могут включать мышьи антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и верблюжьи антитела. В качестве иллюстрации антитело может представлять собой иммуноглобулин, который представляет собой структуру с тетрапептидной цепью, состоящей из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, соединенных посредством межцепочечных дисульфидных связей. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина различаются по аминокислотному составу и последовательности и, таким образом, антигенности. Следовательно, иммуноглобулин можно разделить на пять классов или изоформ иммуноглобулина, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, и их соответствующие тяжелые цепи представляют собой μ -цепь, δ -цепь, γ -цепь, α -цепь и ϵ -цепь соответственно. Исходя из разницы аминокислотного состава в шарнирной области, а также количества и положения дисульфидных связей тяжелой цепи один и тот же класс Ig можно разделить на разные подклассы, например, IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи можно разделить на κ -цепи или λ -цепи, исходя из различия константной области. Каждый из пяти классов Ig может иметь κ -цепи или λ -цепи. "Антитело" в настоящем изобретении также включает scFv, sdFv, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv.

Используемый в данном документе термин "выделенный" относится к изъятию материала из его исходной или природной среды (например, природной среды, в которой он существует в природе). Следовательно, природные полинуклеотиды или полипептиды, присутствующие у живых животных, не являются выделенными, а те же полинуклеотиды или полипептиды, выделенные от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе посредством человеческого вмешательства, являются выделенными.

"Выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты" представляет собой полимер РНК или ДНК, который является однонитевым или двухнитевым и необязательно содержит синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты в форме полимера ДНК может состоять из одной или нескольких кДНК, геномных ДНК или синтетических фрагментов ДНК. "Фрагмент нуклеиновой кислоты" по настоящему изобретению может быть частью вектора и интегрирован в хромосому клетки-хозяина в гетерологичном сайте. "Фрагмент нуклеиновой кислоты" по настоящему изобретению может быть частью композиции. Поскольку такой вектор или композиция не является частью его природной среды, он все еще является выделенным.

Используемый в данном документе термин "вектор" включает вектор на основе нуклеиновой кислоты, такой как ДНК-вектор (например, плаزمид), РНК-вектор, вирус или другой подходящий репликон (например, вирусный вектор). Для доставки полинуклеотидов, предназначенных для кодирования чужеродных белков, в прокариотические или эукариотические клетки были разработаны различные варианты векторов. "Вектор" по настоящему изобретению может содержать дополнительные элементы последовательности, предназначенные для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клеток млекопитающих, регуляторные последовательности (такие как промоторные и энхансерные области), предназначенные для управления транскрипцией гена, или последовательности, предназначенные для повышения скорости трансляции генов или улучшения стабильности или ядерного экспорта мРНК, полученной посредством транскрипции генов. Элементы последовательности включают, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области, внутренние сайты посадки рибосомы (IRES) и сайты сигналов полиаденилирования для того, чтобы управлять эффективной транскрипцией генов, находящихся на векторах экспрессии. "Вектор" по настоящему изобретению может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для отбора клеток, содержащих такой вектор. Примеры подходящих маркеров включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин или нурсеотрицин.

Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство такой клетки. "Потомство" может характеризоваться точно таким же составом нуклеиновой кислоты, что и его родительская клетка, или может содержать мутации и не являться точно таким же, как родительская клетка. "Потомство" включает мутантное потомство, которое характеризуется такой же функцией или биологической активностью, что и функция или биологическая активность, подвергнутые скринингу или отобранные в исходных трансформированных клетках.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к смеси, содержащей одну или несколько мутантных форм ПЛ-2, слитых белков, фрагментов нуклеиновых кислот, векторов или клеток-хозяев по настоящему изобретению. Смесь дополнительно содержит другие компоненты, включая без ограничения фармацевтически приемлемые носители, разбавители или вспомогательные вещества. Задачей фармацевтической композиции по настоящему изобретению является облегчение введения лекарственных средств в организм, что содействует всасыванию активных ингредиентов для проявления их биологической активности.

Термин "лечение" по настоящему изобретению относится к хирургическому или фармацевтическому лечению, задачей которого является предупреждение или ослабление (уменьшение) прогрессирования нежелательных физиологических изменений или поражений, таких как нарушения пролиферации клеток (например, рак или инфекционные заболевания), аутоиммунные заболевания (например, системная красная волчанка), у субъектов, нуждающихся в лечении. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают без ограничения смягчение симптомов, облегчение тяжести заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) болезненного состояния, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление стадии заболевания и ремиссию (частичную или полную), или поддающуюся обнаружению, или не поддающуюся обнаружению. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают тех, кто страдает от заболеваний или нарушений, тех, кто восприимчивы к заболеваниям или нарушениям, или тех, кто желает предупредить заболевания или нарушения. Когда

применяются термины "облегчение", "уменьшение", "ослабление", "уменьшение интенсивности" и "ремиссия", они также означают устранение, исчезновение, отсутствие и т. п.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к организму, получающему лечение по поводу конкретных заболеваний или нарушений (таких как формы рака, инфекционные заболевания или аутоиммунные заболевания), описанных в данном документе. Примеры субъектов и пациентов включают млекопитающих, таких как люди, приматы, свиньи, козы, кролики, хомяки, кошки, собаки, морские свинки, крупный рогатый скот или другие представители семейства Полорогие, овец и лошадей, получающих лечение по поводу заболеваний или нарушений.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, которое является эффективным для предупреждения или облегчения симптомов или прогрессирования заболевания, когда терапевтическое средство вводят в клетку, ткань или субъекта отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством. "Эффективное количество" также относится к количеству соединения, которое является достаточным для облегчения симптомов (например, для лечения, излечения, предупреждения или облегчения связанных патологических состояний) или увеличения скорости лечения излечения, предупреждения или облегчения этих состояний. Если активный ингредиент вводится индивидууму отдельно, то терапевтически эффективное количество относится исключительно к активному ингредиенту. Если вводится комбинация, то терапевтически эффективное количество относится к объединенному количеству активных ингредиентов, которые оказывают терапевтический эффект независимо от того, вводятся ли они в комбинации, непрерывно или одновременно.

Термин "аутоиммунное заболевание" по настоящему изобретению относится к состоянию, характеризующемуся повреждением клеток, тканей и/или органов, вызванным иммунным ответом субъекта на его собственные клетки, ткани и/или органы. Например, аутоиммунные заболевания включают без ограничения ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку, кожную красную волчанку, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, синдром Шегрена, полимиозит, дерматомиозит,

склеродермию, псориаз, бляшечный псориаз, очаговую алопецию, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, аутоиммунный гепатит, диабет I типа, аутоиммунный васкулит, экзему или астму.

Термин "пролиферативное заболевание" по настоящему изобретению относится к состоянию, при котором рост клеток или тканей выходит из-под контроля и/или является аномальным, что может привести к развитию нежелательных состояний или заболеваний. Оно может быть или не быть раковым, включая без ограничения новообразования, солидные опухоли, гематологические опухоли, злокачественный асцит или злокачественный плевральный выпот. "Солидная опухоль" по настоящему изобретению может быть доброкачественно или злокачественной, первичной или метастатической; а злокачественные солидные опухоли могут представлять собой карциномы или саркомы. Например, "солидная опухоль" по настоящему изобретению включает без ограничения эпителиально-клеточную карциному, эндотелиально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, тератому, опухоль легкого, рак, индуцированный папилломавирусом, аденокарциному, карциному, меланому, ангиосаркому, нейробластому, метастатический рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак из клеток Меркеля, рак яичника, почечно-клеточный рак, метастатический рак почки, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря. Например, "гематологическая опухоль" по настоящему изобретению включает без ограничения лейкоз, лимфому, множественную миелому, как, например, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов.

Используемый в данном документе термин " α -субъединица рецептора IL-2" (IL-2R α), также известный как "CD25", относится к любым природным α -субъединицам рецептора IL-2 или их мутантным формам, полученным от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). " α -субъединица рецептора IL-2" включает "полноразмерные" непротессированные α -субъединицы рецептора IL-2, любую форму протессированных α -субъединиц рецептора

IL-2, полученных из клеток, встречающиеся в природе варианты α -субъединицы рецептора IL-2 (такие как сплайс-варианты или аллельные варианты), а также искусственно сконструированные мутантные формы на основе природных α -субъединиц рецептора IL-2. В определенных вариантах осуществления α -субъединица рецептора IL-2 представляет собой α -субъединицу рецептора IL-2 человека с иллюстративной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 57.

Используемый в данном документе термин " β -субъединица рецептора IL-2" (IL-2R β), также известный как "CD122", относится к любым природным β -субъединицам рецептора IL-2 или их мутантным формам, полученным от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). " β -субъединица рецептора IL-2" включает "полноразмерные" непротессированные β -субъединицы рецептора IL-2, любую форму протессированных β -субъединиц рецептора IL-2, полученных из клеток, встречающиеся в природе варианты β -субъединицы рецептора IL-2 (такие как сплайс-варианты или аллельные варианты), а также искусственно сконструированные мутантные формы на основе природных β -субъединиц рецептора IL-2. В определенных вариантах осуществления β -субъединица рецептора IL-2 представляет собой β -субъединицу рецептора IL-2 человека с иллюстративной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 58.

Используемый в данном документе термин " γ -субъединица рецептора IL-2" (IL-2R γ), также известный как "CD132", относится к любым природным γ -субъединицам рецептора IL-2 или их мутантным формам, полученным от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). γ -субъединица рецептора IL-2 включает "полноразмерные" непротессированные γ -субъединицы рецептора IL-2, любую форму протессированных γ -субъединиц рецептора IL-2, полученных из клеток, встречающиеся в природе варианты γ -субъединицы рецептора IL-2 (такие как сплайс-варианты или аллельные варианты), а также искусственно сконструированные мутантные формы на основе природных γ -субъединиц рецептора IL-2. В определенных вариантах осуществления γ -субъединица рецептора IL-2 представляет собой γ -субъединицу рецептора IL-2 человека с иллюстративной последовательностью,

показанной под SEQ ID NO: 59.

Используемый в данном документе термин "Treg", также известный как "регуляторная Т-клетка" или "T_{регуляторная клетка}", относится к специализированному типу CD4⁺ Т-клеток, которые могут ингибировать ответ других Т-клеток. Treg характеризуется экспрессией α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25) и фактора транскрипции, белка P3 семейства Forkhead box (FOXP3), и играет ключевую роль в индуцировании и поддержании периферической аутологичной толерантности к антигенам. Treg необходим IL-2 для выполнения его функции, развития и индуцирования ее ингибирующих характеристик.

Используемый в данном документе термин "связывающая способность" относится к связыванию или взаимодействию, проявляемым между образующими пару молекулами. Обычные образующие пару молекулы включают лиганд и рецептор, антиген и антитело, фермент и субстрат и т. д., более конкретно, например, IL-2 и комплекс субъединиц IL-2R $\beta\gamma$ или IL-2 и комплекс субъединиц IL-2R $\alpha\beta\gamma$, показанные в настоящем изобретении. "Связывающая способность" по настоящему изобретению может подвергаться обнаружению с помощью способов, общепринятых в данной области техники, включая без исключения ELISA или FACS.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показан уровень экспрессии белка α -субъединицы рецептора IL-2 человека в рекомбинантной линии клеток CHO-K1 hIL-2-R α (клон 1A6) с обнаружением посредством проточной цитометрии (FACS), где антитело к α -субъединице рецептора IL-2 приобретено у BioLegend; и отрицательный контроль относится к изотипическому контролю.

На фиг. 2 показан уровень экспрессии белка β -субъединицы рецептора IL-2 человека в рекомбинантной линии клеток CHO-K1 hIL-2R β (клон 2A5) с обнаружением посредством проточной цитометрии (FACS), где антитело к β -субъединице рецептора IL-2 приобретено у BioLegend; и отрицательный контроль относится к изотипическому контролю.

На фиг. 3 показан уровень экспрессии белка $\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL-2 человека в рекомбинантной линии клеток CHO-K1 hIL-2R $\beta\gamma$ (клон 2E6) с обнаружением посредством проточной цитометрии (FACS), где антитела к β , γ -субъединицам рецептора IL-2 приобретены у BioLegend; и отрицательный контроль относится к изотипическому

контролю.

На фиг. 3А показан уровень экспрессии белка β -субъединицы рецептора IL-2.

На фиг. 3В показан уровень экспрессии белка γ -субъединицы рецептора IL-2.

На фиг. 4 показан уровень экспрессии белка $\alpha\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL-2 человека в рекомбинантной линии клеток CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ (клон 2D6) с обнаружением посредством проточной цитометрии (FACS), где антитела к α , β и γ -субъединицам рецептора IL-2 приобретены у BioLegend; и контроль относится к уровню экспрессии соответствующих рецепторов в нерекомбинантных клетках CHO-K1.

На фиг. 4А показан уровень экспрессии белка α -субъединицы рецептора IL-2.

На фиг. 4В показан уровень экспрессии белка β -субъединицы рецептора IL-2.

На фиг. 4С показан уровень экспрессии белка γ -субъединицы рецептора IL-2.

На фиг. 5 показана связывающая активность мутантного белка IL-2 с $\alpha\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 и $\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 в рекомбинантных клетках CHO-K1 с обнаружением посредством проточной цитометрии (FACS).

На фиг. 5А показана связывающая активность mut7.36-линкер2-hFc, mut11.08-линкер2-hFc, mut61-линкер2-hFc, mut61.08-линкер2-hFc или mut61.46-линкер2-hFc с $\alpha\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 в рекомбинантных клетках CHO-K1.

На фиг. 5В показана связывающая активность mut11.31-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc с $\alpha\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 в рекомбинантных клетках CHO-K1.

На фиг. 5С показана связывающая активность mut7.36-линкер2-hFc, mut11.08-линкер2-hFc, mut61-линкер2-hFc, mut61.08-линкер2-hFc или mut61.46-линкер2-hFc с $\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 в рекомбинантных клетках CHO-K1.

На фиг. 5D показана связывающая активность mut11.31-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc с $\beta\gamma$ -субъединицами рецептора IL-2 в рекомбинантных клетках CHO-K1.

На фиг. 6 показан эффект мутантного белка IL-2 на уровень фосфорилирования STAT5 в Treg (фиг. 6А-6С), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻Т-клетках (фиг. 6D-6F) и CD8⁺ Т-клетках (фиг. 6G-6I);

На фиг. 6А показан эффект mut7.36-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования STAT5 в Treg.

На фиг. 6В показан эффект mut11.08-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования

STAT5 в Treg.

На фиг. 6C показан эффект mut11.31-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования STAT5 в Treg.

На фиг. 6D показан эффект mut7.36-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клетках.

На фиг. 6E показан эффект mut11.08-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клетках.

На фиг. 6F показан эффект mut11.31-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клетках.

На фиг. 6G показан эффект mut7.36-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD8⁺ Т-клетках.

На фиг. 6H показан эффект mut11.08-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD8⁺ Т-клетках.

На фиг. 6I показан эффект mut11.31-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень фосфорилирования в CD8⁺ Т-клетках.

На фиг. 7 показан эффект мутантного белка IL-2 на уровень пролиферации Treg-клеток (фиг. 7A-7B), CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клеток (фиг. 7C-7D) и CD8⁺CD25⁻Т-клеток (фиг. 7E-7F).

На фиг. 7A показан эффект mut7.36-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень пролиферации Treg.

На фиг. 7B показан эффект mut11.08-линкер2-hFc или mut11.31-линкер2-hFc на уровень пролиферации Treg.

На фиг. 7C показан эффект mut7.36-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень пролиферации CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клеток.

На фиг. 7D показан эффект mut11.08-линкер2-hFc или mut11.31-линкер2-hFc на уровень пролиферации CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клеток.

На фиг. 7E показан эффект mut7.36-линкер2-hFc или mut7.66-линкер2-hFc на уровень пролиферации CD8⁺CD25⁻Т-клеток.

На фиг. 7F показан эффект mut11.08-линкер2-hFc или mut11.31-линкер2-hFc на уровень пролиферации CD8⁺CD25⁻Т-клеток.

На фиг. 8 показан эффект мутантного белка IL-2 на уровень пролиферации NK-клеток.

На фиг. 9А показана процентная доля Treg от CD4⁺ Т-клеток в селезенке.

На фиг. 9В показана процентная доля клеток CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ от CD4⁺ клеток в селезенке.

На фиг. 9С показана процентная доля CD3⁺CD4⁻ клеток от CD3⁺ клеток в селезенке.

На фиг. 10А показана процентная доля Treg от CD4⁺ Т-клеток в селезенке.

На фиг. 10В показана процентная доля CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ клеток от CD4⁺ клеток в периферической крови.

На фиг. 10С показана процентная доля CD3⁺CD4⁻ клеток от CD3⁺ клеток в периферической крови.

На фиг. 11А показано изменение Δ толщины уха у разных групп моделей DTH на мышах дикого типа, где Δ толщина уха относится к изменению толщины правого уха до и после стимуляции.

На фиг. 11В показано изменение веса тела у разных групп моделей DTH на мышах дикого типа.

На фиг. 12А показано изменение Δ толщины уха у разных групп моделей DTH на мышах дикого типа, где Δ толщина уха относится к изменению толщины правого уха до и после стимуляции.

На фиг. 12В показано изменение веса тела у разных групп моделей DTH на мышах дикого типа.

На фиг. 13А показано отношение Treg/Tcon у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 13В показано отношение Treg/CD8⁺ у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 14А показано число Treg у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 14В показано число Tcon у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 14С показано число CD8⁺ клеток у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 15А показано изменение веса тела у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 15В показаны баллы GVHD у разных групп мышей линии NOG.

На фиг. 16А показана концентрация лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа после подкожного введения.

На фиг. 16В показана концентрация лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа после подкожного введения.

На фиг. 17 показана концентрация лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа после внутривенного введения.

На фиг. 18 показана концентрация лекарственного средства в плазме крови у мышей, которым инокулировали клетки РВМС, после подкожного введения.

На фиг. 19 показана концентрация лекарственного средства в плазме крови у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20А показано число Treg у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20В показано кратное изменение числа Treg у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20С показана процентная доля Treg от CD4⁺ Т-клеток у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20D показана процентная доля Ki67⁺ Treg у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20Е показано кратное изменение средней интенсивности флуоресценции FoxP3 у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 20F показано кратное изменение средней интенсивности флуоресценции CD25 у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21А показано число клеток FoxP3⁺CD4⁺ у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21В показано кратное изменение числа FoxP3⁺CD4⁺ клеток у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21С показано число CD8⁺ Т-клеток у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21D показано кратное изменение числа CD8⁺ Т-клеток у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21Е показано число NK-клеток у яванских макаков после подкожного введения.

На фиг. 21F показано кратное изменение числа NK-клеток у яванских макаков после

подкожного введения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение будет дополнительно описано ниже со ссылкой на конкретные примеры. Преимущества и признаки настоящего изобретения прояснятся с помощью описания. Если в примерах не указаны конкретные условия, то следует соблюдать общепринятые условия или условия, предложенные изготовителем. Если изготовитель не указан, то применяемые реагенты или инструменты представляют собой общепринятые продукты, которые можно приобрести коммерческим путем.

Следующие примеры по настоящему изобретению являются всего лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что детали и формы технического решения по настоящему изобретению могут быть модифицированы или заменены без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения или выхода за его пределы, и все такие модификации и замены подпадают под действие объема защиты настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1. Конструкция мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью и конструирование экспрессионной плазмиды

Применяли различные алгоритмы для получения мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью, и соответствующие последовательности разрабатывали и синтезировали. Фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие IL-2 дикого типа и вышеупомянутые мутантные формы IL-2, клонировали в вектор pTT5 с Fc-меткой, а затем получали плазмиды, кодирующие следующие слитые белки, в соответствии с установленными стандартными способами молекулярной биологии: IL-2-линкер2-hFc, mut0.08-линкер2-hFc, mut0.31-линкер2-hFc, mut0.36-линкер2-hFc, mut0.39-линкер2-hFc, mut0.46-линкер2-hFc, mut0.57-линкер2-hFc, mut0.66-линкер2-hFc и mut0.68-линкер2-hFc.

Конкретные последовательности вышеупомянутых слитых белков и компонентов показаны в таблице 1, где "IL-2" представляет IL-2 дикого типа, а "mutXX" представляет

мутантные формы IL-2, в которых встречается мутация по сравнению с IL-2 дикого типа.

Таблица 1. Последовательности мутантных форм IL-2 с улучшенной стабильностью

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|----------------------------------|---------------|--|
| IL2 | SEQ ID NO: 1 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut0.08 (Y31V/A73L/ H79Q) | SEQ ID NO: 2 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut0.31 (Q13L) | SEQ ID NO: 3 | APTSSSTKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut0.36 (R120F) | SEQ ID NO: 4 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT |
| mut0.39 (L18I/V91A/F 117W) | SEQ ID NO: 5 | APTSSSTKKTQLQLEHL <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN <u>A</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVE <u>W</u> LNWRWITFAQSIISTLT |
| mut0.46 (L18I/I89L/V9 3I) | SEQ ID NO: 6 | APTSSSTKKTQLQLEHL <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN <u>L</u> N V <u>I</u> LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut0.57 (G27W/R120F) | SEQ ID NO: 7 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN <u>W</u> INNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT |
| mut0.66 (P82L/R120F) | SEQ ID NO: 8 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>L</u> RDLSININ VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT |
| mut0.68 (N90Y/R120F) | SEQ ID NO: 9 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI <u>Y</u> VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT |
| линкер2 | SEQ ID NO: 10 | GGGGSGGGGSGGGGS |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---|---------------------|---|
| hFc (C220S/N297 G) | SEQ ID NO: 11 | EPKSS <u>SDK</u> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK |
| IL2-линкер2- hFc, также известный как WT IL-2- линкер2- hFc(C220S/N2 97G) | SEQ ID NO: 12 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut0.08- линкер2-hFc (Y31V/A73L/ H79Q) | SEQ ID NO: 13 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN <u>L</u> LQSKNF <u>Q</u> LRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut0.31- линкер2-hFc (Q13L) | SEQ ID NO: 14 | APTSSSTKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---------------------------------------|---------------|---|
| | | SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut0.36-линкер2-hFc (R120F) | SEQ ID NO: 15 | <p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGGG</p> <p><u>SGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD</u></p> <p>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| mut0.39-линкер2-hFc (L18I/V91A/F117W) | SEQ ID NO: 16 | <p>APTSSSTKKTQLQLEHLILDLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN AIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEWLNRWITFAQSIISTLTGGG</p> <p><u>GSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD</u></p> <p>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| mut0.46-линкер2-hFc (L18I/I89L/V93I) | SEQ ID NO: 17 | <p>APTSSSTKKTQLQLEHLILDLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNLN VIILELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGG</p> <p><u>SGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD</u></p> <p>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| mut0.57-линкер2-hFc (G27W/R120F) | SEQ ID NO: 18 | <p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNWINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGG</p> <p><u>GSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD</u></p> |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---|---------------------|---|
| | | DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut0.66- линкер2-hFc (P82L/R120F) | SEQ ID NO: 19 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>L</u> RD L ISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEPKSSDK</u> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut0.68- линкер2-hFc (N90Y/R120F) | SEQ ID NO: 20 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI <u>Y</u> VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEPKSSDK</u> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

ПРИМЕР 2. Получение и очистка мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью

Клетки HEK293 (приобретенные в Банке клеток Китайской академии наук) подвергали временной трансфекции (PEI, Polysciences) с помощью плазмид, сконструированных в примере 1, а затем клетки размножали при 37°C в среде для экспрессии FreeStyle TM 293 (приобретена у Gibco). Спустя 7 дней культуральную среду клеток собирали и компоненты клеток удаляли с помощью центрифугирования с получением надосадочной жидкости

культуры, содержащей слитые белки IL-2-hFc.

Слитые белки в надосадочной жидкости клеточной культуры очищали с использованием колонки с белком А объемом 10 мл (приобретена у Bestchrom). Колонку с белком А сначала уравнивали 3-5 объемами колонки равновесного буфера (фосфатный буфер PBS, pH 7,4), а затем загружали чистой культуральной надосадочной жидкостью при скорости потока, составляющей 10 мл/мин. После загрузки колонку с белком А промывали 3-5 объемами колонки равновесного буфера. Белки, связавшиеся с колонкой с белком А, элюировали с помощью элюирующего буфера (0,02 М буфер на основе лимонной кислоты, 0,1 М глицина, 0,1 М хлорида натрия, pH 3,0) и элюирование контролировали с помощью детектора нуклеиновых кислот/белков (пик ультрафиолетового поглощения A280). Элюированные белки собирали и нейтрализовали с помощью добавленного буфера (1 М аргинина, 0,4 М янтарной кислоты, pH 9,0). Затем целевые белки собирали через молекулярное сито (приобретено у Bestchrom) с помощью буферной системы (20 мМ РВ, 200 мМ хлорида натрия, pH 6,0-6,5). Очищенные слитые белки мутантной формы IL-2 получали с помощью асептической фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм и сохраняли в стерильных условиях.

Очищенные слитые белки мутантной формы IL-2 тестировали и анализировали в отношении выхода белка, концентрации (A280/1.4) и чистоте по SEC. Определяли характеристики очищенных слитых белков мутантной формы IL-2 с улучшенной термостабильностью (mutXX-линкер2-hFc), и они характеризовались значительно более высоким уровнем выхода по сравнению с IL-2 дикого типа (IL2-линкер2-hFc). Результаты по выходу, концентрации и чистоте белка показаны в таблице 2.

Таблица 2. Результаты обнаружения слитых белков мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью

| Мутантная форма | Выход белка (мг/л) | Чистота белка по SEC | Концентрация белка (мг/мл) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| IL-2-линкер2-hFc | 0,95 | 97,25% | 1,11 |
| mut0.08-линкер2-hFc | 8,95 | 99,85% | 1,79 |
| mut0.31-линкер2-hFc | 1,54 | 98,49% | 2,20 |
| mut0.36-линкер2-hFc | 2,98 | 99,99% | 1,49 |

| Мутантная форма | Выход белка (мг/л) | Чистота белка по SEC | Концентрация белка (мг/мл) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| mut0.39-линкер2-hFc | 43,10 | 99,58% | 2,13 |
| mut0.46-линкер2-hFc | 13,82 | 99,92% | 1,22 |
| mut0.57-линкер2-hFc | 1,25 | 99,91% | 0,89 |
| mut0.66-линкер2-hFc | 7,39 | 99,90% | 1,12 |
| mut0.68-линкер2-hFc | 11,90 | 99,99% | 1,19 |

ПРИМЕР 3. Анализ мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF)

Буфер в наборе красителя Protein Thermal Shift (приобретен у Applied Biosystems, № по кат. 4461146), разведенный в 50 раз, мутантные белки IL-2 (очищенные с помощью способа, описанного в примере 2), разведенные до концентрации 0,5 мг/мл, и краситель, разбавленный в 2 раза, вносили в реакционную систему объемом 20 мкл. После равномерного перемешивания смесь вносили в стрипы из 8 пробирок, содержащие по 2 дублирующие пробирки для каждого образца. Пробирки закрывали, центрифугировали в течение 5-10 секунд и проводили анализ с помощью Applied Biosystems 7500. Затем с использованием метода Больцмана для анализа кривой плавления получали значения T_m . Как показано в таблице 3, по сравнению с IL-2 дикого типа (IL2-линкер2-hFc) мутантные формы IL-2 (mutXX-линкер2-hFc) характеризовались значениями T_m , повышенными более чем на 3°C, и, таким образом, характеризовались значительно улучшенной термостабильностью.

Таблица 3. Результаты анализа DSF мутантных форм IL-2 с улучшенной термостабильностью

| Мутантная форма | T_m (°C) |
|---------------------|------------|
| IL-2-линкер2-hFc | 46,74 |
| mut0.08-линкер2-hFc | 54,91 |
| mut0.31-линкер2-hFc | 57,53 |
| mut0.36-линкер2-hFc | 56,59 |
| mut0.39-линкер2-hFc | 55,93 |

| Мутантная форма | Tm (°C) |
|---------------------|---------|
| mut0.46-линкер2-hFc | 53,83 |
| mut0.57-линкер2-hFc | 57,98 |
| mut0.66-линкер2-hFc | 57,24 |
| mut0.68-линкер2-hFc | 54,77 |

ПРИМЕР 4. Конструкция мутантных форм IL-2 (мутантные формы IL-2 со сниженной связывающей способностью в отношении $\beta\gamma$ -субъединиц и мутантные формы IL-2 со сниженной связывающей способностью в отношении $\beta\gamma$ -субъединицами и с улучшенной термостабильностью) и конструирование экспрессионной плазмиды

Различные алгоритмы, включая программное обеспечение МОЕ, использовали для моделирования интерфейса взаимодействия между IL-2 человека и соответствующими α -, β - и γ -субъединицами рецептора для получения сайтов мутаций, характеризующихся сниженной связывающей способностью в отношении $\beta\gamma$ -субъединиц. Конструировали и синтезировали вместе последовательности мутантных форм IL-2 с сайтами мутаций, характеризующимися сниженной активностью связывания с $\beta\gamma$ -субъединицами, вместе с последовательностями мутантных форм IL-2 с комбинацией таких сайтов мутаций с сайтами мутаций, характеризующимися улучшенной термостабильностью. Фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие IL-2 дикого типа и вышеупомянутые мутантные формы IL-2, клонировали в вектор pTT5 с Fc-меткой, а затем получали плазмиды, кодирующие следующие слитые белки, в соответствии с установленными стандартными способами молекулярной биологии: IL-2-линкер2-hFc, mut7-линкер2-hFc, mut7.08-линкер2-hFc, mut7.36-линкер2-hFc, mut7.39-линкер2-hFc, mut7.46-линкер2-hFc, mut7.57-линкер2-hFc, mut7.66-линкер2-hFc, mut8-линкер2-hFc, mut8.08-линкер2-hFc, mut8.36-линкер2-hFc, mut11-линкер2-hFc, mut11.08-линкер2-hFc, mut11.31-линкер2-hFc, mut11.36-линкер2-hFc, mut11.46-линкер2-hFc, mut61-линкер2-hFc, mut61.08-линкер2-hFc и mut61.46-линкер2-hFc. Конкретные последовательности слитых белков и компонентов показаны в таблице 4, где "IL-2" представляет IL-2 дикого типа, а "mutXX" представляет мутантные формы IL-2, в которых происходит мутация по сравнению с IL-2 дикого типа.

Таблица 4. Последовательности мутантных форм IL-2

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|--------------------------------|---------------|--|
| IL2 | SEQ ID NO: 1 | Показана в таблице 1 |
| mut7 (H16E) | SEQ ID NO: 21 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut7.08 (H16E/Y31V/A73L/H79Q) | SEQ ID NO: 22 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN <u>L</u> LQSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut7.36 (H16E/R120F) | SEQ ID NO: 23 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT |
| mut7.39 (H16E/L18I/V91A/F117W) | SEQ ID NO: 24 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>A</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVE <u>W</u> LNRWITFAQSIIS TLT |
| mut7.46 (H16E/L18I/I89L/V93I) | SEQ ID NO: 25 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>L</u> NV <u>I</u> LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut7.57 (H16E/G27W/R120F) | SEQ ID NO: 26 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILN <u>W</u> INNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIS TLT |
| mut7.66 (H16E/P82L/R120F) | SEQ ID NO: 27 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>L</u> RDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT |
| mut8 (D20A) | SEQ ID NO: 28 | APTSSSTKKTQLQLEHLLL <u>A</u> LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---------------------------------------|------------------|--|
| | | ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut8.08 (D20A/Y31V/A7 3L/H79Q) | SEQ ID NO: 29 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLL <u>A</u> LQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut8.36 (D20A/R120F) | SEQ ID NO: 30 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLL <u>A</u> LQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT |
| mut11 (V91R) | SEQ ID NO: 31 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut11.08 (V91R/Y31V/A7 3L/H79Q) | SEQ ID NO: 32 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut11.31 (V91R/Q13L) | SEQ ID NO: 33 | APTSSSTKKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut11.36 (V91R/R120F) | SEQ ID NO: 34 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT |
| mut11.46 (V91R/L18I/I89 L/V93I) | SEQ ID NO: 35 | APTSSSTKKKTQLQLEHL <u>I</u> LDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>L</u> N <u>R</u> I <u>I</u> LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT |
| mut61 (H16E/V91R) | SEQ ID NO:36 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|--|---------------|---|
| | | ISNIN <u>R</u> IVLELEKGGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut61.08 (H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q) | SEQ ID NO:37 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNVKPNKLRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELEKGGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| mut61.46 (H16E/V91R/L18I/I89L/V93I) | SEQ ID NO:38 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> <u>L</u> LDLQMILNGINNYKPNKLRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>L</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>I</u> LELEKGGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT |
| линкер2 | SEQ ID NO:10 | Показана в таблице 1 |
| hFc (C220S/N297G) | SEQ ID NO:11 | Показана в таблице 1 |
| IL2-линкер2-hFc | SEQ ID NO: 12 | Показана в таблице 1 |
| mut7-линкер2-hFc (H16E) | SEQ ID NO:39 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKPNKLRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELEKGGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.08-линкер2-hFc (H16E/Y31V/A73L/H79Q) | SEQ ID NO:40 | APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNVKPNKLRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNINVIVLELEKGGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---|------------------|---|
| | | LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.36- линкер2-hFc (H16E/R120F) | SEQ ID NO: 41 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>EL</u> LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKS <u>SD</u> KTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.39- линкер2-hFc (H16E/L18I/V91 A/F117W) | SEQ ID NO: 42 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>EL</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>A</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVE <u>W</u> LNRWITFAQSIIS TL <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKS <u>SD</u> KTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.46- линкер2-hFc (H16E/L18I/I89 L/V93I) | SEQ ID NO: 43 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>EL</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>L</u> NV <u>I</u> IILELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKS <u>SD</u> KTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.57- линкер2-hFc (H16E/G27W/R) | SEQ ID NO:44 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>EL</u> LLDLQMILN <u>W</u> INNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIS |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|--|------------------|---|
| 120F) | | TLT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut7.66- линкер2-hFc (H16E/P82L/R1 20F) | SEQ ID NO: 45 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>L</u> RD ISNINVIVLELELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut8-линкер2- hFc (D20A) | SEQ ID NO:46 | APTSSSTKKKTQLQLEHLL <u>L</u> ALQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut8.08- линкер2-hFc (D20A/Y31V/A7 3L/H79Q) | SEQ ID NO:47 | APTSSSTKKKTQLQLEHLL <u>L</u> ALQMLNGINNVKPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN <u>L</u> LQSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNINVIVLELELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---|------------------|--|
| | | SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut8.36- линкер2-hFc (D20A/R120F) | SEQ ID NO:48 | APTSSSTKKTQLQLEHLLL <u>AL</u> QMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut11-линкер2- hFc (V91R) | SEQ ID NO:49 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut11.08- линкер2-hFc (V91R/Y31V/A7 3L/H79Q) | SEQ ID NO: 50 | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut11.31- линкер2-hFc (V91R/Q13L) | SEQ ID NO: 51 | APTSSSTKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPK <u>SS</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|---|------------------|---|
| | | VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| mut11.36- линкер2-hFc (V91R/R120F) | SEQ ID NO:52 | APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>E</u> WITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| mut11.46- линкер2- hFc(V91R/L18I/ I89L/V93I) | SEQ ID NO: 53 | APTSSSTKKKTQLQLEHLILDLMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>LNR</u> IILELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| mut61-линкер2- hFc (H16E/V91R) | SEQ ID NO:54 | APTSSSTKKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |

| Мутантная форма | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|--|-----------------|--|
| mut61.08- линкер2-hFc (H16E/V91R/Y3 1V/A73L/H79Q) | SEQ ID NO:55 | APTSSSTKKTQLQLE <u>EL</u> LLDLQMILNGINNVKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLLQSKNFQLRPRDL ISNIN <u>R</u> IVLELEKLGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKS <u>S</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| mut61.46- линкер2-hFc (H16E/V91R/L1 8I/I89L/V93I) | SEQ ID NO:56 | APTSSSTKKTQLQLE <u>EL</u> LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISN <u>L</u> N <u>R</u> I <u>I</u> LELEKLGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEPKS <u>S</u> DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

ПРИМЕР 5. Получение и очистка мутантных форм IL-2

Клетки HEK293 (приобретенные в Банке клеток Китайской академии наук) подвергали временной трансфекции (PEI, polysciences) с помощью плазмид, сконструированных в примере 4, а затем клетки размножали при 37°C в среде для экспрессии FreeStyle TM 293 (приобретена у Gibco). Спустя 7 дней культуральную среду клеток собирали и компоненты клеток удаляли с помощью центрифугирования с получением надосадочной жидкости культуры, содержащей слитые белки IL-2-hFc.

Слитые белки в надосадочной жидкости клеточной культуры очищали с использованием колонки с белком А объемом 10 мл (приобретена у Westchrom). Колонку с белком А сначала уравнивали 3-5 объемами колонки равновесного буфера (фосфатный буфер PBS, pH 7,4), а затем загружали чистой культуральной надосадочной жидкостью при

скорости потока, составляющей 10 мл/мин. После загрузки колонку с белком А промывали 3-5 объемами колонки равновесного буфера. Белок, связавшийся с колонкой с белком А, элюировали с помощью элюирующего буфера (0,02 М буфер на основе лимонной кислоты, 0,1 М глицина, 0,1 М хлорида натрия, pH 3,0) и элюирование контролировали с помощью детектора нуклеиновых кислот/белков (пик ультрафиолетового поглощения A280). Элюированные белки собирали и нейтрализовали с помощью добавленного буфера (1 М аргинина, 0,4 М янтарной кислоты, pH 9,0). Затем целевые белки собирали через молекулярное сито (приобретено у Bestchrom) с помощью буферной системы (20 mM PB, 200 mM хлорида натрия, pH 6,0-6,5). Очищенные слитые белки мутантной формы IL-2 получали с помощью асептической фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм и сохраняли в стерильных условиях.

Очищенные слитые белки мутантной формы IL-2 (mutXX-линкер2-hFc) анализировали в отношении концентрации белка (A280/1.4) и чистоты по SEC. Определяли характеристики очищенных слитых белков мутантных форм IL-2. Результаты выхода и концентрации показаны в таблице 5.

Таблица 5. Результаты обнаружения слитых белков мутантных форм IL-2

| Мутантная форма | Чистота белка по SEC | Концентрация белка (мг/мл) |
|---------------------|----------------------|----------------------------|
| IL-2-линкер2-hFc | 97,25% | 1,11 |
| mut7-линкер2-hFc | 100% | 0,97 |
| mut7.08-линкер2-hFc | 99,84% | 1,73 |
| mut7.36-линкер2-hFc | 99,94% | 2,40 |
| mut7.39-линкер2-hFc | 99,77% | 1,16 |
| mut7.46-линкер2-hFc | 99,90% | 1,28 |
| mut7.57-линкер2-hFc | 99,89% | 1,37 |
| mut7.66-линкер2-hFc | 99,89% | 1,92 |
| mut8-линкер2-hFc | 97,19% | 0,98 |
| mut8.08-линкер2-hFc | - | 0,82 |
| mut8.36-линкер2-hFc | - | 1,65 |
| mut11-линкер2-hFc | 99,13% | 1,65 |

| Мутантная форма | Чистота белка по SEC | Концентрация белка (мг/мл) |
|----------------------|----------------------|----------------------------|
| mut11.08-линкер2-hFc | 99,88% | 1,29 |
| mut11.31-линкер2-hFc | 100,00% | 1,37 |
| mut11.36-линкер2-hFc | 99,97% | 1,15 |
| mut11.46-линкер2-hFc | 99,90% | 1,52 |
| mut61-линкер2-hFc | 99,93% | 1,36 |
| mut61.08-линкер2-hFc | 99,99% | 1,15 |
| mut61.46-линкер2-hFc | 99,99% | 1,30 |

ПРИМЕР 6. Анализ мутантных форм IL-2 с помощью DSF

Буфер в наборе красителя Protein Thermal Shift (приобретен у Applied Biosystems, № по кат. 4461146), разведенный в 50 раз, мутантные белки IL-2 (очищенные в примере 5), разведенные до концентрации 0,5 мг/мл, и краситель, разбавленный в 2 раза, вносили в реакционную систему объемом 20 мкл. После равномерного перемешивания смесь вносили в стрипы из 8 пробирок, содержащие по 2 дублирующие пробирки для каждого образца. Пробирки закрывали, центрифугировали в течение 5-10 секунд и проводили анализ с помощью Applied Biosystems 7500. Затем с использованием метода Больцмана для анализа кривой плавления получали значения T_m . Конкретные значения T_m показаны в таблице 6.

В соответствии с результатами, показанными в таблице 6, по сравнению с IL-2 дикого типа (IL2-линкер2-hFc) мутантные формы IL-2 (mutXX-линкер2-hFc) из примеров 4-5 характеризовались значениями T_m , увеличенными более чем на 5°C, а некоторые мутантные формы IL-2 характеризовались значениями T_m , увеличенными более чем на 9°C. Как можно видеть, все мутантные формы характеризовались значительно улучшенной термостабильностью.

Удивительно, что по сравнению с IL-2 дикого типа мутантные формы IL-2 со сниженной связывающей способностью в отношении $\beta\gamma$ -субъединиц характеризовались более высокими значениями T_m и улучшенной термостабильностью. Мутантные формы, в которых дополнительно скомбинированы мутации в отношении термостабильности, сохраняли высокие значения T_m , а некоторые из мутантов с комбинированными мутациями в отношении термостабильности по-прежнему характеризовались значениями T_m ,

увеличенными на более чем 2°C и вплоть до 6°C по сравнению с мутантными формами IL-2, содержащими только мутации, которые снижают связывающую способность с $\beta\gamma$ -субъединицами, и термостабильность была дополнительно улучшена.

Таблица 6. Результаты анализа мутантных форм IL-2 с помощью DSF

| Мутантная форма | T _m (°C) |
|----------------------|---------------------|
| IL-2-линкер2-hFc | 45,95 |
| mut7-линкер2-hFc | 51,08 |
| mut7.08-линкер2-hFc | 54,70 |
| mut7.36-линкер2-hFc | 56,95 |
| mut7.57-линкер2-hFc | 57,54 |
| mut7.66-линкер2-hFc | 56,64 |
| mut8-линкер2-hFc | 55,24 |
| mut8.08-линкер2-hFc | 55,32 |
| mut8.36-линкер2-hFc | 56,84 |
| mut11-линкер2-hFc | 56,63 |
| mut11.08-линкер2-hFc | 58,80 |
| mut11.31-линкер2-hFc | 59,37 |
| mut11.36-линкер2-hFc | 57,56 |
| IL-2-линкер2-hFc | 46,74 |
| mut7-линкер2-hFc | 51,05 |
| mut7.39-линкер2-hFc | 56,30 |
| mut7.46-линкер2-hFc | 54,84 |
| mut11-линкер2-hFc | 57,17 |
| mut11.46-линкер2-hFc | 57,02 |
| IL-2-линкер2-hFc | 46,86 |
| mut61-линкер2-hFc | 56,84 |
| mut61.08-линкер2-hFc | 57,71 |
| mut61.46-линкер2-hFc | 56,84 |

ПРИМЕР 7. Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток, сверхэкспрессирующих рецептор IL-2 человека или мыши.

А. Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток,

сверхэкспрессирующих α -субъединицу рецептора IL-2 человека.

Аминокислотную последовательность α -субъединицы рецептора IL-2 человека (номер доступа гена в NCBI P01589, конкретная последовательность показана под SEQ ID NO: 57) клонировали в вектор pLVX-IRES-Puro (приобретен у YouBio, № по кат. VT1464) для упаковки в лентивирусный вектор. Затем линию клеток CHO-K1 (приобретена в Банке клеток Китайской академии наук) трансфицировали с помощью лентивируса. После трансфекции с помощью вируса в течение 72 часов клетки CHO подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии с известным антителом к α -субъединице рецептора IL-2 (№ артикула 302606, приобретено у BioLegend). Когда обнаруживали, что трансфицированные клетки начинают экспрессировать α -субъединицу рецептора IL-2 человека, для скрининга затем добавляли пурамицин (приобретен у Gibco). После извлечения клеток их субклонировали в 96-луночные культуральные планшеты путем предельного разведения и культивировали при 37°C с 5% (об./об.) CO₂. После приблизительно 2 недель отбирали и подвергали размножению в 6-луночных планшетах некоторые моноклональные клетки. Размноженные клоны подвергали дополнительному скринингу посредством проточной цитометрии с известным антителом к α -субъединице рецептора IL-2. Линии моноклональных клеток с лучшим ростом и более высокой интенсивностью флуоресценции отбирали для дополнительного размножения, повторно обнаруживали посредством проточной цитометрии и затем замораживали в жидком азоте с получением линий стабильно трансфицированных клеток, экспрессирующих α -субъединицу рецептора IL-2 человека. Конкретные результаты отбора показаны в таблице 7 и на фиг. 1. Положительные клетки (%) в таблице 7 относятся к процентной доле положительных клеток от общего числа клеток. В таблице 7 показано, что была получена серия линий клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих α -субъединицу рецептора IL-2.

Таблица 7. Определение характеристик клеток CHO-K1, экспрессирующих α -субъединицу рецептора IL-2 человека, с помощью FACS

| Номер п/п | Название клона трансфицированных клеток | Антитело к α -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | |
|-----------|---|---|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции |
| 1 | CHO-K1 hIL-2R α 1A6 | 100,00 | 38168 | - | - |
| 2 | CHO-K1 hIL-2R α 2D2 | 100,00 | 21817 | - | - |
| 3 | CHO-K1 hIL-2R α 2D5 | 100,00 | 18111 | - | - |
| 4 | CHO-K1 hIL-2R α 2B8 | 99,80 | 19018 | 0,04 | 80,70 |

А. Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток, сверхэкспрессирующих β -субъединицу рецептора IL-2 человека.

Аминокислотную последовательность β -субъединицы рецептора IL-2 человека (номер доступа гена в NCBI P14784, конкретная последовательность показана под SEQ ID NO: 58) клонировали в вектор pLVX-IRES-Puro (приобретен у YouBio, № по кат. VT1464) для упаковки в лентивирусный вектор. Затем линию клеток CHO-K1 (приобретена в Банке клеток Китайской академии наук) трансфицировали с помощью лентивируса. После трансфекции с помощью вируса в течение 72 часов клетки CHO-K1 подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии с известным антителом к β -субъединице рецептора IL-2 (№ артикула 339010, приобретено у BioLegend). Когда обнаруживали, что трансфицированные клетки начинают экспрессировать β -субъединицу рецептора IL-2 человека, для скрининга затем добавляли пурамицин (приобретен у Gibco). После извлечения клеток их субклонировали в 96-луночные культуральные планшеты путем предельного разведения и культивировали при 37°C с 5% (об./об.) CO₂. После приблизительно 2 недель отбирали и подвергали размножению в 6-луночных планшетах некоторые моноклональные клетки. Размноженные клоны подвергали дополнительному скринингу посредством проточной цитометрии с известным антителом к β -субъединице рецептора IL-2. Линии моноклональных клеток с лучшим ростом и более высокой интенсивностью флуоресценции отбирали для дополнительного размножения, повторно подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии и затем замораживали в

жидком азоте с получением линий стабильно трансфицированных клеток, экспрессирующих β -субъединицу рецептора IL-2 человека. Конкретные результаты отбора показаны в таблице 8 и на фиг. 2. Положительные клетки (%) в таблице 8 относятся к процентной доле положительных клеток от общего числа клеток. В таблице 8 показано, что была получена серия линий клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих β -субъединицу рецептора IL-2.

Таблица 8. Определение характеристик клеток CHO-K1, экспрессирующих β -субъединицу рецептора IL-2 человека, с помощью FACS

| Номер п/п | Клон трансфицированной клетки | Антитело к β -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | |
|-----------|-------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции |
| 1 | CHO-K1 hIL-2R β 2A5 | 100,00 | 7905 | - | - |
| 2 | CHO-K1 hIL-2R β 2B3 | 99,40 | 5081 | 0,03 | 41,50 |
| 3 | CHO-K1 hIL-2R β 2H4 | 99,40 | 1226 | - | - |

С. Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток, сверхэкспрессирующих β -субъединицы рецептора IL-2 человека.

Аминокислотную последовательность γ -субъединицы рецептора IL-2 человека (номер доступа гена в NCBI P31785, конкретная последовательность показана под SEQ ID NO: 59) клонировали в вектор pLVX-IRES-Hygro для упаковки в лентивирусный вектор. Затем линию клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующую β -субъединицу рецептора IL-2 человека (CHO-K1 hIL-2R β , клон 2A5), трансфицировали с помощью лентивируса. После трансфекции с помощью вируса в течение 72 часов клетки CHO-K1 подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии с известными антителами к β и γ -субъединицам рецептора IL-2 (№ артикула 339010 и 338608, приобретены у BioLegend). Когда обнаруживали, что трансфицированные клетки начинают экспрессировать β -субъединицы рецептора IL-2 человека, для скрининга затем добавляли пурамицин и

гигромицин (приобретены у Gibco, Thermo). После извлечения клеток их субклонировали в 96-луночные культуральные планшеты путем предельного разведения и культивировали при 37°C с 5% (об./об.) CO₂. После приблизительно 2 недель отбирали и подвергали размножению в 6-луночных планшетах некоторые моноклональные клетки. Размноженные клоны подвергали скринингу посредством проточной цитометрии с известными антителами к β и γ -субъединицам рецептора IL-2. Линии моноклональных клеток с лучшим ростом и более высокой интенсивностью флуоресценции отбирали для дополнительного размножения, повторно подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии и затем замораживали в жидком азоте с получением линий стабильно трансфицированных клеток, экспрессирующих $\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека. Конкретные результаты отбора показаны в таблице 9 и на фиг. 3А - фиг. 3В. Положительные клетки (%) в таблице 9 относятся к процентной доле положительных клеток от общего числа клеток. В таблице 9 показано, что была получена серия линий клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих $\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2.

Таблица 9. Определение характеристик клеток CHO-K1, экспрессирующих $\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека, с помощью FACS

| Номер п/п | Клон трансфицированной клетки | Антитело к β -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | | Антитело к γ -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | |
|-----------|--|--|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции |
| 1 | CHO-K1 IL-2R $\beta\gamma$ 2D3 | 100,00 | 4569 | 0,65 | 115 | 98,90 | 8932 | 23,30 | 1070 |
| 2 | CHO-K1 hIL-2R $\beta\gamma$ 2C11 | 99,70 | 2111 | - | - | 99,00 | 31664 | - | - |

| Номер п/п | Клон трансфицированной клетки | Антитело к β -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | | Антитело к γ -субъединице рецептора IL-2 | | Подтип IgG в качестве контроля | |
|-----------|--------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции |
| 3 | CHO-K1 IL-2R $\beta\gamma$ 2E6 | 100,00 | 2909 | - | - | 98,80 | 11764 | - | - |

D. Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток, сверхэкспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека.

Аминокислотную последовательность α -субъединицы рецептора IL-2 человека клонировали в вектор pLVX-IRES-zsGreen для упаковки в лентивирусный вектор. Линию клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих $\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека, трансфицировали с помощью лентивируса. После трансфекции с помощью вируса в течение 72 часов клетки CHO-K1 подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии с известными антителами к α -, β - и γ -субъединицам рецептора IL-2 (там же, приобретены у BioLegend). Когда обнаруживали, что трансфицированные клетки начинают экспрессировать $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека, для скрининга затем добавляли пурамицин, гигромицин (приобретены у Gibco, Thermo) и GFP (для экспрессии флуоресцентного белка). После извлечения клеток их субклонировали в 96-луночные культуральные планшеты путем предельного разведения и культивировали при 37°C с 5% (об./об.) CO₂. После приблизительно 2 недель отбирали и подвергали размножению в 6-луночных планшетах некоторые моноклональные клетки. Размноженные клоны подвергали скринингу посредством проточной цитометрии с известными антителами к α -, β - и γ -субъединицам рецептора IL-2. Линии моноклональных клеток с лучшим ростом и более высокой интенсивностью флуоресценции отбирали для дополнительного размножения, повторно подвергали обнаружению посредством проточной цитометрии и затем

замораживали в жидком азоте с получением линий стабильно трансфицированных клеток, экспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека. Конкретные результаты отбора показаны в таблице 10 и на фиг. 4А - фиг. 4С. Положительные клетки (%) в таблице 10 относятся к процентной доле положительных клеток от общего числа клеток. В таблице 10 показано, что была получена серия линий клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2.

Таблица 10. Определение характеристик клеток CHO-K1, экспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 человека, с помощью FACS

| Номер п/п | Клон трансфицированной клетки | Антитело к α -субъединице рецептора IL-2 | | Антитело к β -субъединице рецептора IL-2 | | Антитело к γ -субъединице рецептора IL-2 | |
|-----------|--|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| | | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции | Положительные клетки (%) | Средняя интенсивность флуоресценции |
| 1 | CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 1E3 | 99,90 | 10667 | 100,00 | 3002 | 99,90 | 14863 |
| 2 | CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 2D6 | 99,90 | 5265 | 99,90 | 1324 | 99,80 | 2575 |
| 3 | CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 1A10 | 100,00 | 12255 | 88,60 | 465 | 99,60 | 4106 |

Таблица 11. Гены, использованные при конструировании стабильно трансфицированных линий клеток в примере 7 (A-D), и информация о последовательностях кодируемых ими белков

| Ген | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|----------------|---------------|--|
| hIL2R α | SEQ ID NO: 57 | MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT PQPPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV |

| Ген | SEQ ID NO | Информация о последовательности |
|----------------|---------------|--|
| | | VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI |
| hIL2R β | SEQ ID NO: 58 | MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVE THRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWI CLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIP WLGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQ LSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEED PDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLFSPSLLGGPSPP STAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLS LQELQGQDPTHLV |
| hIL2R γ | SEQ ID NO: 59 | MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSL SVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDND KVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQML KLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWD HSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNPLCGSAQHWSEWS HPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGG ALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET |

ПРИМЕР 8. Определение связывающей активности мутантной формы IL-2 в отношении клеток, экспрессирующих рецептор, посредством проточной цитометрии (FACS)

Клетки CHO-K1, экспрессирующие $\alpha\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 (CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 2D6), или клетки CHO-K1, экспрессирующие $\beta\gamma$ -субъединицы рецептора IL-2 (CHO-K1 hIL-2R $\beta\gamma$ 2E6), подвергали размножению до 90% конfluence в колбах T-75 для

клеточных культур. Среду удаляли, а затем колбу один раз промывали буфером PBS (приобретен у Nyclone, № по кат. SH30256.01). Клетки обрабатывали с помощью 2 мл трипсина, содержащего 0,25% EDTA (приобретена у Invitrogen, № по кат. 25200072), в течение 2-3 минут, подвергали нейтрализации с помощью 8 мл DMEM/F-12 (приобретена у Gibco, № по кат. 12634-010), содержащей 10% (вес/вес) фетальной бычьей сыворотки (приобретена у Gibco, № по кат. 10099-141C), пипетировали 3-4 раза, затем собирали в 15-мл центрифужную пробирку, подсчитывали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. После отбрасывания культуральной среды клетки ресуспендировали в RPMI-1640, содержащей 2% (вес/вес) фетальной бычьей сыворотки (приобретена у Gibco, № по кат. A10491-01) и затем разводили до $1,43 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки вносили в 96-луночный реакционный планшет с U-образным дном для FACS по 70 мкл на лунку и помещали при 4°C или на лед для последующего применения. Подлежащие обнаружению мутантные формы IL-2 разводили с помощью RPMI-1640, содержащей 2% (вес/вес) фетальной бычьей сыворотки, добавляли в клетки по 30 мкл на лунку, хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшет дважды промывали буфером для FACS (буфер PBS, содержащий 2% (вес/вес) бычьего сывороточного альбумина). Вторичное антитело с флуоресцентной меткой (приобретено у Biolegend, № по кат. 409306) добавляли в планшет по 100 мкл на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем планшет дважды промывали буфером для FACS. Обнаружение и анализ выполняли посредством FACS (FACS Canto II, приобретен у компании BD). В качестве альтернативы клетки суспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего 2% (вес/вес) параформальдегида (приобретен у DingGuo, № по кат. AR-0211) и затем хранили при 4°C до дальнейшего обнаружения с помощью FACS. Перед обнаружением с помощью FACS в каждую лунку добавляли по 100 мкл буфера PBS. Обнаружение и анализ выполняли посредством FACS. Результаты показаны на фиг. 5A - фиг. 5D и в таблице 12 - таблице 13. Результаты показывают, что мутантные формы IL-2 могли связываться с тримером из $\alpha\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL-2 человека на поверхности клетки. Связывающая активность мутантных форм IL-2 с димером из $\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL-2 человека на клеточной поверхности была слабее, чем у IL-2

дикого типа. Связывающая активность mut61-линкер2-hFc, mut61.08-линкер2-hFc и mut61.46-линкер2-hFc с димером из $\beta\gamma$ -субъединиц IL-2R на CHO-K1 подвергалась сильному подавлению. MFI в следующих таблицах представляет собой среднее значение интенсивности флуоресценции у подвергнутых обнаружению популяций клеток.

Таблица 12. Связывающая активность мутантных форм IL-2 в отношении $\alpha\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL2 на рекомбинантной линии клеток CHO-K1 (CHO-K1 IL2R $\alpha\beta\gamma$) с обнаружением посредством FACS

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Концентрация белка (нМ) | 23,529 | 4,7059 | 0,9412 | 0,1882 | 0,0376 | 0,0075 | 0,0015 | 0,0003 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 25072 | 22623 | 22295 | 9026 | 1728 | 457 | 161 | 251 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 23892 | 19565 | 18132 | 9608 | 2416 | 570 | 272 | 171 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 22230 | 17370 | 14857 | 8713 | 2736 | 621 | 268 | 251 |
| Mut61-линкер2-hFc(MFI) | 23858 | 18259 | 16403 | 9188 | 2307 | 544 | 224 | 194 |
| Mut61.08-линкер2-hFc(MFI) | 22558 | 19652 | 18992 | 9557 | 2131 | 575 | 303 | 190 |
| Mut61.46-линкер2-hFc(MFI) | 24244 | 19701 | 19386 | 10124 | 2384 | 521 | 280 | 186 |
| Концентрация белка (нМ) | 26,667 | 5,3333 | 1,0667 | 0,2133 | 0,0427 | 0,0085 | 0,0017 | 0,0003 |
| IgG человека в качестве контроля | 118 | 124 | 157 | 181 | 274 | 119 | 120 | 146 |
| Концентрация белка (нМ) | 23,529 | 4,7059 | 0,9412 | 0,1882 | 0,0376 | 0,0075 | 0,0015 | 0,0003 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 17021 | 16362 | 15503 | 9402 | 1983 | 423 | 188 | 156 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 15503 | 11604 | 9659 | 7683 | 2485 | 568 | 227 | 177 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 13449 | 10906 | 9502 | 7521 | 2181 | 553 | 214 | 172 |
| Концентрация белка | 26,667 | 5,3333 | 1,0667 | 0,2133 | 0,0427 | 0,0085 | 0,0017 | 0,0003 |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (нМ) | | | | | | | | |
| IgG человека в качестве контроля | 187 | 136 | 138 | 139 | 144 | 145 | 140 | 146 |

Таблица 13. Связывающая активность мутантных форм IL-2 в отношении $\beta\gamma$ -субъединиц рецептора IL2 на рекомбинантной линии клеток CHO-K1 (CHO-K1 IL2R $\beta\gamma$) с обнаружением посредством FACS

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Концентрация белка (нМ) | 117,65 | 39,216 | 13,072 | 4,357 | 1,452 | 0,484 | 0,161 | 0,054 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1210 | 1226 | 1162 | 980 | 904 | 603 | 325 | 191 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 615 | 438 | 318 | 250 | 210 | 165 | 156 | 153 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 854 | 645 | 447 | 342 | 232 | 178 | 160 | 144 |
| Mut61-линкер2-hFc(MFI) | 169 | 155 | 142 | 142 | 145 | 146 | 148 | 142 |
| Mut61.08-линкер2-hFc(MFI) | 164 | 163 | 144 | 144 | 157 | 144 | 146 | 141 |
| Mut61.46-линкер2-hFc(MFI) | 148 | 159 | 132 | 131 | 134 | 133 | 136 | 134 |
| Концентрация белка (нМ) | 133,33 | 44,444 | 14,815 | 4,938 | 1,646 | 0,549 | 0,183 | 0,061 |
| IgG человека в качестве контроля | 130 | 130 | 136 | 134 | 139 | 141 | 141 | 146 |
| Концентрация белка (нМ) | 117,65 | 39,216 | 13,072 | 4,357 | 1,452 | 0,484 | 0,161 | 0,054 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 2694 | 2703 | 2518 | 2170 | 1729 | 831 | 363 | 177 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 905 | 597 | 357 | 216 | 157 | 136 | 124 | 118 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 1320 | 950 | 560 | 285 | 180 | 134 | 121 | 115 |
| Концентрация белка (нМ) | 133,33 | 44,444 | 14,815 | 4,938 | 1,646 | 0,549 | 0,183 | 0,061 |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| IgG человека в качестве контроля | 259 | 100 | 101 | 107 | 101 | 102 | 104 | 109 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ПРИМЕР 9. Активация путей передачи сигнала в разных клетках под действием мутантных форм IL-2 с обнаружением посредством анализа фосфорилирования STAT5

Замороженные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) (приобретены у Allcells) размораживали. В каждую лунку вносили по 50 мкл 5×10^5 клеток PBMC и 50 мкл мутантной формы IL-2 и оставляли для осуществления реакции в инкубаторе с диоксидом углерода в течение 15 минут. После осуществления реакции в каждую лунку добавляли по 100 мкл предварительно охлажденного DPBS для остановки реакции. После центрифугирования PBMC окрашивали с помощью Livedead Violet (Invitrogen-L 34964), фиксировали с помощью Fix I (BD-557870) при 37°C в течение 10 минут и подвергали пермеабиллизации с помощью PermIII (BD-558050) на льду в течение 30 минут. Затем PBMC окрашивали с помощью CD3-AF700 (BD-557943), CD4-PerCP Cy5.5 (BD-560650), CD8-FTIC (BD-555366), CD25-PE (BD-557138), FoxP3-AF647 (BD-560045) и pSTAT5-PE Cy7 (Invitrogen-25-9010-42) при комнатной температуре в течение 1 часа и дважды промывали перед обнаружением. Результаты показаны на фиг. 6А - фиг. 6I и в таблице 14 - таблице 16. Результаты показывают, что по сравнению с IL-2 дикого типа уровень фосфорилирования STAT5, активированный с помощью мутантных форм IL-2, был подобным в Treg, но был значительно снижен в CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻ Т-клетках или в CD8⁺ Т-клетках. MFI в следующих таблицах представляет собой среднее значение интенсивности флуоресценции фосфорилирования STAT5 у подвергнутых обнаружению популяций клеток.

Таблица 14. Сигнал фосфорилирования STAT5, активированный с помощью мутантных форм IL-2 в Treg, с обнаружением посредством FACS

| Концентрация белка (пМ) | 10000 | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 |
|---------------------------|-------|------|------|------|------|-----|------|
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 3706 | 3498 | 3607 | 3440 | 2554 | 680 | 662 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 3463 | 3498 | 3498 | 3139 | 1250 | 735 | 522 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 3371 | 3451 | 3382 | 3619 | 1909 | 464 | 415 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 3451 | 3440 | 3668 | 3558 | 1365 | 462 | 366 |

| | | | | | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 3807 | 3731 | 3706 | 3833 | 1955 | 561 | 467 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 3718 | 3743 | 3280 | 2323 | 668 | 544 | 419 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 3570 | 3522 | 3428 | 2149 | 680 | 465 | 473 |

Таблица 15. Сигнал фосфорилирования STAT5, активированный с помощью мутантных форм IL-2 в CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ Т-клетках, с обнаружением посредством FACS

| | | | | | | |
|---------------------------|-------|------|------|-----|-----|-----|
| Концентрация белка (пМ) | 10000 | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0,1 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1601 | 1370 | 1130 | 612 | 377 | 333 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 527 | 473 | 388 | 371 | 368 | 336 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1111 | 960 | 833 | 485 | 362 | 370 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 718 | 584 | 496 | 382 | 355 | 354 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1532 | 1361 | 1205 | 789 | 529 | 501 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 592 | 564 | 481 | 496 | 496 | 501 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 612 | 582 | 557 | 481 | 481 | 467 |

Таблица 16. Сигнал фосфорилирования STAT5, активированный с помощью мутантных форм IL-2 в CD8⁺Т-клетках, с обнаружением посредством FACS

| | | | | | | |
|---------------------------|-------|------|-----|-----|-----|-----|
| Концентрация белка (пМ) | 10000 | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0,1 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 973 | 413 | 274 | 221 | 233 | 239 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 270 | 264 | 245 | 247 | 259 | 236 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 758 | 381 | 321 | 260 | 270 | 288 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 336 | 295 | 296 | 281 | 286 | 294 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 910 | 481 | 372 | 361 | 344 | 339 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 326 | 344 | 319 | 331 | 343 | 346 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 311 | 324 | 346 | 327 | 326 | 317 |

ПРИМЕР 10. Регуляторный эффект мутантных форм IL-2 на пролиферацию Т-клеток

Замороженные РВМС размораживали, ресуспендировали в RPMI-1640 (приобретена у Gibco, № по кат. A10491-01), содержащей 10 % FBS (приобретена у Gibco, № по кат. 10099-141С), и культивировали в шестилуночной планшете, предварительно покрытом с помощью 100 нг/мл антитела к CD3 (приобретено у BD, № по кат. 566685) в течение двух дней. Клетки собирали, трижды промывали буфером PBS (приобретен у Hyclone, № по кат. SH30256.01),

ресуспендировали в RPMI-1640, содержащей 10% FBS, и затем культивировали в шестилуночном планшете в течение пяти дней. Затем клетки собирали, один раз промывали буфером PBS, окрашивали с помощью Celltrace Violet (приобретен у Invitrogen, № по кат. C34557), один раз промывали культуральной средой, ресуспендировали в культуральной среде, вносили в 24-луночный планшет (900 мкл клеток на лунку), добавляли образцы мутантных белков IL-2 по 100 мкл и затем культивировали в течение семи дней. Затем клетки собирали, ресуспендировали с помощью PBS (приобретен у Sangon Biotech, № по кат. B548117-0500), содержащего 1% BSA (приобретена у Sangon Biotech, № по кат. A500023-0100), и вносили в 96-луночный планшет.

Клетки окрашивали с помощью BV605-CD8 (приобретен у Biolengend, № по кат. 344742) при комнатной температуре в течение 30 минут, промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA, фиксировали с помощью 200 мкл/лунка фиксирующего раствора (приобретен у eBioscience, № по кат. 00-5523-00) при 4°C в течение получаса и промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA. Затем клетки подвергали пермеабиллизации с помощью 200 мкл/лунка раствора раствора для пермеабиллизации (приобретен у eBioscience, № по кат. 00-5523-00) при 4°C в течение 30 минут и промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA. Клетки дополнительно окрашивали с помощью антитела к APC-CY7-CD3 (приобретено у Biolengend, № по кат. 344818), антитела к CD25 (приобретено у Biolengend, № по кат. 302606) и антитела к Foxp3 (приобретено у ThermoFisher, № 17-4777-42) при комнатной температуре в течение 30 минут, промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA, ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1% BSA, и подвергали обнаружению и проведению анализа посредством FACS (FACS Canto II, приобретен у BD). Результаты показаны на фиг. 7A- фиг. 7F и в таблице 17 - таблице 19. Результаты показывают, что по сравнению с IL-2 дикого типа мутантные формы IL-2 оказывали подобный эффект на пролиферацию Treg, но при этом оказывали немного меньший эффект на пролиферацию CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ Т-клеток или CD8⁺T CD25⁻Т-клеток. MFI в следующих таблицах представляет собой среднее значение интенсивности флуоресценции Celltrace Violet в подвергнутых обнаружению клетках, которое снижалось у пролиферирующих клеток. То есть при одном и том же времени обнаружения, чем быстрее

пролиферировали клетки и больше удвоений наблюдалось, тем ниже была обнаруженная средняя интенсивность флуоресценции.

Таблица 17. Пролиферация Treg, активированная с помощью мутантных форм IL-2, с обнаружением посредством FACS

| Концентрация белка (нМ) | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 |
|---------------------------|------|------|------|------|-------|--------|---------|
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1995 | 1670 | 2857 | 3362 | 3624 | 3863 | 4518 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 1823 | 1407 | 2070 | 3162 | 3555 | 4077 | 4389 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 1583 | 1437 | 2068 | 3384 | 4392 | 4027 | 4887 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1807 | 1838 | 2651 | 3319 | 3459 | 3691 | 4758 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 1633 | 1536 | 1884 | 2371 | 2930 | 3369 | 3953 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 1735 | 1855 | 1985 | 2669 | 2626 | 3379 | 4323 |

Таблица 18. Пролиферация CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻Т-клеток, активированная с помощью мутантных форм IL-2, с обнаружением посредством FACS

| Концентрация белка (нМ) | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 |
|---------------------------|------|------|------|------|-------|--------|---------|
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1653 | 2058 | 2216 | 3198 | 4578 | 5274 | 5602 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 2361 | 2372 | 3317 | 4169 | 4971 | 5319 | 5815 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 2258 | 2524 | 3160 | 4633 | 5374 | 5495 | 6022 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1679 | 1838 | 2055 | 2728 | 3997 | 4826 | 5314 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 2254 | 2166 | 2538 | 3372 | 4154 | 5072 | 5391 |
| Mut11.31-линкер2-hFc(MFI) | 2332 | 2559 | 2885 | 3878 | 4779 | 5284 | 5509 |

Таблица 19. Пролиферация CD8⁺CD25⁻Т-клеток, активированная с помощью мутантных форм IL-2, с обнаружением посредством FACS

| Концентрация белка (нМ) | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 |
|---------------------------|------|------|------|------|-------|--------|---------|
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1128 | 1422 | 1696 | 3303 | 4907 | 5767 | 6303 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(MFI) | 1955 | 1921 | 2640 | 3732 | 4917 | 5562 | 6179 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(MFI) | 1820 | 1983 | 2683 | 4038 | 5539 | 5553 | 6617 |
| IL-2-линкер2-hFc(MFI) | 1064 | 1236 | 1435 | 2497 | 4087 | 5010 | 5715 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(MFI) | 1876 | 1682 | 1956 | 2965 | 4124 | 5195 | 5567 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mut11.31-линкер2- hFc(MFI) | 1750 | 1945 | 2252 | 3463 | 4610 | 5406 | 5583 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|

ПРИМЕР 11. Регуляторный эффект мутантных форм IL-2 на пролиферацию НК-клеток

НК-клетки сортировали и подсчитывали с использованием набора для сортировки НК-клеток (приобретен у Miltenyi Biotec, № по кат. 130-092-657), а затем ресуспендировали в среде MEM (приобретена у Gibco, № по кат. 12634-010), содержащей 25% фетальной бычьей сыворотки (приобретена у Gibco, № по кат. 10099-141C), 0,2 мМ инозитола (приобретен у Sigma Aldrich, № по кат. I7508-50G), 0,1 мМ β-меркаптоэтанола (приобретен у Sigma Aldrich, № по кат. M3148-100ML) и 0,02 мМ фолиевой кислоты (приобретена у Sigma Aldrich, № по кат. F8758-5G). Клетки высевали в 96-луночный планшет с добавлением Fc-блокатора (приобретен у Biolengend, № по кат. 422302) и мутантной формы IL-2 в каждую лунку и культивировали в течение трех дней. BrdU (приобретен у Biolengend, № по кат. 423401) добавляли в последние 18 часов. Клетки собирали, промывали и ресуспендировали с помощью PBS, содержащего 1% BSA, фиксировали с помощью равного объема 4% параформальдегида (приобретен у DingGuo, № по кат. AR-0211) при комнатной температуре в течение 30 минут и промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA. Клетки подвергали пермеабиллизации с помощью 0,5% Triton-X 100 (приобретен у Thermo Fisher, № по кат. NH10) при комнатной температуре в течение 15 минут, промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA, и расщепляли с помощью ДНКазы I (приобретена у Sigma Aldrich, № по кат. D4513-1VL) при 37°C в течение одного часа. Клетки промывали и ресуспендировали с помощью PBS, содержащего 1% BSA, окрашивали с помощью конъюгированного с APC антитела к BrdU (приобретено у Biolengend, № по кат. 339808) при комнатной температуре в течение 20 минут и промывали с помощью PBS, содержащего 1% BSA. Образцы ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1% BSA, подвергали обнаружению и анализу посредством FACS (FACS Canto II, приобретен у BD). Результаты показаны на фиг. 8 и в таблице 20. Результаты показывают, что по сравнению с IL-2 дикого типа эффект мутантных форм IL-2 на пролиферацию НК-клеток был значительно сниженным. Данные в таблице 20 представляют собой долю BrdU-положительных клеток в

популяции NK-клеток.

Таблица 20. Пролиферация NK-клеток, активированная с помощью мутантных форм IL-2, с обнаружением посредством FACS

| Концентрация белка (нМ) | 100,00 | 33,33 | 11,11 | 3,70 | 1,23 | 0,41 | 0,14 | 0,05 |
|------------------------------|--------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| IL-2-линкер2-hFc(АРС +%) | 13,9 | 12,0 | 12,9 | 14,3 | 11,4 | 8,5 | 9,1 | 4,0 |
| Mut7.36-линкер2-hFc(АРС +%) | 7,7 | 5,6 | 7,0 | 4,6 | 4,8 | 3,2 | 3,5 | 3,6 |
| Mut7.66-линкер2-hFc(АРС +%) | 2,6 | 5,3 | 3,9 | 5,6 | 5,6 | 3,8 | 4,3 | 3,8 |
| Mut11.08-линкер2-hFc(АРС +%) | 9,1 | 12,3 | 7,2 | 5,3 | 6,3 | 4,8 | 4,2 | 3,2 |

Пример 12. Результаты исследований фармакодинамики (PD) у мышей дикого типа после подкожного введения

Самок мышей линии Balb/c в возрасте 6-8 недель приобретали у Vital River. Fc-линкер-IL2_V91K и mut11.08-линкер2-hFc разводили с помощью PBS и вводили подкожно в спину мышам из расчета 200 мкл на мышь. После введения образцы цельной крови и селезенки мышей собирали в разные моменты времени для анализа с помощью FACS. Последовательность Fc-линкер-IL2_V91K является такой, как показана под SEQ ID NO: 60, при этом ее очищали, как описано в примере 2.

PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGG
SAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:60)

Цельную кровь мышей собирали в 2-мл пробирку с антикоагулянтом EDTA/2K (Xinkang Medical, № по кат. X424) и хорошо перемешивали с антикоагулянтом путем переворачивания пробирки вверх дном для полного контакта. 300 мкл цельной крови переносили в пробирку для FACS, в которую добавляли смешанный раствор антител для окрашивания и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. Затем к образцу добавляли буфер для лизиса эритроцитов (1 мл на образец) (Hybri-Max № по кат.

R7757-100 мл) и оставляли отстаиваться при комнатной температуре в темноте в течение 5 мин, при этом наблюдали появление хлопьев. Затем образец центрифугировали при 400 g в течение 6 мин при 20°C. После отбрасывания надосадочной жидкости клетки диспергировали. Повторяли лизис эритроцитов. Отмывка клеток: клетки ресуспендировали в PBS (4 мл на образец) и центрифугировали при 500 g в течение 6 мин при 4°C; надосадочную жидкость отбрасывали и клетки диспергировали. В пробирку по каплям добавляли фиксирующий буфер (500 мкл на пробирку) при периодическом встряхивании пробирки для FACS после каждого добавления. Образец фиксировали при 4°C в течение часа или на протяжении ночи.

Селезенки мышей измельчали на клеточном сите с порами 70 мкм (Falcon Corning, № по кат. 352350) и центрифугировали при 500 g. В каждую селезенку добавляли 3 мл буфера для лизиса эритроцитов и лизировали в течение 5 мин, а затем добавляли 20 мл PBS для прекращения лизиса. Смесь центрифугировали при 500 g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали с помощью 5 мл PBS и подвергали скринингу с помощью клеточного сита с порами 70 мкм. После подсчета клеток в каждую пробирку для FACS добавляли 1×10^6 клеток. После добавления Fc-блокатора (5 мкл на пробирку) (Biolengend, № по кат. 156603) клетки перемешивали на вортексе и инкубировали при 4°C в течение 20 минут (перемешивали на вортексе каждые 10 минут). Затем к клеткам добавляли промывочный буфер для FACS (4 мл на пробирку) (PBS + 1% BSA) и центрифугировали при 400 g в течение 6 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и устье пробирки вытирали с помощью фильтровальной бумаги. К клеткам добавляли антитело к CD3ε мыши (BD Bioscience, № по кат. 740014), антитело к CD4 мыши (BD Bioscience, № по кат. 553407) и антитело к CD25 мыши (Biolengend, № по кат. 102008), перемешивали на вортексе и инкубировали при 4°C в течение 20 мин (перемешивали на вортексе каждые 10 мин). Затем к клеткам добавляли промывочный буфер для FACS (4 мл на пробирку) и центрифугировали при 400 g в течение 6 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и устье пробирки вытирали с помощью фильтровальной бумаги. После однократного перемешивания на вортексе в пробирку добавляли по каплям фиксирующий буфер (500 мкл на пробирку) при периодическом встряхивании пробирки после каждого добавления. Образец фиксировали

при 4°C в течение часа или на протяжении ночи.

Фиксирующий буфер. Концентрат для фиксации/пермеабиллизации и разбавитель для фиксации/пермеабиллизации в наборе 3901 (eBioscience, № по кат. 00-5523-00) смешивали в соотношении 1: 3 для приготовления фиксирующего буфера.

Буфер для пермеабиллизации и ddH₂O хорошо смешивали в соотношении 1: 9 для приготовления раствора для пермеабиллизации. К клеткам добавляли раствор для пермеабиллизации (2 мл на пробирку) и центрифугировали при 500 g в течение 6 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и устье пробирки вытирали с помощью фильтровальной бумаги. Процесс пермеабиллизации повторяли с раствором для пермеабиллизации (3 мл на пробирку). К клеткам добавляли антитела к Foxp3 (10 мкл на пробирку) (eBioscience, № по кат. 25-5773-82) и поддерживали при 4°C в течение 40 мин (перемешивали на вортексе каждые 20 мин). Затем к клеткам добавляли буфер для FACS (4 мл на пробирку) и центрифугировали при 500 g в течение 6 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и устье пробирки вытирали с помощью фильтровальной бумаги. После однократного перемешивания на вортексе в пробирку добавляли 100 мкл буфера для FACS с целью ресуспендирования клеток для обнаружения. Процентные доли Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ и CD3⁺ CD4⁻ Т-клеток в группах животных представляли как среднее ± стандартное отклонение (среднее ± SEM), а также наносили на график и проводили анализ с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 5.

Как показано на фиг. 9А - 9С и фиг. 10А - 10С, при подкожном введении в однократной дозе 1 мг/кг mut11.08-линкер2-hFc значительно увеличивала процентную долю Treg и снижала процентную долю CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Т-клеток в селезенке и периферической крови мышей. Процентная доля CD3⁺ CD4⁻ Т-клеток значительно не изменилась. Эффективность mut11.08-линкер2-hFc была выше, чем таковая у Fc-линкер-IL2_V91K.

Пример 13. Модель ДТН (гиперчувствительности замедленного типа) на мышах дикого типа

Фаза сенсibilлизации. Антигены эмульгировали с 3 мг/мл KLH (Sigma, № по кат. H7017, 50 мг), IFA (Sigma, № по кат. F5506, 10 мл) и CFA (Sigma, № по кат. F5581, 10 мл)

при объемном соотношении 1:1:1 с использованием способа с двумя концентрационными иглами. Антигены можно было полностью эмульгировать с образованием вязкой эмульсии в течение приблизительно 1 часа. Каждой мыши вводили инъекцией 100 мкл эмульгатора, то есть 100 мкг KLH. Каждой мыши вводили подкожной инъекцией эмульгированный KLH в два участка (по 50 мкл в каждый участок) средней части лопатки. Одновременно мышам вводили подкожной инъекцией IL-2 WT-линкер2-hFc (IL-2 WT, SEQ ID NO : 12), Fc-линкер-IL2_V91K или mut11.08-линкер2-hFc в дозе 1 мг/кг, по 200 мкл на мышь, один раз каждые 3 дня, в качестве групп IL-2 WT, Fc-линкер-IL2_V91K и mut11.08-линкер-hFc соответственно; мышам вводили внутрибрюшинной инъекцией циклоспорин А (CsA, Sigma, № по кат. F5581, 10 мл) в дозе 10 мг/кг, по 200 мкл на мышь, один раз в день, в качестве группы CsA; мышам вводили внутрибрюшинной инъекцией PBS в качестве контрольной группы со средой-носителем.

Стимуляцию выполняли на 5-ый день после сенсibilизации. 10 мг/мл KLH разводили до 1 мкг/мкл посредством 10-кратного разведения с помощью PBS. Каждой мыши вводили внутрикожной инъекцией 10 мкл KLH (т. е. 10 мкг KLH) в правое ухо и 10 мкл PBS в левое ухо в качестве контроля.

Перед сенсibilизацией толщину левого и правого уха каждой мыши измеряли с помощью спирального микрометра (0-25 мм, точность: 0,001, приобретенного у Nanjing SuCe Measuring Instruments Co., Ltd) и регистрировали. Перед стимуляцией толщину левого и правого уха каждой мыши измеряли с помощью спирального микрометра в качестве значения на исходном уровне. Толщину уха измеряли через 24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч после стимуляции. Изменения веса тела и толщины уха в каждой группе представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение (среднее \pm SEM), а также наносили на график и проводили анализ с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 5.

Результат показан на фиг. 11А. После однократного подкожного введения 1 мг/кг при сравнении с контрольной группой со средой-носителем изменение Δ толщины уха в группе IL-2 WT было незначительным, в то время как Δ толщина уха у мышей в группе mut11.08-линкер2-hFc стала меньше, что предполагает противовоспалительный эффект mut11.08-линкер2-hFc, и что противовоспалительная эффективность mut11.08-линкер2-hFc лучше,

чем Fc-линкер-IL2_V91K и CsA. Как показано на фиг. 11B, среди групп отсутствовало существенное изменение веса тела животных.

Результаты второго этапа экспериментов показаны на фиг. 12A. Однократную дозу Fc-линкер-IL2_V91K (1 мг/кг) вводили подкожно, при этом mut11.08-линкер2-hFc, вводили подкожно в одной дозе, составляющей 0,04, 0,2, 1 или 5 мг/кг. Противовоспалительный эффект mut11.08-линкер2-hFc был зависимым от дозы. mut11.08-линкер2-hFc в дозе 0,2 мг/кг оказывала такой же эффект, что и Fc-линкер-IL2_V91K в дозе 1 мг/кг, и при этих условиях никаких отклонений веса тела не наблюдали. Как показано на фиг. 12B, при введении mut11.08-линкер2-hFc в дозе 5 мг/кг вес тела мышей колебался и уменьшался, при этом в других группах вес тела был нормальным.

Пример 14. Результаты исследования PD у мышей с РВМС после подкожного введения

Самок мышей линии NOG в возрасте 11-12 недель приобретали у Vital River. В день 1 РВМС размораживали, активировали путем добавления CD3 (приобретен у eBioscience, № по кат. 16-0037-85/2106800, с конечной концентрацией 12,5 нг/мл) и CD28 (приобретен у eBioscience, № по кат. 16-0289-85/2073954, с конечной концентрацией 25 нг/мл) и инкубировали на протяжении ночи в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 16 часов. Клетки РВМС (20×10^6 на мышь, 400 мкл) собирали в день 0 и инокулировали в мышей линии NOG через хвостовые вены. Инокулированных мышей случайным образом на основе веса тела разделяли на пять групп, включающих контрольную группу с PBS, группы с mut11.08-линкер2-hFc (0,3 мг/кг, 1 мг/кг) и группы с Fc-линкер-IL2_V91K (0,3 мг/кг, 1 мг/кг), при этом в каждой группе было по 3 мыши. Затем лекарственное средство вводили подкожной инъекцией в шею (день 0) в виде однократной дозы. В день 3 после введения селезенку умерщвленных мышей брали для анализа FACS и данные регистрировали. Число и кратность изменения Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), Tcon (CD4⁺ CD25⁻) и CD8⁺ Т-клеток в группах животных наносили на графики и анализировали с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 8.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 13A - 13B и фиг. 14A - 14C. После

однократного подкожного введения в дозе 1 мг/кг mut11.08-линкер2-hFc увеличил отношение Treg/Tcon и отношение Treg/CD8⁺T-клетки в день 3 дозозависимым образом и показал лучший результат, чем Fc-линкер-IL2_V91K. В день 3 после введения, за исключением значительного изменения числа Treg, число Tcon увеличилось, но изменение не было значимым, и число CD8⁺T-клеток не изменилось значимым образом.

Пример 15. Модель болезни "трансплантат против хозяина" (GVHD) на мышях с РВМС

Самок мышей линии NOG в возрасте 13-14 недель приобретали у Vital River. Протокол был таким же, как в примере 14. Мышей линии NOG случайным образом на основе веса тела разделяли на три группы, включающие группу G1 (PBS, не инокулировали активированные клетки РВМС, 3 мыши), группу G2 (PBS, 10 мышей) и группу G3 (mut11.08-линкер2-hFc в дозе 0,2 мг/кг, 10 мышей), при этом группам G2 и G3 инокулировали активированные РВМС в соответствии с примером 14. Затем лекарственное средство вводили подкожной инъекцией в шею (день 0) в виде однократной дозы. Мышей взвешивали два раза в неделю и оценивали после появления признаков GVHD [система оценки: потеря веса (0: < 10%, 1: 10%-20%, 2: > 20%, 3: > 30%); анемия (0: красный или розовый хвост, 1: белый хвост); положение тела (0: нормальное, 1: сгорбленное); общий уровень активности (0: нормальный, 1: ограниченный); линька (0: без линьки, 1: линька) и желтуха (0: белый или красный хвост, 1: желтый хвост); максимальная тяжесть заболевания или летальный исход соответствуют 8]. Данные регистрировали. Примечание: 1. Если мышь получает максимальную оценку тяжести заболевания, другие симптомы не будут оцениваться. 2. После смерти мертвых мышей продолжали оценивать до конца эксперимента.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 15А - 15В. Через 13 дней после инокуляции РВМС вес тела в группе G2 снижался, и симптомы GVHD в группе G2 появились рано. Через 17 дней после инокуляции РВМС вес тела в группе G3 снижался, и общая потеря веса тела в группе G3 была меньше, чем в группе G1, а потеря веса тела в группе G3 произошла позже, чем в группе G2, что предполагает, что mut11.08-линкер2-hFc эффективно подавляет

возникновение GVHD у мышей в соответствии с фармакологическими ожиданиями. mut11.08-линкер2-hFc показала отсутствие токсических и побочных эффектов в дозе 0,2 мг/кг и показала хорошую способность против GVHD в соответствии с оценкой веса тела. Кроме того, смертность животных и оценка GVHD в группе G3 были ниже, чем в группе G2, и имелись значимые различия.

Пример 16. Фармакокинетика у мышей

Способ определения концентрации лекарственного средства в плазме крови у мышей в этом примере был следующим. Планшет покрывали с помощью 1 мкг/мл белка альфа-субъединицы hIL2R (ACROBiosystems, № по кат. ПА-H52H9-100 мкг). Стандартную кривую строили с помощью лекарственных средств в чистой сыворотке при концентрациях, находящихся в диапазоне от 500 до 3,90625 нг/мл. Готовили контроли качества с высокой/средней/низкой концентрацией, и все подлежащие обнаружению образцы, стандарты и контроли качества разводили в 40 раз с помощью разбавителей, а затем вносили в планшет в двух повторностях (100 мкл/лунка) (образцы могли разбавлять дополнительно, в соответствии с реальной ситуацией). Для обнаружения конъюгат пероксидазы с мышиним антителом к IgG человека AffiniPure, специфическим к фрагменту Fc γ (Jackson, № по кат. 209-035-098) разводили в 10000 раз и затем вносили в планшет. В планшет вносили хромогенный раствор ТМВ (100 мкл/лунка) для проявления цвета, которое затем останавливали с использованием 1 М серной кислоты (50 мкл/лунка).

Концентрацию лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа определяли после подкожного введения (1 мг/кг). Результаты двух экспериментов показаны на фиг. 16А - 16В и таблицах 21-22. В обоих экспериментах показатель воздействия для mut11.08-линкер2-hFc был в 4-6 раз выше, чем таковой для Fc-линкер-IL2_V91K (контрольная группа), и T_{max} было отсрочено по сравнению с Fc-линкер-IL2_V91K. Показатель воздействия для mut11.08-линкер2-hFc был выше, чем таковой для mut11-линкер2-hFc после однократного подкожного введения (1 мг/кг).

Таблица 21. Фармакокинетические параметры у мышей дикого типа после однократного подкожного введения

| Средство | T1/2 (ч) | T _{max} (ч) | C _{max} (нг/мл) | AUClast (ч*нг/мл) |
|----------------------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Fc-линкер-IL2_V91K | NA* | 6,00 | 1,430,94 | 28,208,77 |
| mut11-линкер2-hFc | NA* | 12,00 | 1843,32 | 43,254,14 |
| mut11.08-линкер2-hFc | NA* | 24,00 | 4,433,17 | 139,652,97 |

Таблица 22. Фармакокинетические параметры у мышей дикого типа после однократного

подкожного введения

| Средство | T1/2 (ч) | T _{max} (ч) | C _{max} (нг/мл) | AUClast (ч*нг/мл) |
|----------------------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Fc-линкер-IL2_V91K | NA* | 6,00 | 1628,30 | 42,874,91 |
| mut11.08-линкер2-hFc | 11,51 | 24,00 | 5,391,62 | 177,902,19 |

Концентрацию лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа определяли после внутривенного введения (1 мг/кг). Результаты показаны на фиг. 17 и в таблице 23. Показатель воздействия для mut11.08-линкер2-hFc был выше, чем таковой для Fc-линкер-IL2_V91K, но различие стало меньшим (C_{max}: 3 × → 1,3 ×, AUC: 4 × → 2,4 ×) по сравнению с подкожным введением. Показатель воздействия для mut11.08-линкер2-hFc был выше, чем таковой для mut11-линкер2-hFc, но различие стало меньшим (C_{max}: 2,4 × → 1,2 ×, AUC: 3,2 × → 1,6 ×) по сравнению с подкожным введением.

Следовательно, биодоступность mut11.08-линкер2-hFc, введенного подкожно, была лучше, чем таковая у Fc-линкер-IL2_V91K и mut11-линкер2-hFc. Стабилизирующие мутации увеличивают экспозицию лекарственного средства и его биодоступность.

Таблица 23. Фармакокинетические параметры у мышей дикого типа после однократного

внутривенного введения

| Средство | T1/2 (ч) | T _{max} (ч) | C _{max} (нг/мл) | AUClast (ч*нг/мл) |
|----------------------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Fc-линкер-IL2_V91K | 7,35 | 0,08 | 14,518,61 | 92,522,67 |
| mut11-линкер2-hFc | 5,27 | 0,08 | 15,450,84 | 138,450,96 |
| mut11.08-линкер2-hFc | 8,41 | 0,08 | 18,761,22 | 217851,01 |

Мышам инокулировали РВМС с помощью способа, описанного в примере 14. Концентрацию лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа определяли после подкожного введения (1 мг/кг). Результаты показаны на фиг. 18 и в таблице 24. У

мышей с РВМС после однократного подкожного введения (1 мг/кг) показатель воздействия для mut11.08-линкер2-hFc показал явное преимущество, которое было в 5-8 раз выше, чем показатель воздействия для Fc-линкер-IL2_V91K, и T_{max} для mut11.08-линкер2-hFc наступало позже, чем таковое для Fc-линкер-IL2_V91K.

Таблица 24. Фармакокинетические параметры у мышей с РВМС после однократного подкожного введения

| Средство | $T_{1/2}$ (ч) | T_{max} (ч) | C_{max} (нг/мл) | AUClast (ч*нг/мл) |
|----------------------|---------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Fc-линкер-IL2_V91K | 12,29 | 12,00 | 2,338,82 | 99848,69 |
| mut11.08-линкер2-hFc | 43,06 | 24,00 | 7,405,26 | 546719,71 |

Пример 17. Фармакокинетика и результаты исследования PD у яванских макак

Способ определения концентрации лекарственного средства в плазме крови у яванских макак в этом примере был следующим. Планшет покрывали с помощью 1 мкг/мл белка альфа-субъединицы hIL2R (ACROBiosystems, № по кат. ILA-H52H9-100 мкг). Стандартную кривую строили с помощью лекарственных средств в чистой сыворотке крови яванского макака при концентрациях, находящихся в диапазоне от 15 до 0,11718 нг/мл. Подготовили контроли качества с высоким/средним/низким уровнем концентрации, и все подлежащие обнаружению образцы, стандарты и контроли качества разводили в 5 раз с помощью разбавителей, и затем вносили в планшет в двух повторностях (100 мкл/лунка) (образцы можно разводить дополнительно, в соответствии с текущей ситуацией). Антитело обнаружения, конъюгат антитела козы к IgG человека с биотином с минимальной реактивностью к белкам яванского макака (SoutherBiotech, № по кат. 2049-08) разводили в 1000 раз и затем вносили в планшет, а затем конъюгат стрептавидина с HRP (Thermo, № по кат. 21126), разведенный в 5000 раз, вносили в планшет. Наконец, добавляли хромогенный раствор ТМВ (100 мкл/лунка) для проявления цвета, которое затем останавливали с использованием 1 М серной кислоты (50 мкл/лунка). Чистую сыворотку яванского макака приобретали у Shanghai HkeyBio Technology Co., Ltd.

IL-2 в дозе 0,05 мг/кг подкожно вводили 4 яванским макакам, из которых 1 обезьяне вводили IL-2 WT-линкер2-hFc дикого типа (сокращенно IL-2 WT, который показан под SEQ

ID NO: 12), 1 обезьяне вводили Fc-линкер-IL2_V91K, 2 обезьянам вводили mut11.08-линкер2-hFc (сокращенно Mut11.08-1 и Mut11.08-2 соответственно), и концентрации лекарственного средства в плазме крови обнаруживали после введения. Результаты показаны на фиг. 19 и в таблице 25. Молекула IL-2 WT в дозе 0,05 мг/кг характеризовалась более длительным конечным периодом полужизни, а Fc-линкер-IL2_V91K и mut11.08 -линкер2-hFc характеризовались схожими конечными периодами полужизни. Ранжирование C_{\max} и AUC было следующим: mut11.08-линкер2-hFc > Fc-линкер-IL2_V91K > IL-2 WT.

Таблица 25. Фармакокинетические параметры у яванского макака после однократного подкожного введения

| Средство | T1/2 (ч) | Tmax (ч) | C_{\max} (нг/мл) | AUClast (ч*нг/мл) |
|--------------------|-------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| IL-2 WT | 204,97 | 4,00 | 57,70 | 1564,86 |
| Fc-линкер-IL2_V91K | 13,20 | 24,00 | 125,07 | 4,669,24 |
| mut11.08-1 | 11,05 | 24,00 | 185,40 | 8,165,21 |
| mut11.08-2 | 11,80 | 24,00 | 355,50 | 15033,23 |

4 яванских макака использовали для определения эффекта однократного подкожного введения mut11.08-линкер2-hFc на размножение Treg у яванских макаков. 1 обезьяне вводили IL-2 WT-линкер2-hFc, 1 обезьяне вводили Fc-линкер-IL2_V91K, а остальным 2 обезьянам вводили mut11.08-линкер2-hFc в дозе 0,05 мг/кг (путем однократного подкожного введения). Периферическую кровь яванских макаков собирали перед введением и в дни 1, 3, 5, 7, 10 и 14 после введения. РВМС выделяли из 2 мл образца крови яванского макака, собранного в разные моменты времени, и замораживали. Флакон с замороженными РВМС в каждый момент времени брали и размораживали для совместного анализа. Размороженные РВМС ресуспендировали в 1 мл буфера для окрашивания (буфер DPBS, содержащий 2% FBS), а затем переносили в два 96-луночных планшета с V-образным дном, которые были помечены как панель 1 и панель 2, по 200 мкл в каждую лунку. Два планшета один раз промывали с помощью DPBS и затем окрашивали с помощью Live/Dead Fixable Near-IR (Thermo, № по кат. I34976) в течение 20 мин. После прекращения окрашивания с использованием буфера для окрашивания Human TruStain FcX (Biolegend, № по каталогу №

422302) добавляли в планшеты и инкубировали в течение 20 мин. Затем два планшета окрашивали с помощью смесей различных флуоресцентных антител в течение 30 мин. На панели 1 конъюгированное с BV605 мышинное антитело к CD3 человека (BD, № по кат. 562994), конъюгированное с PerCP-Cy5.5 мышинное антитело к CD4 человека (BD, № по кат. 552838), конъюгированное с FITC мышинное антитело к CD8 человека (Biolegend, № по кат. 301050) и конъюгированное с BV421 мышинное антитело к CD25 человека (Biolegend, № по кат. 302630) разводили в буфере для окрашивания Brilliant (BD, № по кат. 563794). На панели 2 конъюгированное с BV605 мышинное антитело к CD3 человека, конъюгированное с PerCP-Cy5.5 мышинное антитело к CD4 человек, конъюгированное с FITC мышинное антитело к CD8 человека и конъюгированное с Brilliant Violet 421 антитело к CD16 человека (Biolegend, № по кат. 302038) разводили в буфере для окрашивания Brilliant. Клетки промывали один раз буфером для окрашивания после прекращения окрашивания, а также фиксировали и подвергали пермеабиллизации с использованием системы буферов для окрашивания Foxp3/фактора транскрипции (eBioscience, № по кат. 00-5523-00). В два планшета вносили смеси различных флуоресцентных антител для окрашивания клеток в течение 45 мин. На панели 1 конъюгированное с PE антитело к FOXP3 человека (Biolegend, № по кат. 320208) и конъюгированное с APC моноклональное антитело к Ki67 (eBioscience, № по кат. 17-5698-82) разводили в буфере для пермеабиллизации. На панели 2 конъюгированное с APC моноклональное антитело к Ki67 разводили в буфере для пермеабиллизации. После окрашивания клетки один раз промывали с помощью буфера для пермеабиллизации и ресуспендировали с помощью 400 мкл буфера для окрашивания, и затем образцы объемом 200 мкл подвергали анализу посредством FACS. Число и кратность изменения Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ T-клеток, CD8⁺ T-клеток и NK-клеток в группах животных наносили на график и проводили анализ с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 9.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 20A - 20F. После однократного подкожного введения (0,05 мг/кг) mut11.08-линкер2-hFc значительно увеличивала число и процентную долю Treg в периферической крови яванских макаков. В соответствии с отношением Treg/CD4⁺T-клетки mut11.08-линкер2-hFc благоприятно влиял на активацию Treg, и, таким образом, процентная доля Treg была в приблизительно 2 раза выше, чем таковая при Fc-

линкер-IL2_V91K. При сравнении с Fc-линкер-IL2_V91K mut11.08-линкер2-hFc показал больший эффект на увеличение пролиферации Treg (11,08 в сравнении с Fc-линкер-IL2_V91K = 79/55 в сравнении с 18), в то время как Fc-линкер-IL2_V91K был лучше, чем WT (18 в сравнении с 9,5) в этом отношении. В соответствии с анализом маркеров активации Treg было небольшое различие в % Ki67⁺ Treg после введения разных молекул. Экспрессия маркеров активации Treg (Foxp3 и CD25) значимо увеличивалась, что положительно коррелировало с уровнем пролиферации Treg.

Как показано на фиг. 21A - 21F, после однократного подкожного введения Fc-линкер-IL2_V91K (0,05 мг/кг) максимальная кратность изменения Foxp3⁺CD4⁺T-клеток была приблизительно 2-кратной, а у CD8⁺T-клеток была несколько выше, приблизительно 4-кратной. Эффект mut11.08-линкер2-hFc на пролиферацию Foxp3⁺CD4⁺T-клеток был в приблизительно 2-3 раза выше, чем эффект Fc-линкер-IL2_V91K, тогда как эффект на пролиферацию CD8⁺T-клеток был несколько слабее или подобный с таковым при Fc-линкер-IL2_V91K и был в приблизительно 1,5-2 раза выше, чем при WT. Число NK-клеток не изменилось значимым образом после введения Fc-линкер-IL2_V91K. Эффект mut11.08-линкер2-hFc на уровень пролиферации NK-клеток был подобным с таковым Fc-линкер-IL2_V91K.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантная форма IL-2, содержащая одну или несколько мутаций в Q13, L18, G27, Y31, A73, H79, P82, I89, N90, V91, V93, F117 или R120 по сравнению с IL-2 дикого типа.

2. Мутантная форма IL-2 по п. 1, где мутантная форма IL-2 содержит одну или несколько мутаций из Q13L, L18I, G27W, Y31V, A73L, H79Q, P82L, I89L, N90Y, V91A, V93I, F117W или R120F.

3. Мутантная форма IL-2 по п. 1, где мутантная форма IL-2 содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a) - (h):

(a) мутации в Y31/A73/H79; предпочтительно Y31V/A73L/H79Q;

(b) мутация в Q13; предпочтительно Q13L;

(c) мутация в R120; предпочтительно R120F;

(d) мутации в L18/V91/F117; предпочтительно L18I/V91A/F117W;

(e) мутации в L18/I89/V93; предпочтительно L18I/I89L/V93I;

(f) мутации в G27/R120; предпочтительно G27W/R120F;

(g) мутации в P82/R120; предпочтительно P82L/R120F;

(h) мутации в N90/R120; предпочтительно N90Y/R120F.

4. Мутантная форма IL-2 по п. 3, где мутантная форма IL-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под любым из SEQ ID NO: 2-9.

5. Мутантная форма IL-2 по любому из пп. 1-4, где мутантная форма IL-2 характеризуется значением T_m, превышающим таковое у IL-2 дикого типа.

6. Мутантная форма IL-2 по любому из пп. 1-3 и п. 5, где мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в H16, D20, N88, V91 или Q126, например, H16E, D20A, D20H или D20Y, N88A, N88I, N88G, N88R или N88D, V91R или V91K, Q126L или Q126F;

предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий), выбранных из групп (i) - (iv):

(i) мутация в H16, предпочтительно H16E;

(ii) мутация в D20, предпочтительно D20A;

(iii) мутация в V91, предпочтительно V91R;

(iv) мутации в H16/V91, предпочтительно H16E/V91R.

7. Мутантная форма IL-2 по п. 6, где мутантная форма IL-2 содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a) - (n):

- (a) мутации в H16/Y31/A73/H79; предпочтительно H16E/Y31V/A73L/H79Q;
- (b) мутации в H16/R120, предпочтительно H16E/R120F;
- (c) мутации в H16/L18/V91/F117; предпочтительно H16E/L18I/V91A/F117W;
- (d) мутации в H16/L18/I89/V93; предпочтительно H16E/L18I/I89L/V93I;
- (e) мутации в H16/G27/R120; предпочтительно H16E/G27W/R120F;
- (f) мутации в H16/P82/R120; предпочтительно H16E/P82L/R120F;
- (g) мутации в D20/Y31/A73/H79; предпочтительно D20A/Y31V/A73L/H79Q;
- (h) мутации в D20/R120; предпочтительно D20A/R120F;
- (i) мутации в V91/Y31/A73/H79; предпочтительно V91R/Y31V/A73L/H79Q;
- (j) мутации в V91/Q13; предпочтительно V91R/Q13L;
- (k) мутации в V91/R120; предпочтительно V91R/R120F;
- (l) мутации в V91/L18/I89/V93; предпочтительно V91R/L18I/I89L/V93I;
- (m) мутации в H16/V91/Y31/A73/H79; предпочтительно H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q;
- (n) мутации в H16/V91/L18/I89/V93; предпочтительно H16E/V91R/L18I/I89L/V93I.

8. Мутантная форма IL-2 по п. 7, где мутантная форма IL-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 22-27, 29-30, 32-35 или 37-38.

9. Мутантная форма IL-2 по любому из пп. 1-3 и п. 5, где мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в F42, Y45 или L72; предпочтительно F42A, Y45A или L72G.

10. Мутантная форма IL-2, содержащая одну или несколько мутаций в H16, D20 или V91 по сравнению с IL-2 дикого типа; предпочтительно мутацию(-ии), выбранную(-ые) из группы, состоящей из:

- (i) мутации в H16, предпочтительно H16E;
- (ii) мутации в D20, предпочтительно D20A;
- (iii) мутации в V91, предпочтительно V91R;
- (iv) мутаций в H16/V91, предпочтительно H16E/V91R.

11. Мутантная форма IL-2 по п. 10, где мутантная форма IL-2 имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 21, 28, 31 или 36.

12. Мутантная форма IL-2 по любому из пп. 1-3, 5-7 и пп. 9-10, где мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций в N26, N29, N30, N71, Q11, L132, L70, P82, G27 или F28;

предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C, L132C, L70C, P82C, G27C или F78C;

более предпочтительно мутантная форма IL-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий) в группах (a) - (g):

- (a) N26Q;
- (b) N29S;
- (c) N30S;
- (d) N71Q;
- (e) Q11C/L132C;
- (f) L70C/P82C;
- (g) G27C/F78C.

13. Мутантная форма IL-2 по любому из пп. 6-8 и пп. 10-12, где мутантная форма IL-2 характеризуется сниженной связывающей способностью в отношении комплекса субъединиц IL-2R $\beta\gamma$ по сравнению с IL-2 дикого типа; предпочтительно снижается отношение связывающая способность_{комплекс субъединиц IL-2R $\beta\gamma$} /связывающая способность_{комплекс субъединиц IL-2 $\alpha\beta\gamma$} .

14. Мутантная форма IL-2 по п. 13, где мутантная форма характеризуется сниженной способностью стимуляции нерегуляторных Т-клеток или НК-клеток (естественных киллеров) по сравнению с IL-2 дикого типа; причем стимуляция может быть выбрана из внутриклеточного фосфорилирования STAT5 или клеточной пролиферации;

в качестве альтернативы мутантная форма предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки (Treg) в периферической крови или популяцию Т-клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или НК-клетками (естественными киллерами); причем предпочтительная стимуляция может быть выбрана из стимуляции фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках, стимуляции пролиферации регуляторных Т-клеток, увеличения отношения регуляторных Т-клеток к нерегуляторным Т-клеткам или

увеличения отношения регуляторных Т-клеток к НК-клеткам.

15. Мутантная форма по любому из пп. 1-14, где мутация предусматривает делецию, вставку или замену, предпочтительно замену.

16. Мутантная форма по любому из пп. 1-15, где IL-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 1.

17. Слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид представляет собой мутантную форму IL-2 по любому из пп. 1-16, а второй полипептид представляет собой полипептид, отличный от IL-2.

18. Слитый белок по п. 17, где второй полипептид представляет собой Fc, молекулу, связывающую опухолевый антиген, или субъединицу рецептора IL-2;

необязательно Fc представляет собой Fc IgG человека, например, Fc IgG1 человека;

предпочтительно Fc IgG1 человека содержит по меньшей мере одну группу мутации(-ий), выбранной(-ых) из групп (a) - (i):

(a) C220S;

(b) N297G;

(c) C220S и N297G;

(d) A327Q;

(e) L234A и L235A;

(f) A287C и L306C;

(g) A259C и V302C;

(h) R292C и V306C;

(i) V323C и I332C;

более предпочтительно Fc IgG1 человека имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 11;

необязательно опухолевый антиген предусматривает EDB-FN (экстрадомен фибронектина), Muc1, p53, FAP, GD2, EpCAM, тенаascin-C, CD20, CEA, MAdCAM-1 или WT1 (белок 1 опухоли Вильмса); необязательно молекула, связывающая опухолевый антиген, представляет собой антитело, такое как scFv, sdFv, Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv;

необязательно субъединица рецептора IL-2 представляет собой α -субъединицу рецептора IL-2.

19. Слитый белок по любому из пп. 17-18, где С-конец первого полипептида соединен с N-концом второго полипептида с помощью линкера или без него; или N-конец первого полипептида соединен с С-концом второго полипептида с помощью линкера или без него; линкер предпочтительно выбран из $(G_4S)_n$, $(GGNGT)_n$ или $(YGNGT)_n$, и n выбран из 1, 2, 3, 4 или 5;

более предпочтительно С-конец первого полипептида соединен с N-концом второго полипептида с помощью линкера $(G_4S)_3$.

20. Слитый белок по п. 17, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 13-20 или SEQ ID NO: 39-56.

21. Конъюгат, содержащий мутантную форму по любому из пп. 1-16 или слитый белок по любому из пп. 17-20 и дополнительно содержащий стабилизатор, лекарственное средство или индикаторную молекулу, конъюгированную с мутантным или слитым белком; где стабилизатор может быть выбран из полиэтиленгликоля, такого как монометоксиполиэтиленгликоль.

22. Выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий мутантную форму по любому из пп. 1-16 или слитый белок по любому из пп. 17-20.

23. Вектор, содержащий фрагмент нуклеиновой кислоты по п. 22.

24. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 23, где клетка-хозяин необязательно представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку; причем прокариотическая клетка или эукариотическая клетка могут быть выбраны из *Escherichia coli*, дрожжей, клеток насекомых или клеток млекопитающих, и клетки млекопитающих могут быть выбраны из линии клеток СНО или линии клеток НЕК293.

25. Способ получения мутантной формы по любому из пп. 1-16 или слитого белка по любому из пп. 17-20, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 24 и выделение мутантного или слитого белка ПЛ-2, экспрессируемых клеткой-хозяином.

26. Мутантный или слитый белок ПЛ-2, полученный в соответствии со способом по п. 25.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая мутантную форму по любому из пп. 1-16, слитый белок по любому из пп. 17-20, конъюгат по п. 21, фрагмент нуклеиновой кислоты по п. 22, вектор по п. 23, клетку-хозяина по п. 24 или мутантный или слитый белок по п. 26 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, где

предпочтительно фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для инъекции, например, для внутривенной или подкожной инъекции; более предпочтительно в дозе фармацевтической композиции содержится эффективное количество слитого белка, подлежащего введению субъекту; наиболее предпочтительно эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг.

28. Применение мутантной формы по любому из пп. 1-16, слитого белка по любому из пп. 17-20, конъюгата по п. 21, фрагмента нуклеиновой кислоты по п. 22, вектора по п. 23, клетки-хозяина по п. 24 или мутантного или слитого белка по п. 26 в изготовлении лекарственного препарата, где

предпочтительно лекарственный препарат представляет собой лекарственный препарат для инъекции, например, для внутривенной или подкожной инъекции;

предпочтительно в дозе лекарственного препарата содержится эффективное количество слитого белка, подлежащего введению субъекту; наиболее предпочтительно эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг;

предпочтительно лекарственный препарат применяется для лечения аутоиммунного заболевания, пролиферативного заболевания или вирусной инфекции;

более предпочтительно аутоиммунное заболевание предусматривает ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку, кожную красную волчанку, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, синдром Шегрена, полимиозит,

дерматомиозит, склеродермию, псориаз, бляшечный псориаз, очаговую алопецию, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, аутоиммунный гепатит, диабет I типа, аутоиммунный васкулит, экзему или астму;

более предпочтительно пролиферативное заболевание предусматривает неоплазию, солидную опухоль, гематологическую опухоль, злокачественный асцит или злокачественный плевральный выпот; где солидная опухоль может быть выбрана из доброкачественной или злокачественной, первичной или метастатической, злокачественная солидная опухоль может быть выбрана из рака или саркомы, например, эпителиально-клеточной карциномы, эндотелиально-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, тератомы, опухоли легкого, рака, индуцированного папилломавирусом, аденокарциномы, карциномы, меланомы, ангиосаркомы, нейробластомы, метастатического рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака из клеток Меркеля, рака яичника, почечно-клеточного рака, метастатического рака почки, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря; и гематологическая опухоль необязательно выбрана из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, как, например, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов; более предпочтительно вирусная инфекция выбрана из инфекции, вызванной HIV, инфекции, вызванной новым коронавирусом, или вирусной инфекции, вызванной HPV.

29. Способ лечения аутоиммунных заболеваний, пролиферативных заболеваний или вирусной инфекции, где способ включает стадию введения субъекту эффективного количества мутантной формы IL-2 по любому из пп. 1-16, слитого белка по любому из пп. 17-20, конъюгата по п. 21, фрагмента нуклеиновой кислоты по п. 22, вектора по п. 23, клетки-хозяина по п. 24, мутантного или слитого белка по п. 26 или фармацевтической композиции по п. 27;

предпочтительно стадию введения выполняют посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции;

предпочтительно эффективное количество составляет 0,001-10 мг/кг, как, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,006 мг/кг, 0,007 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,009 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг,

9 мг/кг или 10 мг/кг;

предпочтительно аутоиммунное заболевание предусматривает ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку, кожную красную волчанку, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, синдром Шегрена, полимиозит, дерматомиозит, склеродермию, псориаз, бляшечный псориаз, очаговую алопецию, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, аутоиммунный гепатит, диабет I типа, аутоиммунный васкулит, экзему или астму;

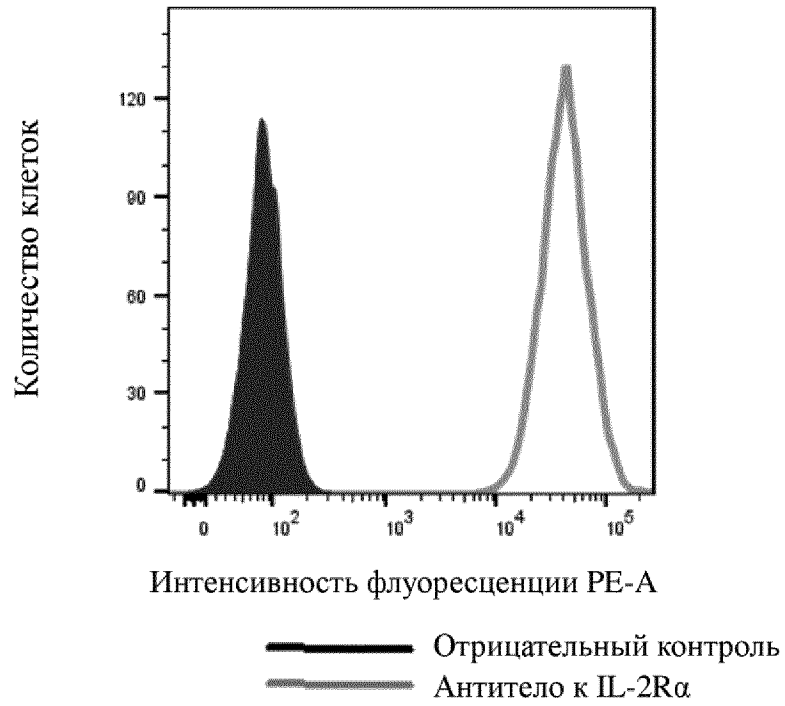
предпочтительно пролиферативное заболевание предусматривает неоплазию, солидную опухоль, гематологическую опухоль, злокачественный асцит или злокачественный плевральный выпот; где солидная опухоль может быть выбрана из доброкачественной или злокачественной, первичной или метастатической, злокачественная солидная опухоль может быть выбрана из рака или саркомы, например, эпителиально-клеточной карциномы, эндотелиально-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, тератомы, опухоли легкого, рака, индуцированного папилломавирусом, аденокарциномы, карциномы, меланомы, ангиосаркомы, нейробластомы, метастатического рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака из клеток Меркеля, рака яичника, почечно-клеточного рака, метастатического рака почки, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря; и гематологическая опухоль необязательно выбрана из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, как, например, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов.

30. Способ предпочтительной стимуляции популяции Т-клеток или регуляторных Т-клеток в периферической крови, где способ включает стадию приведения популяции Т-клеток или периферической крови в контакт с мутантной формой IL-2 по любому из пп. 1-16, слитым белком по любому из пп. 17-20, конъюгатом по п. 21, фрагментом нуклеиновой кислоты по п. 22, вектором по п. 23, клеткой-хозяином по п. 24, мутантным или слитым белком по п. 26 или фармацевтической композицией по п. 27; предпочтительно предпочтительная стимуляция предусматривает:

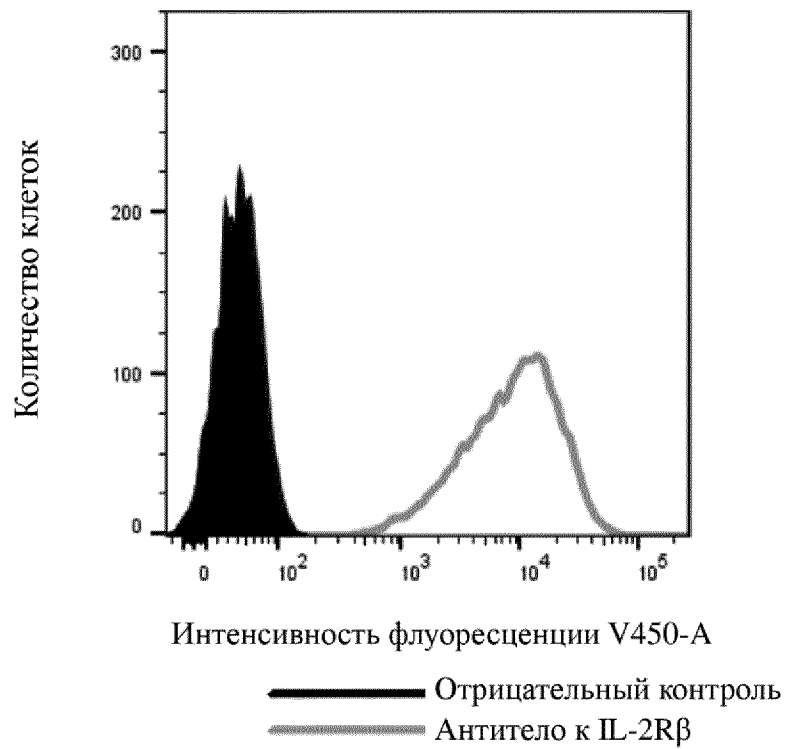
(a) предпочтительную стимуляцию фосфорилирования STAT5 в регуляторных Т-клетках по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или NK-клетками;

(b) предпочтительную стимуляцию пролиферации регуляторных Т-клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками или NK-клетками;

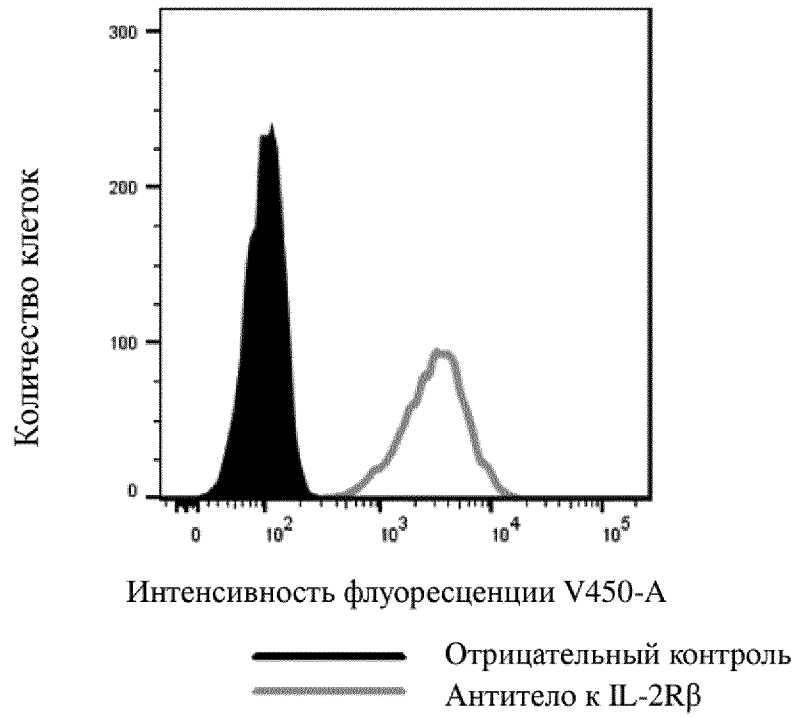
и/или (с) увеличение отношения регуляторных Т-клеток к нерегуляторным Т-клеткам или увеличение отношения регуляторных Т-клеток к НК-клеткам.



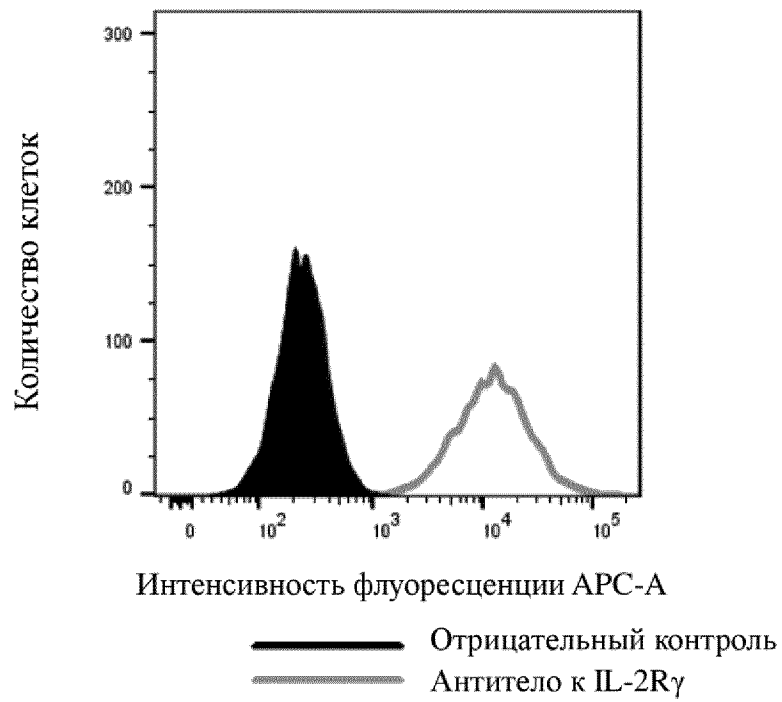
Фиг. 1



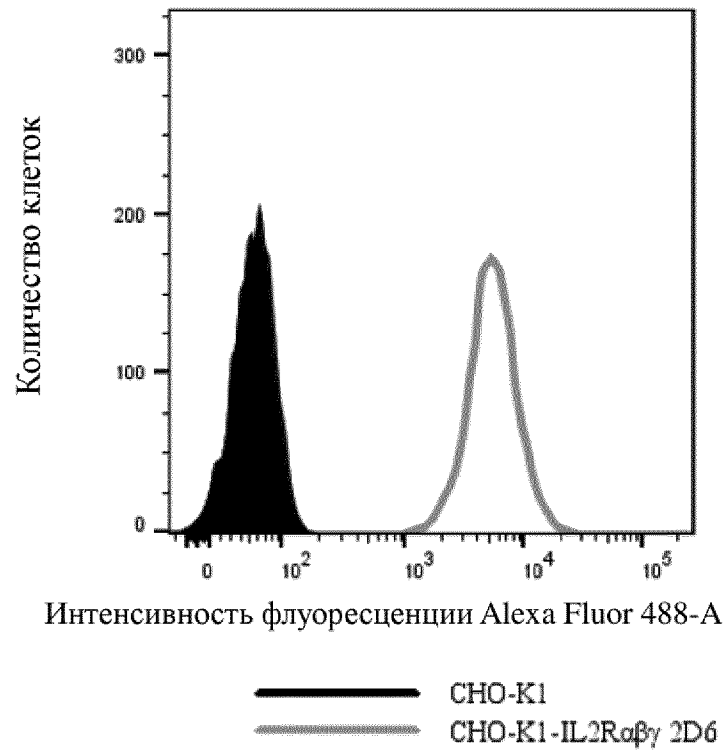
Фиг. 2



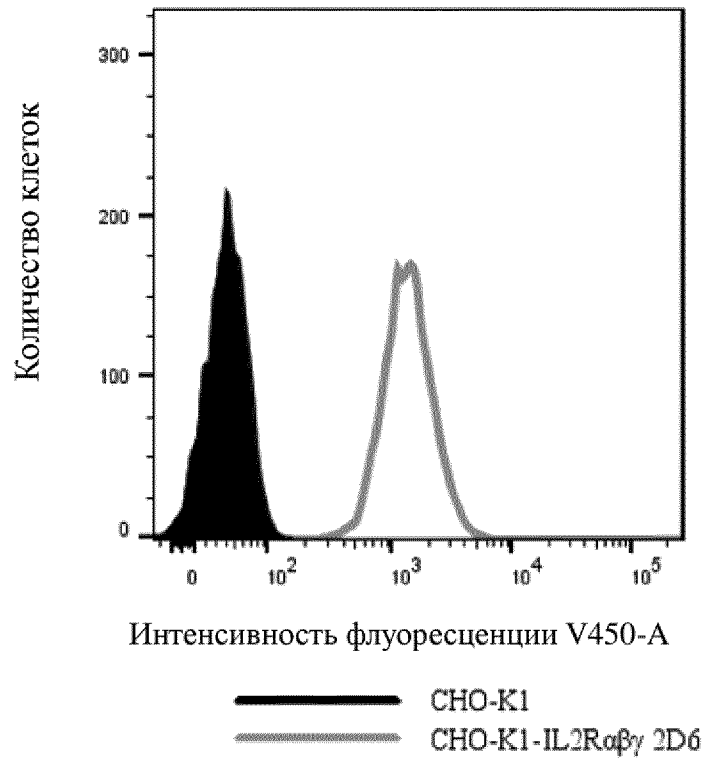
Фиг. 3А



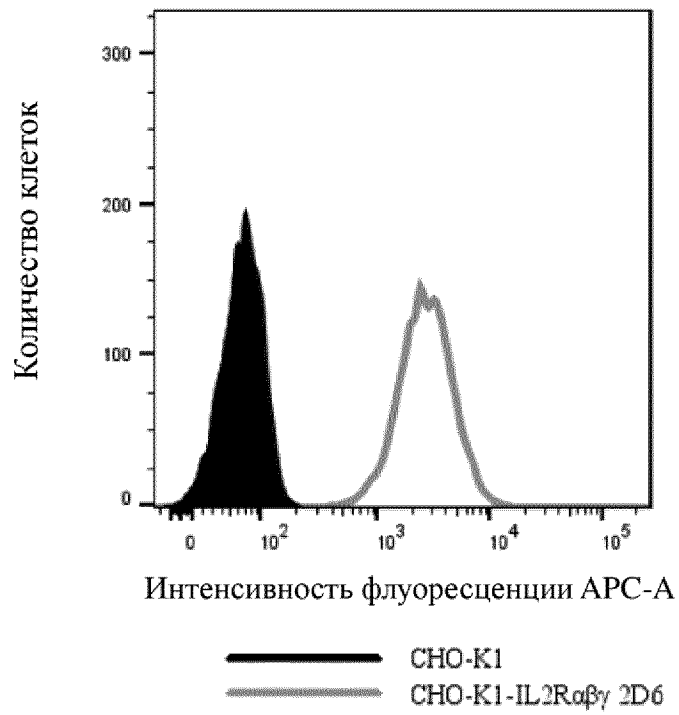
Фиг. 3В



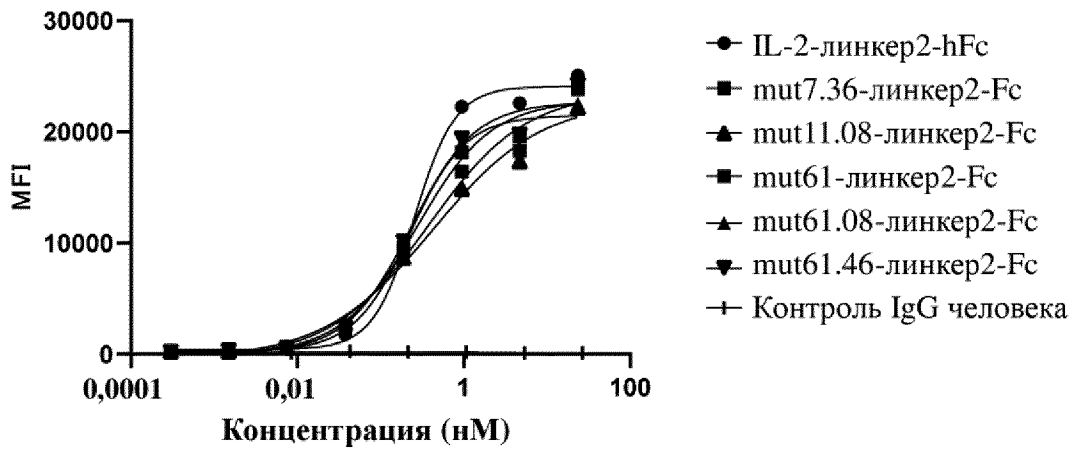
Фиг. 4А



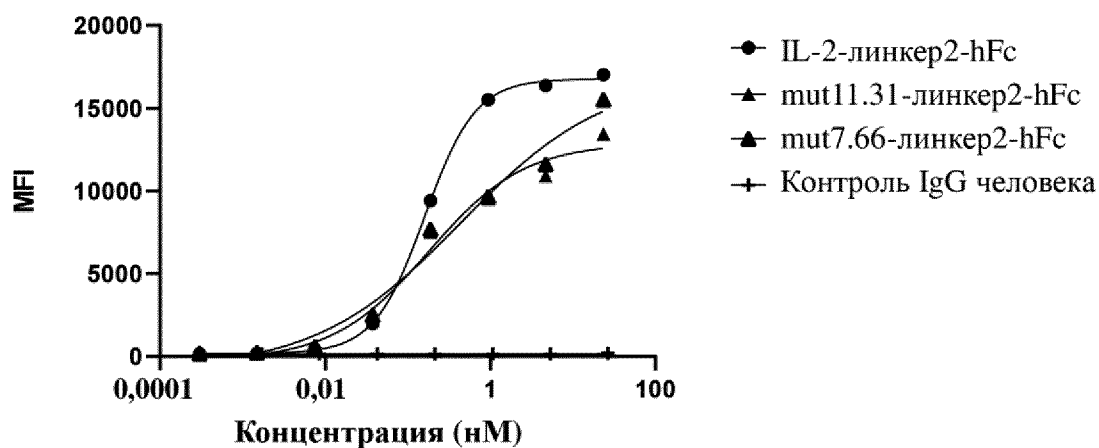
Фиг. 4В



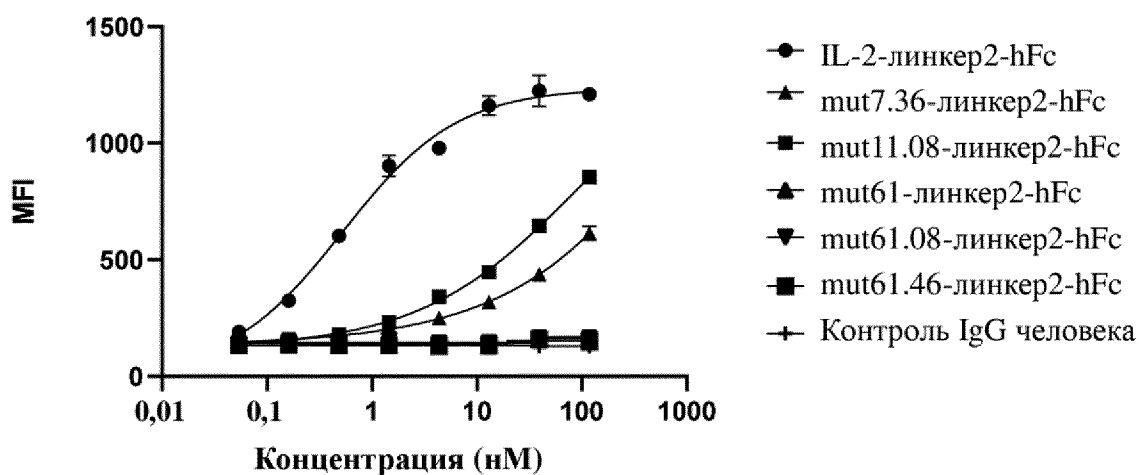
Фиг. 4С



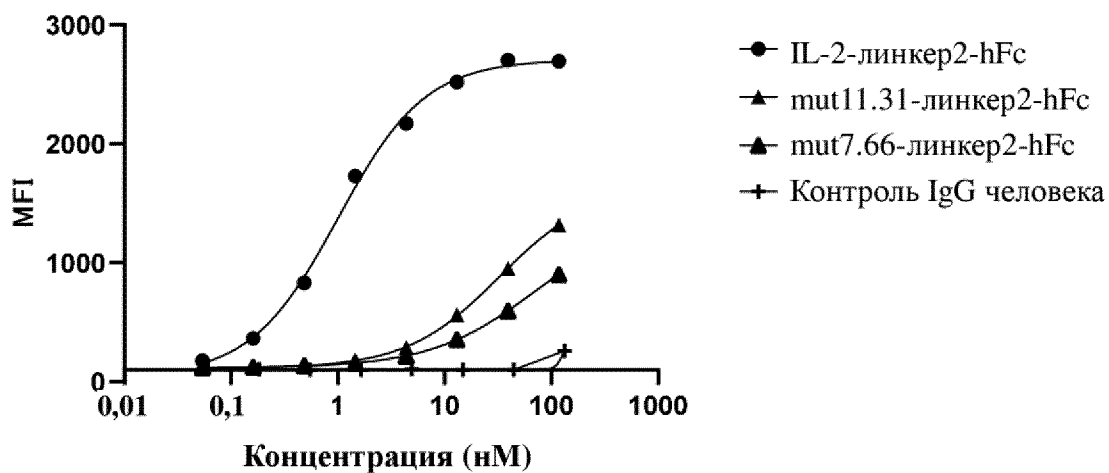
Фиг. 5А



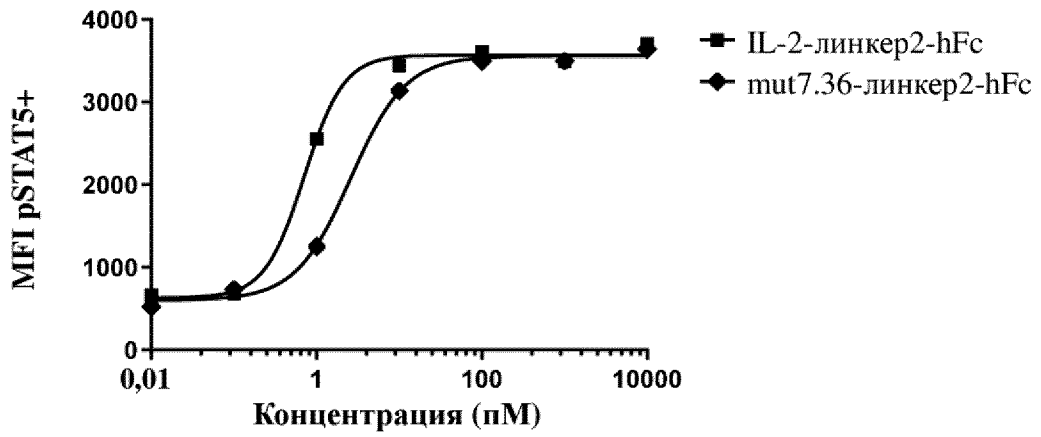
Фиг. 5B



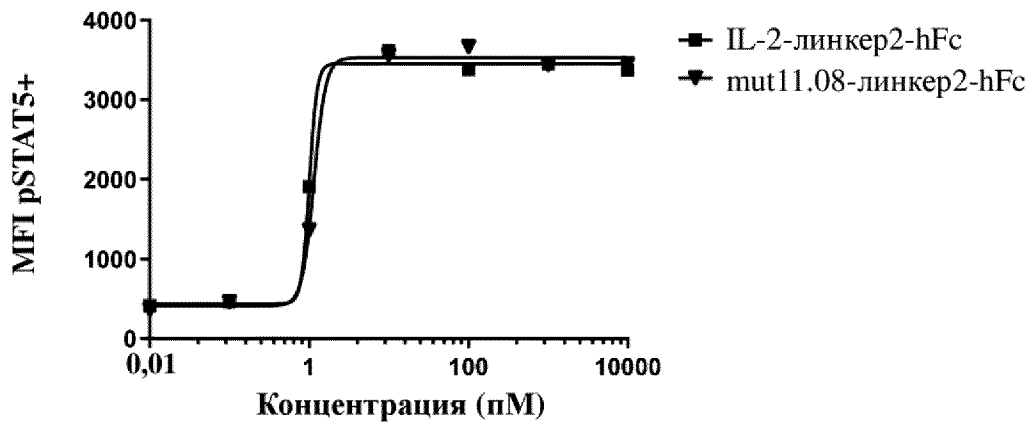
Фиг. 5C



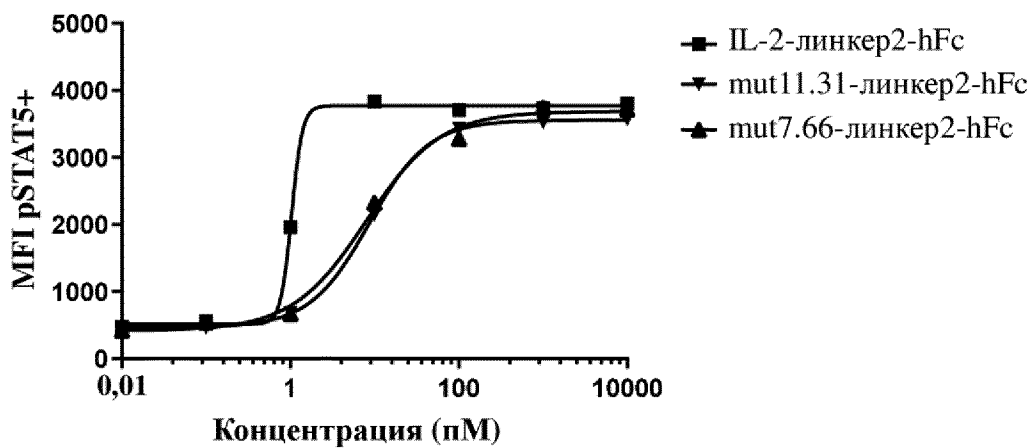
Фиг. 5D



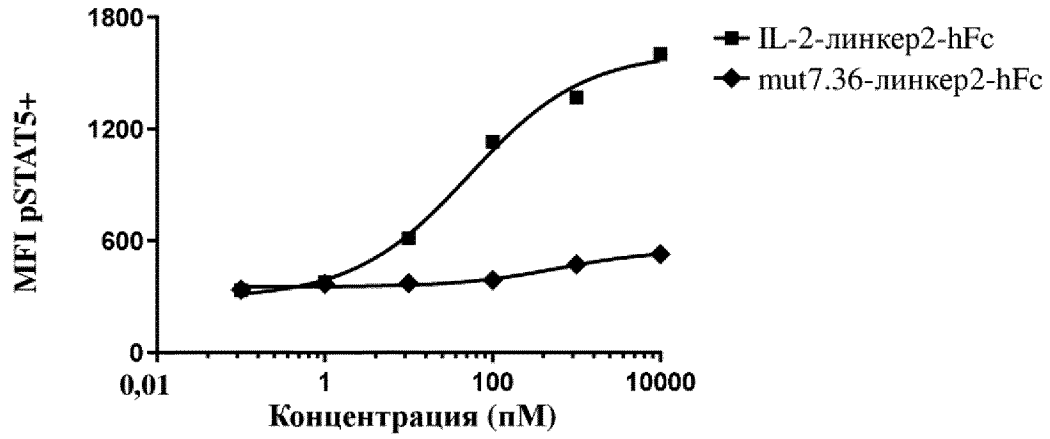
Фиг. 6А



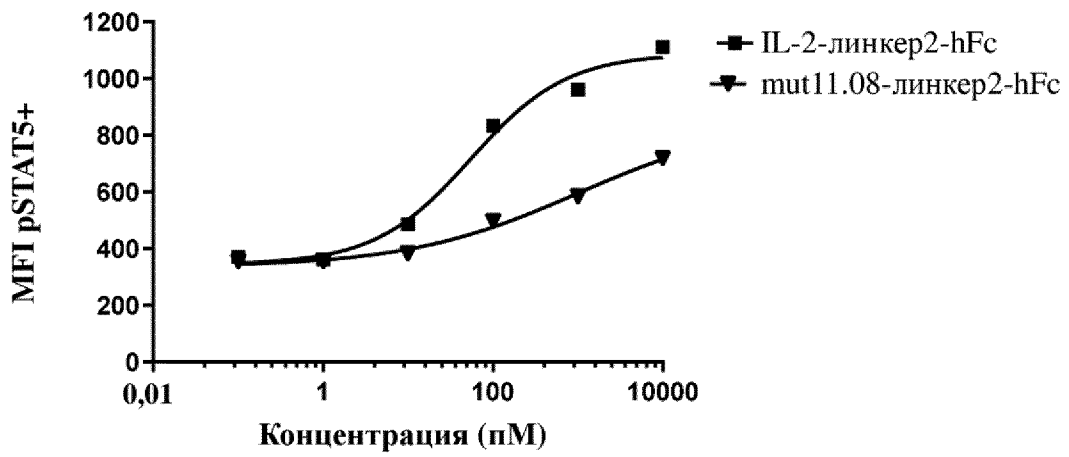
Фиг. 6В



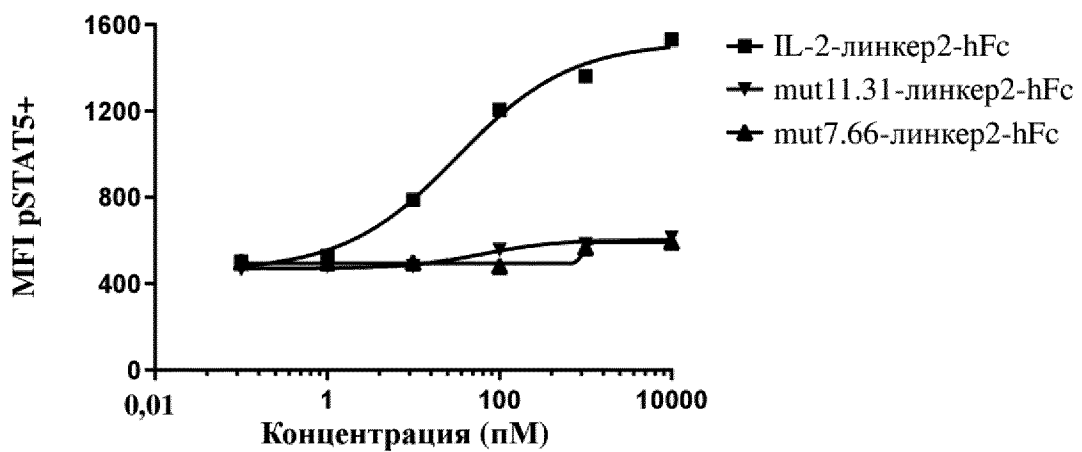
Фиг. 6С



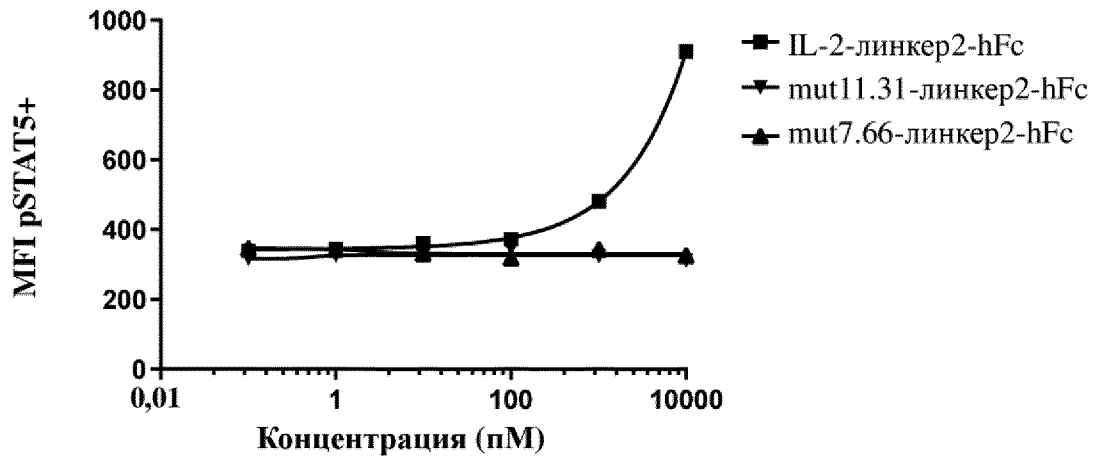
Фиг. 6D



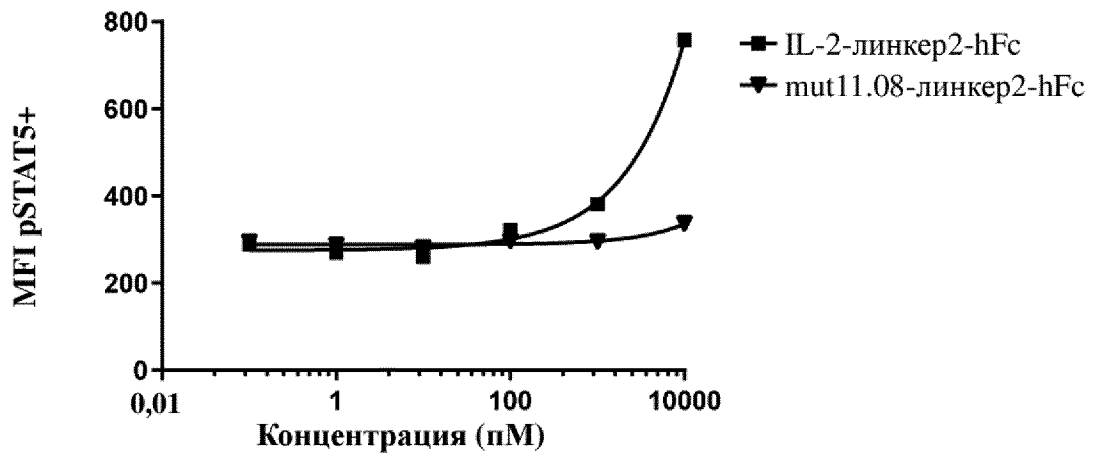
Фиг. 6E



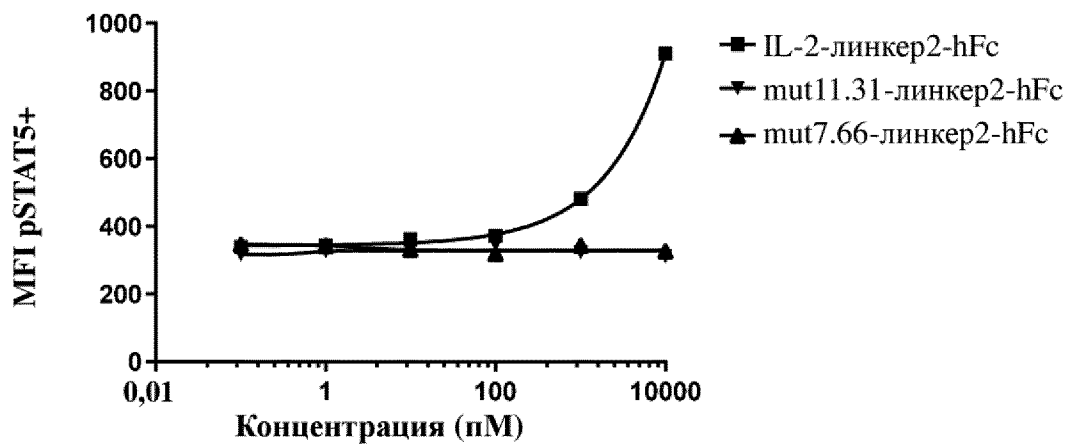
Фиг. 6F



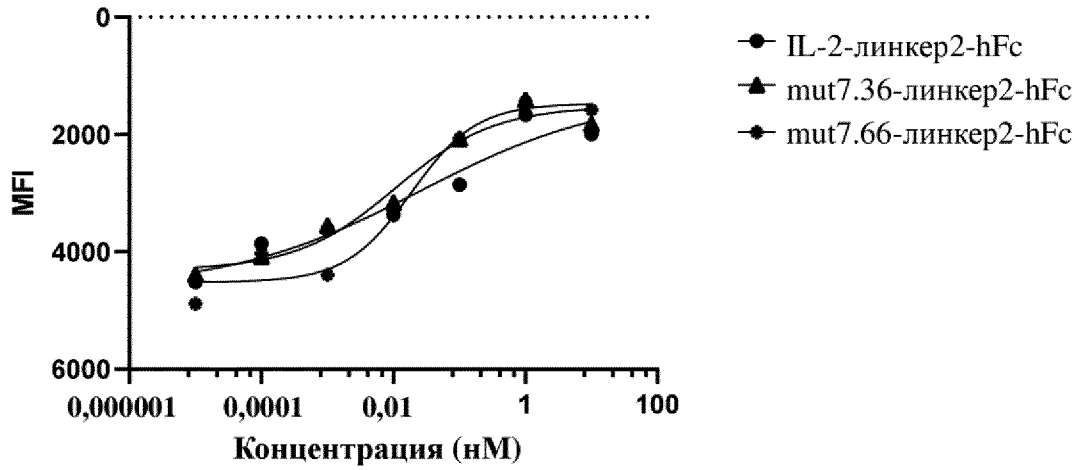
Фиг. 6G



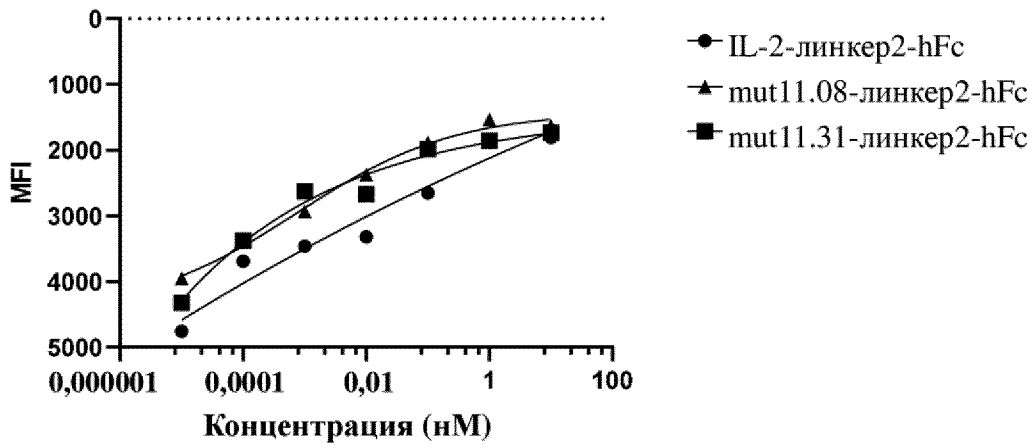
Фиг. 6H



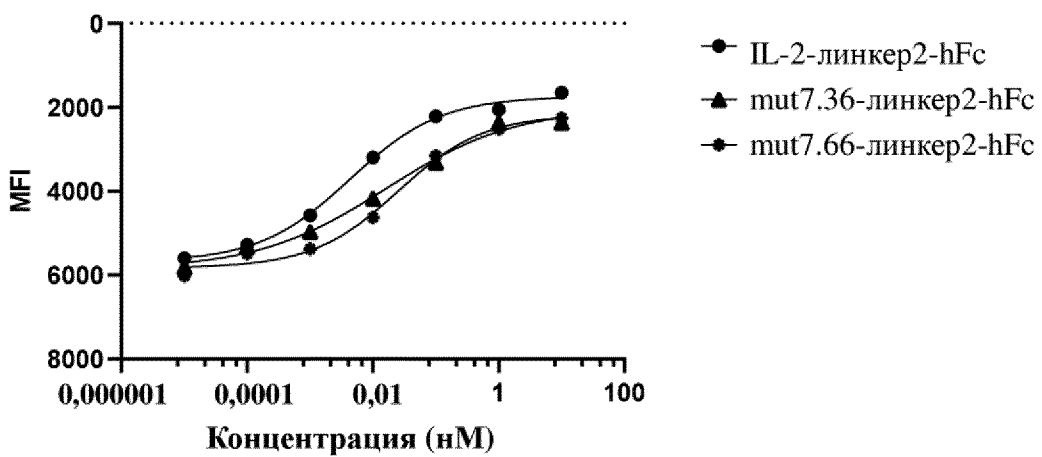
Фиг. 6I



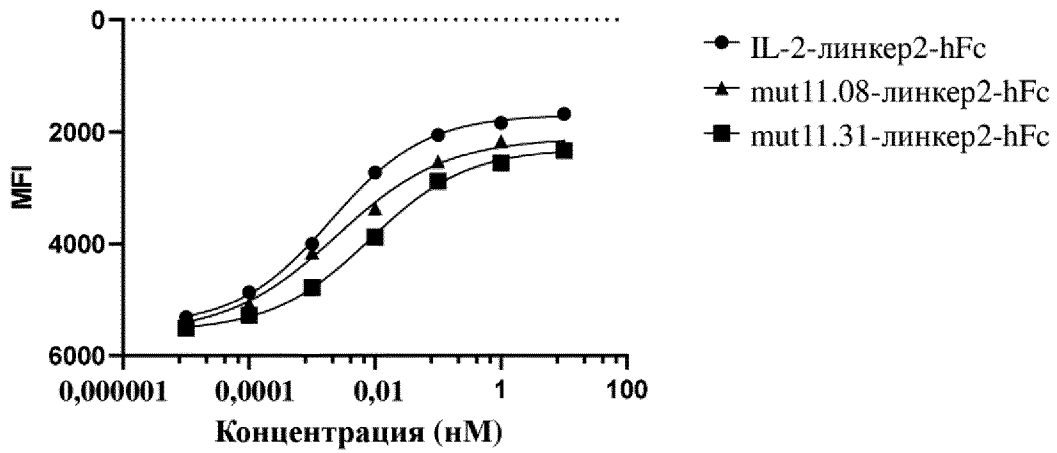
Фиг. 7А



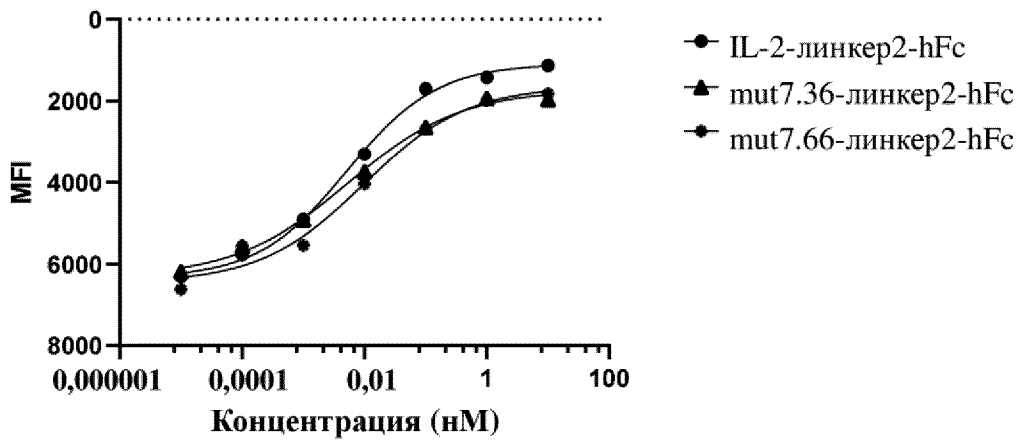
Фиг. 7В



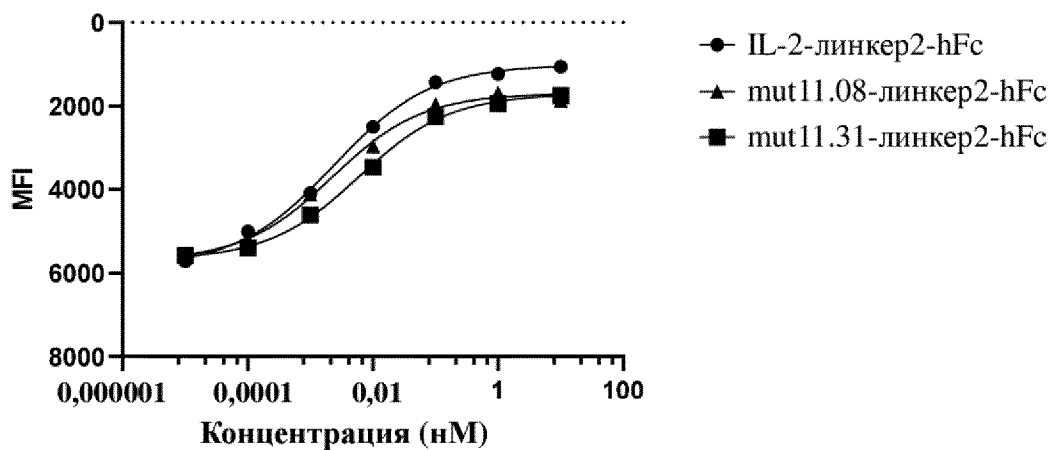
Фиг. 7С



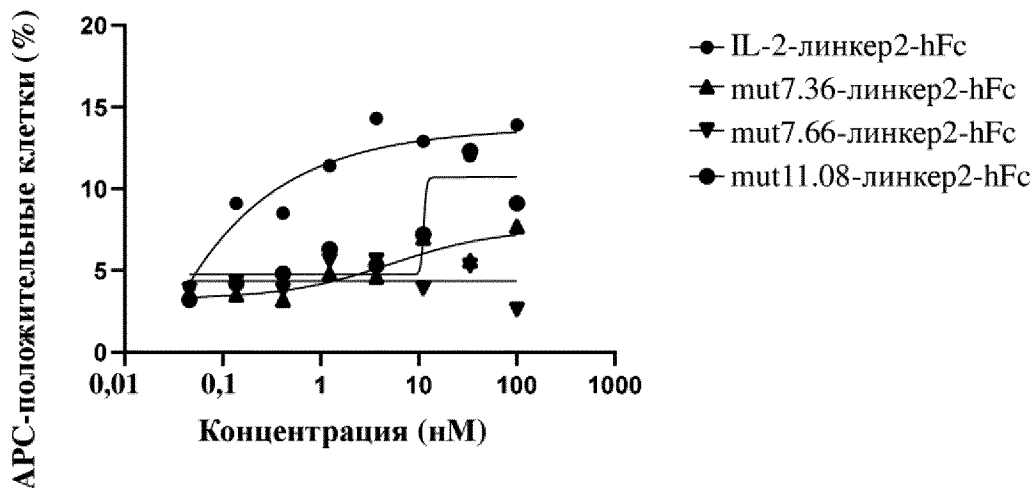
Фиг. 7D



Фиг. 7E

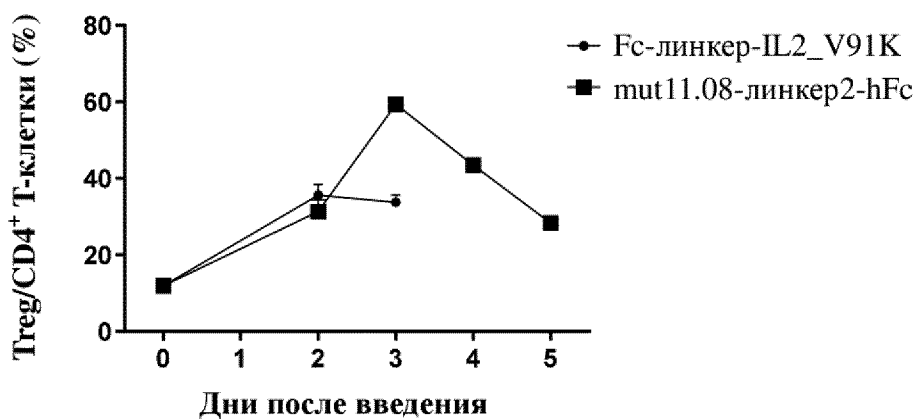


Фиг. 7F

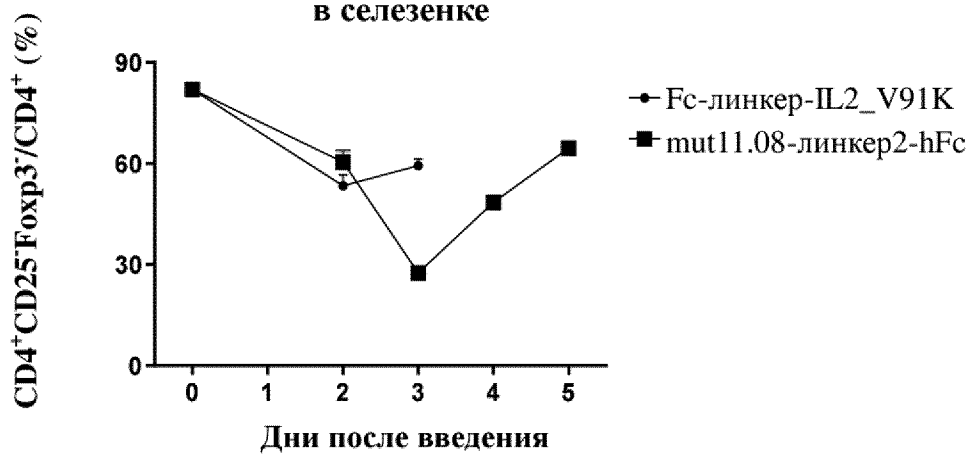


Фиг. 8

Соотношение Treg-клеток в селезенке

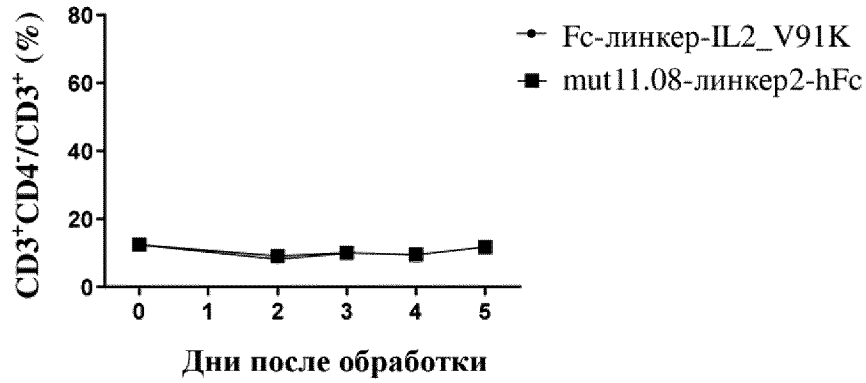


Фиг. 9А

Соотношение CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ в селезенке

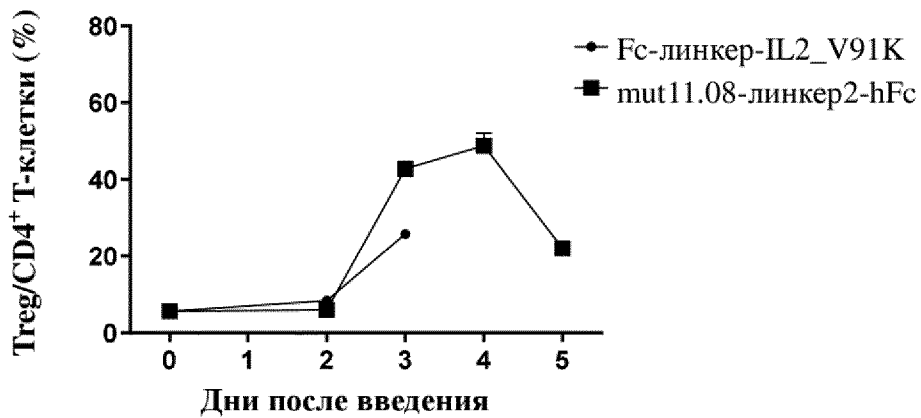
Фиг. 9В

Соотношение $CD3^+CD4^-$ клеток в селезенке



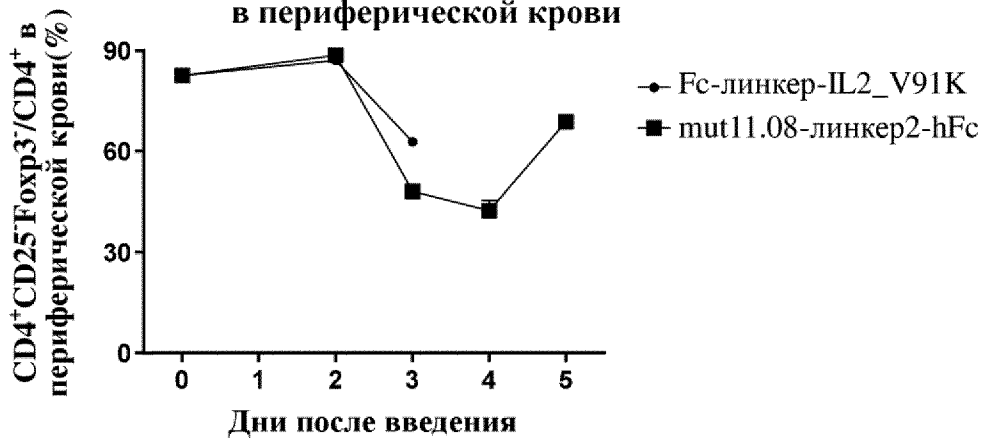
Фиг. 9С

Соотношение Treg в периферической крови

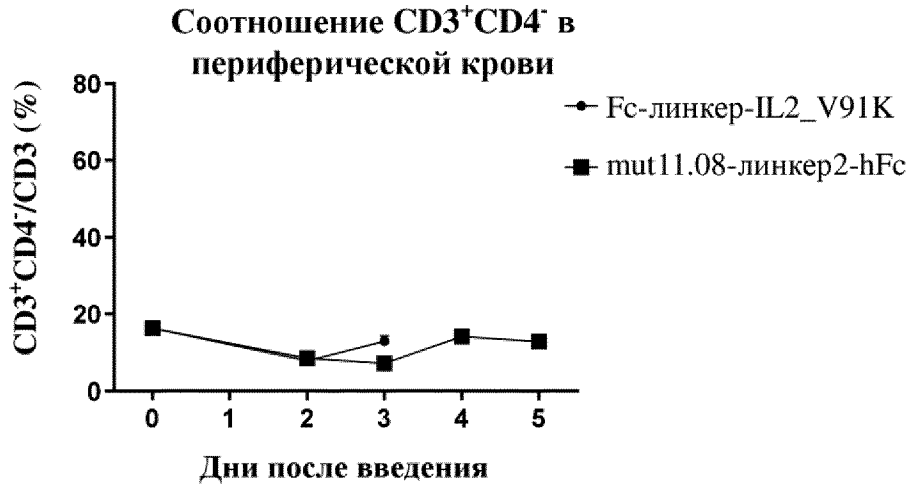


Фиг. 10А

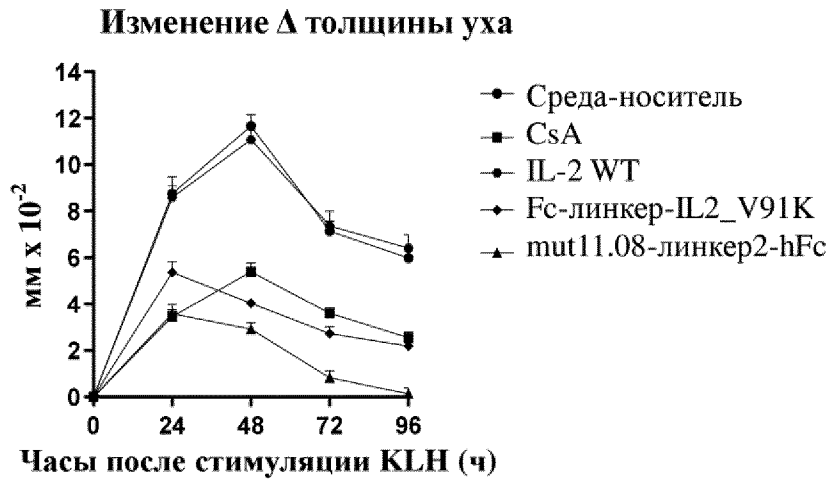
Соотношение $CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ в периферической крови



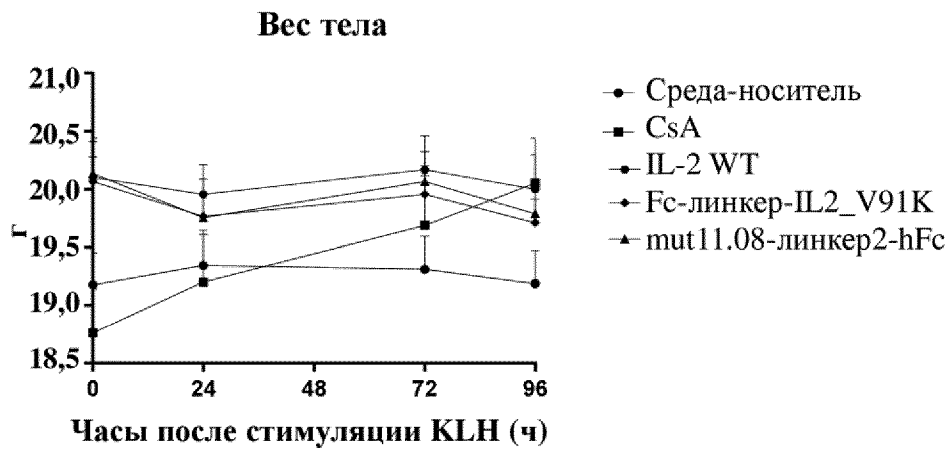
Фиг. 10В



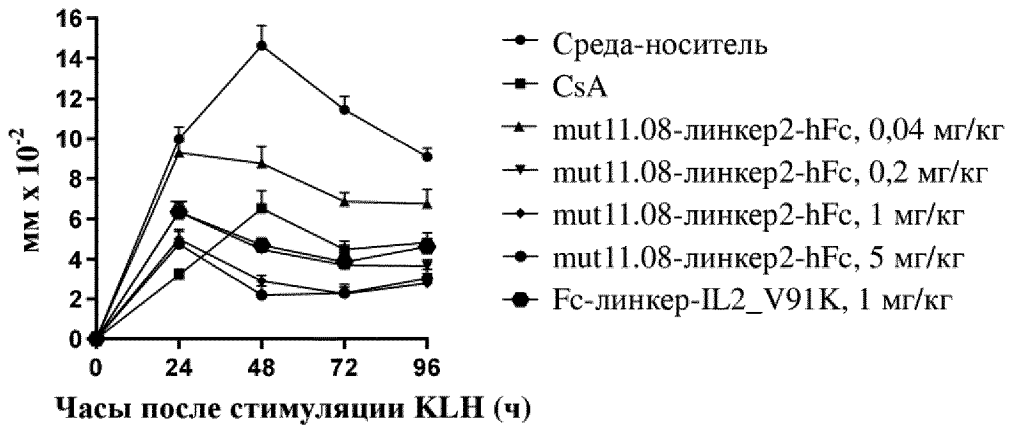
Фиг. 10С



Фиг. 11А

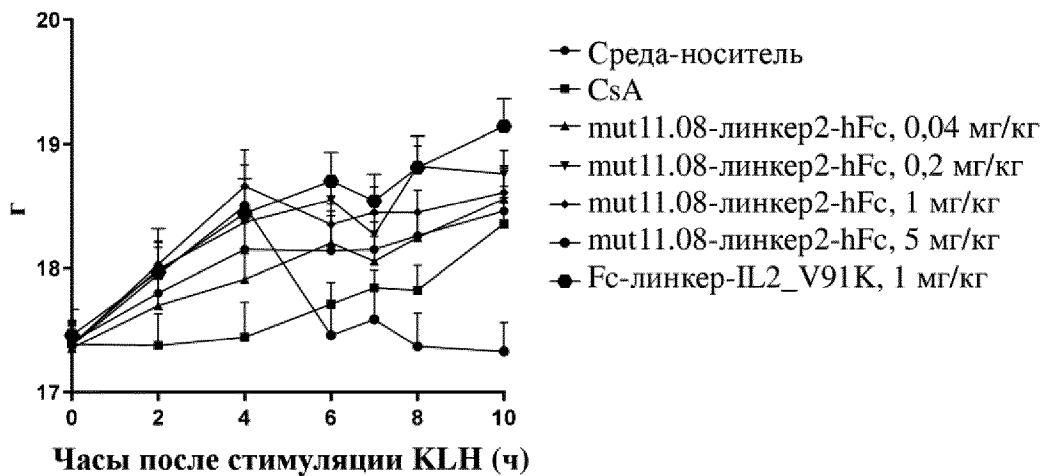


Фиг. 11В

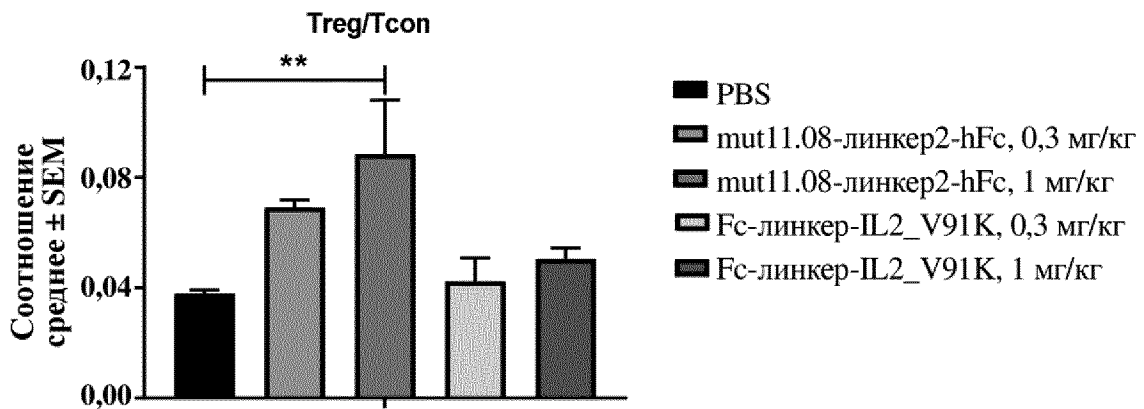
Изменение Δ толщины уха

Фиг. 12А

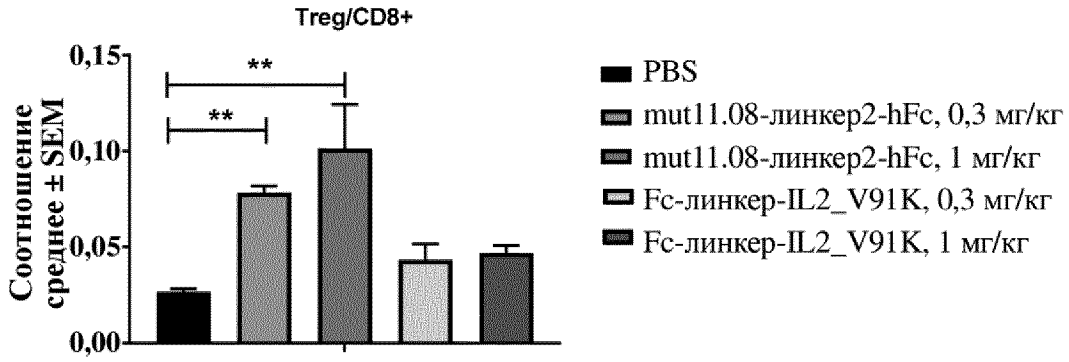
Вес тела



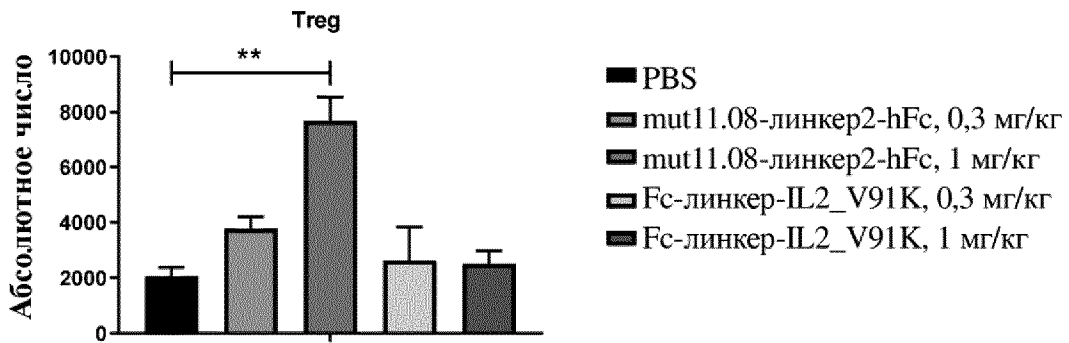
Фиг. 12В



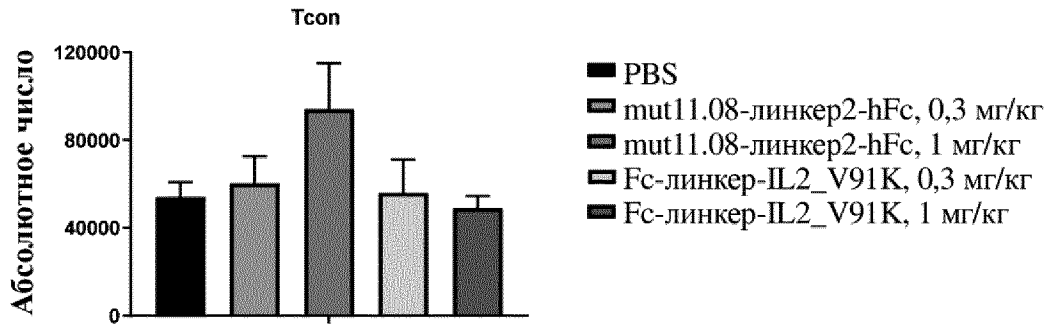
Фиг. 13А



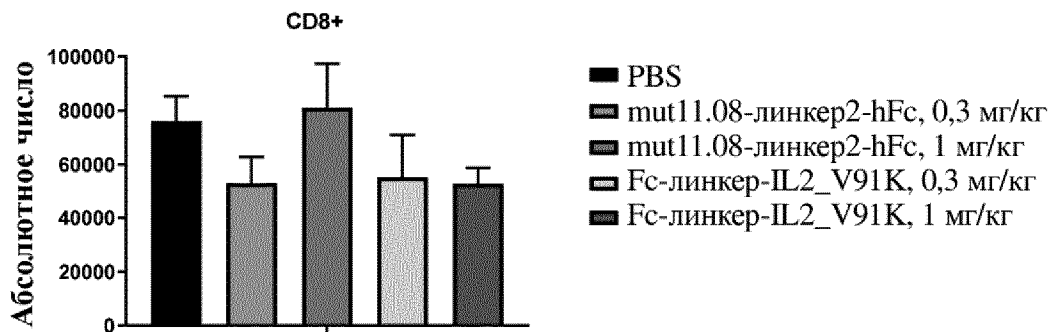
Фиг. 13В



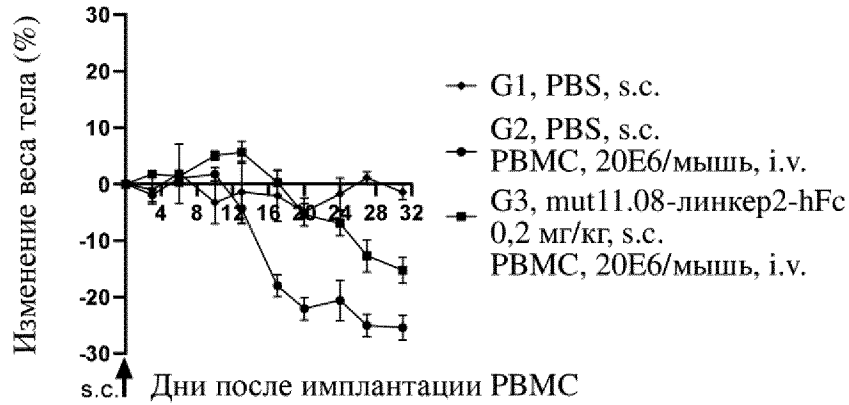
Фиг. 14А



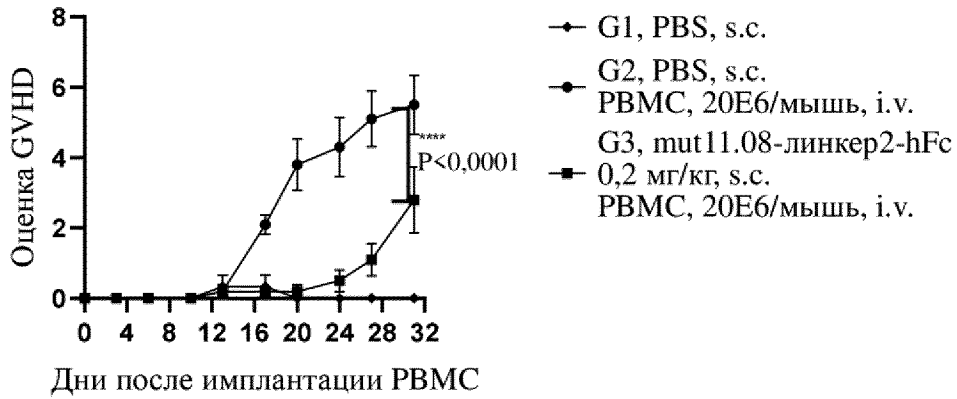
Фиг. 14В



Фиг. 14С

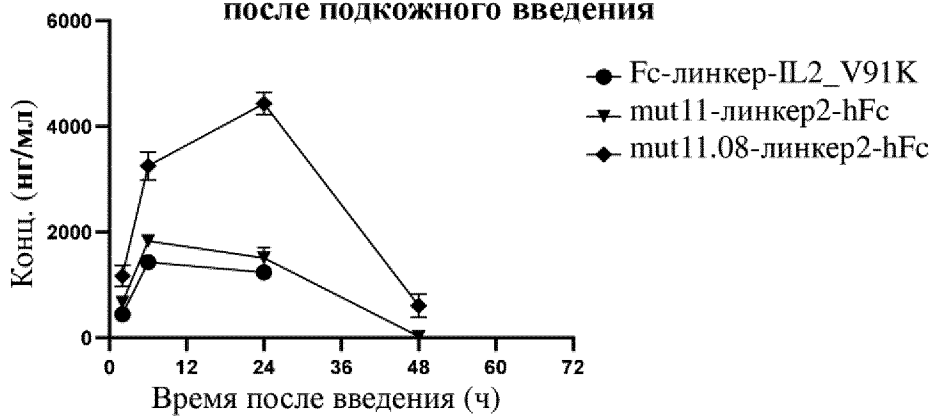


Фиг. 15А



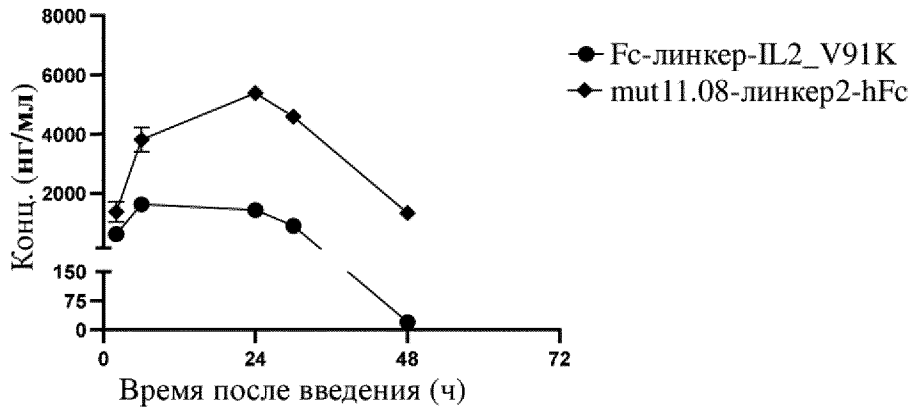
Фиг. 15В

Концентрация лекарственного средства в плазме крови у мышей дикого типа после подкожного введения



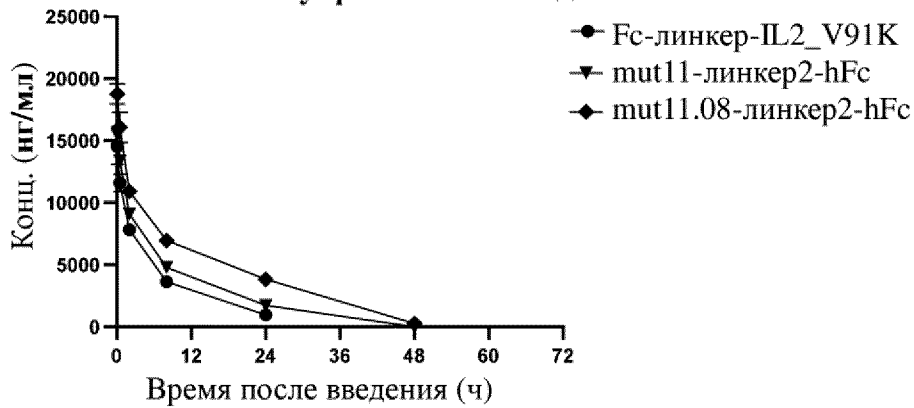
Фиг. 16А

**Концентрация лекарственного средства в
плазме крови у мышей дикого типа после
подкожного введения**



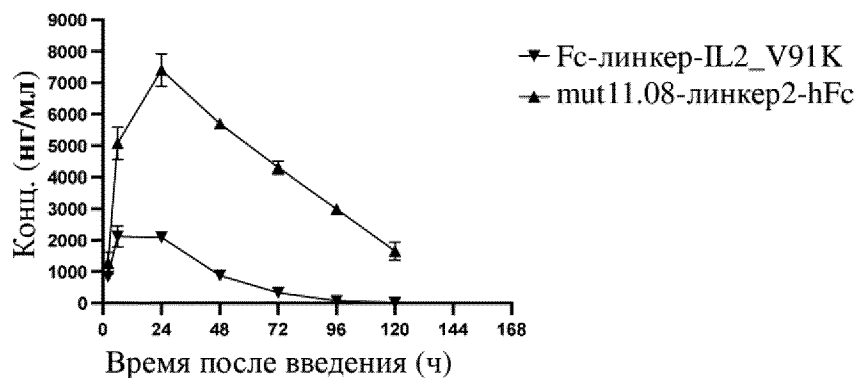
Фиг. 16В

**Концентрация лекарственного средства в
плазме крови у мышей дикого типа после
внутривенного введения**



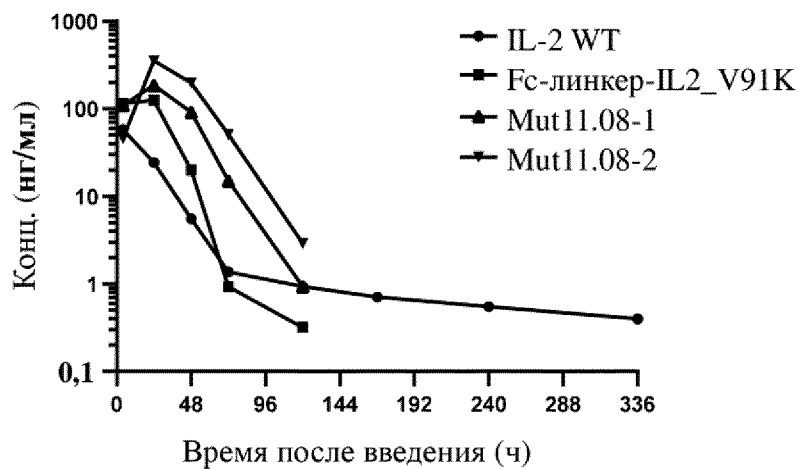
Фиг. 17

**Концентрация лекарственного средства в плазме
крови у мышей, которым инокулировали РВМС,
после подкожного введения**



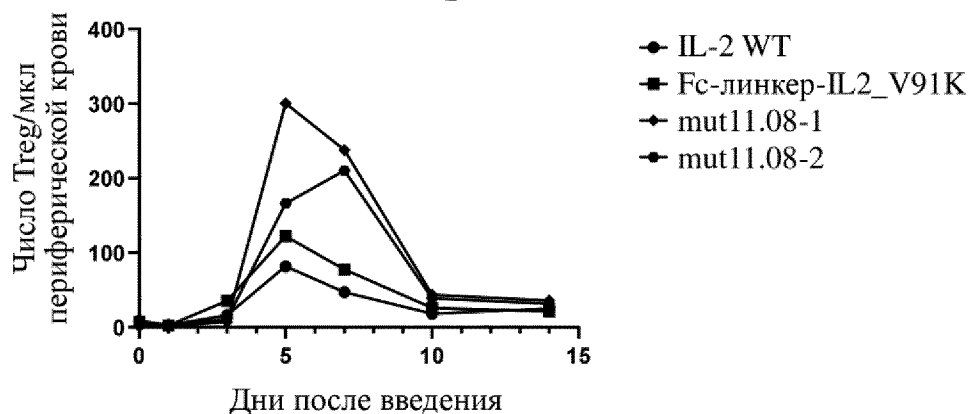
Фиг. 18

**Концентрация лекарственного средства в
плазме крови у яванского макака после
подкожного введения**



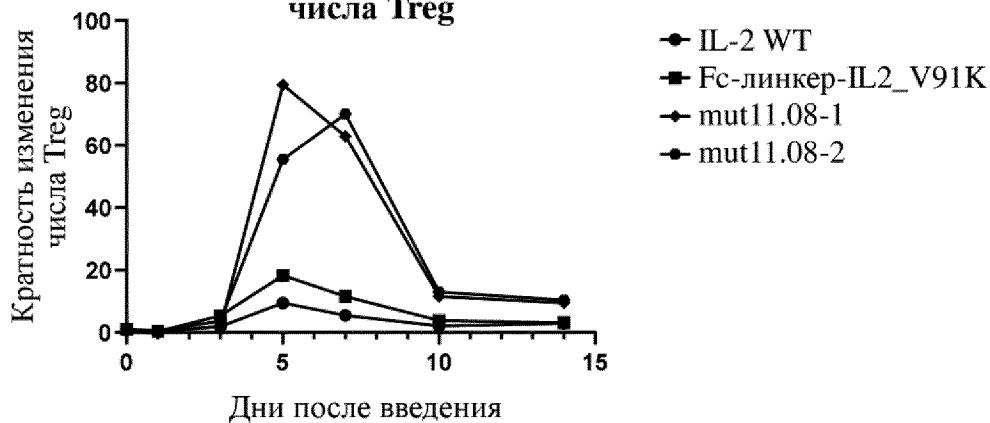
Фиг. 19

Число Treg



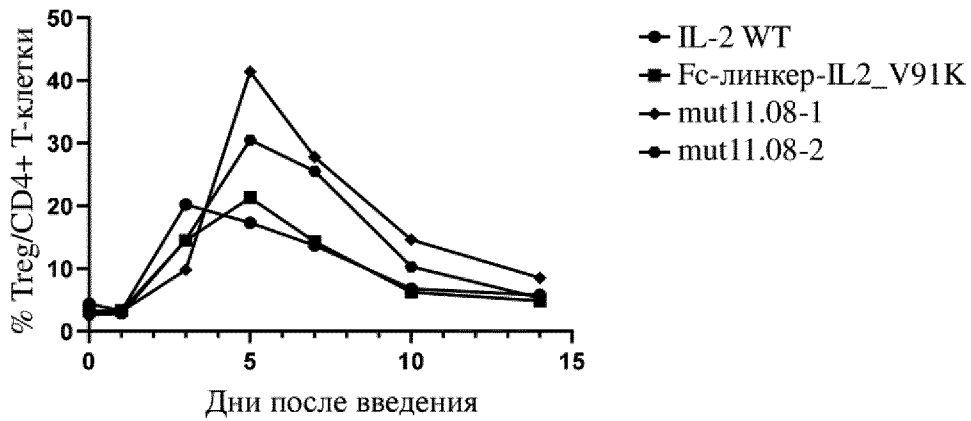
Фиг. 20А

**Кратность изменения
числа Treg**



Фиг. 20В

Соотношение Treg



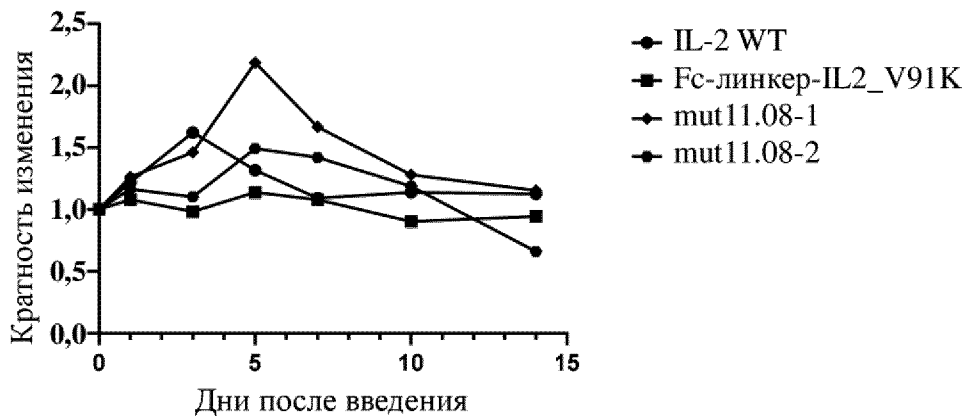
Фиг. 20С

Соотношение Treg Ki67+ клеток



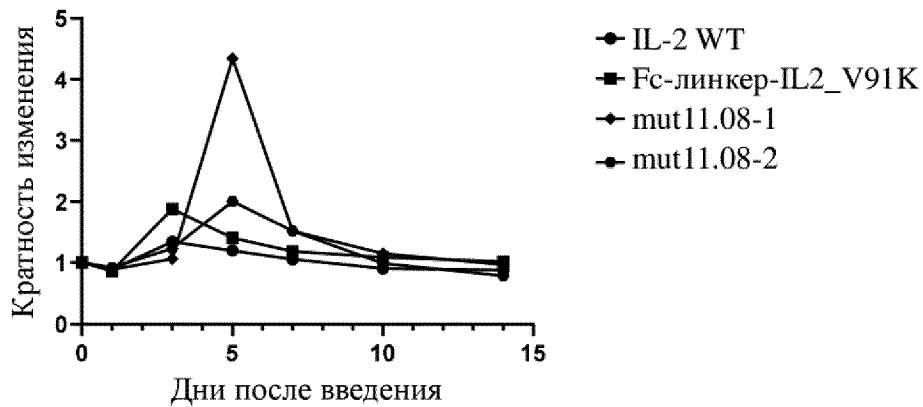
Фиг. 20D

Кратность изменения MFI FoxP3



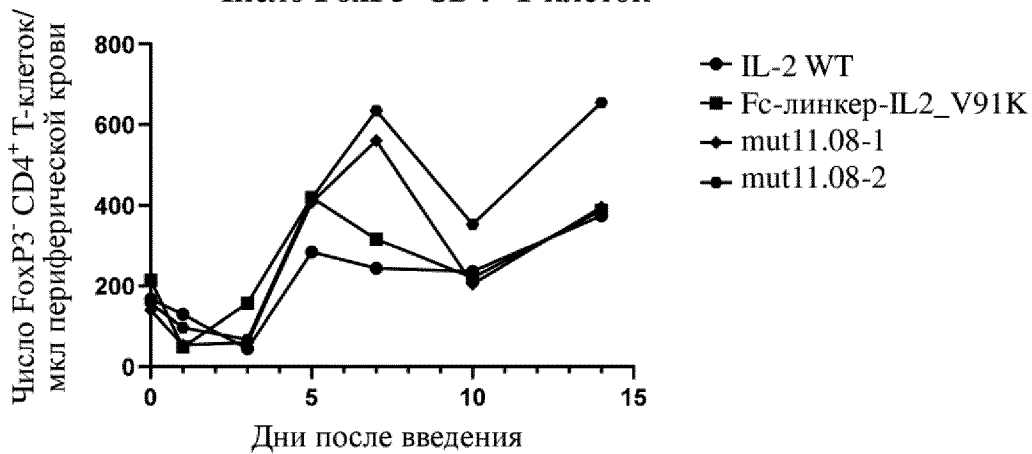
Фиг. 20Е

Кратность изменения MFI CD25



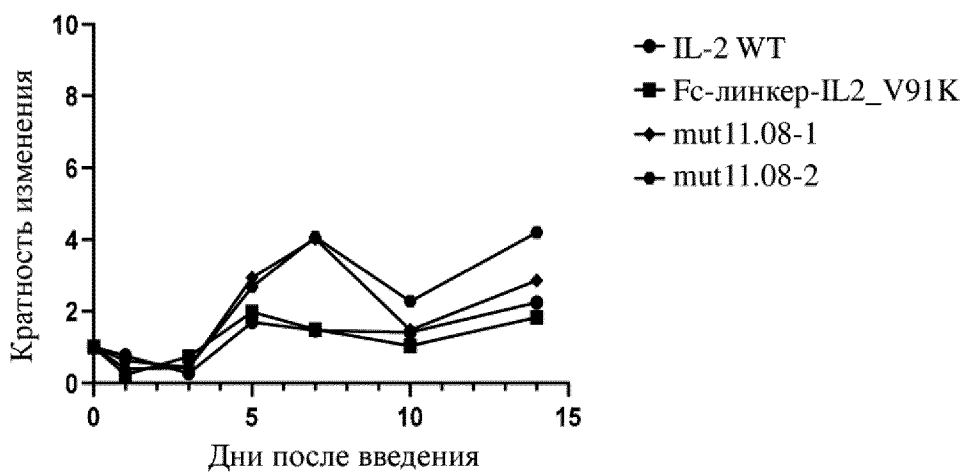
Фиг. 20F

Число FoxP3⁺ CD4⁺ Т-клеток

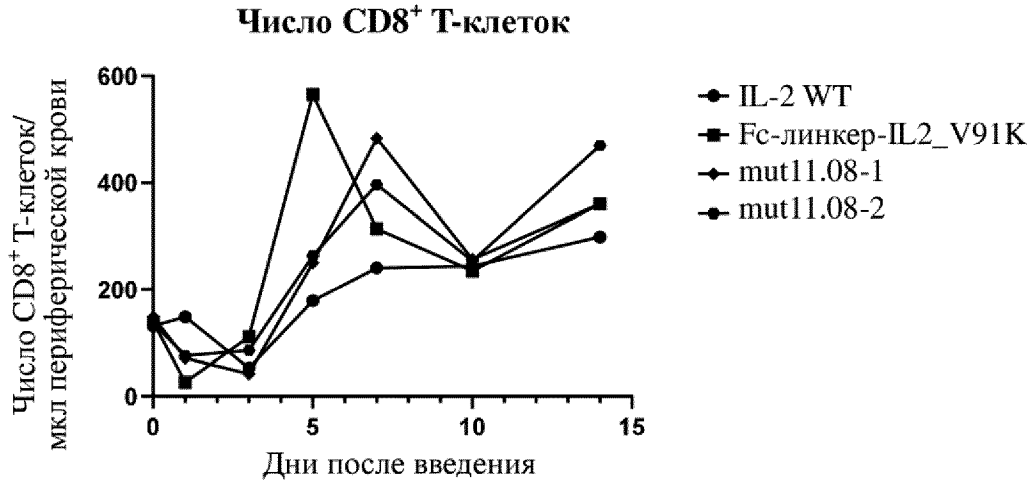


Фиг. 21А

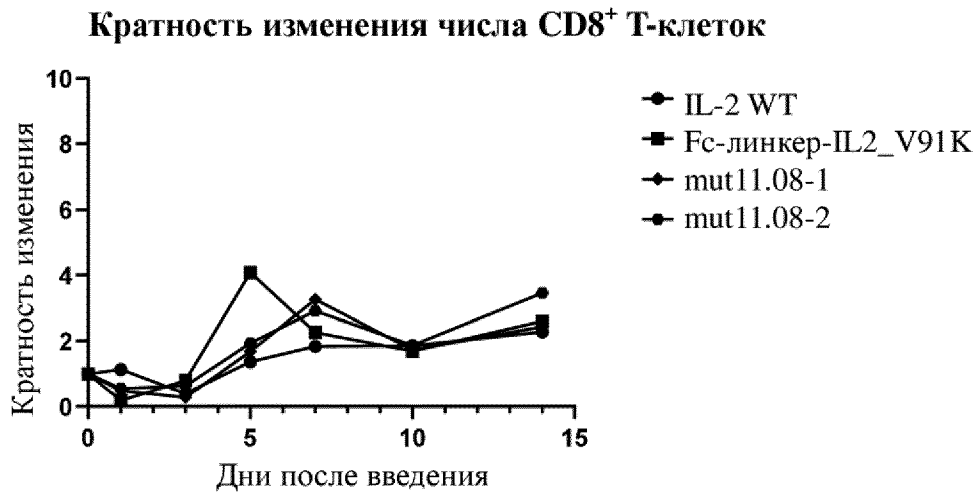
Кратность изменения числа FoxP3⁺ CD4⁺ Т-клеток



Фиг. 21В



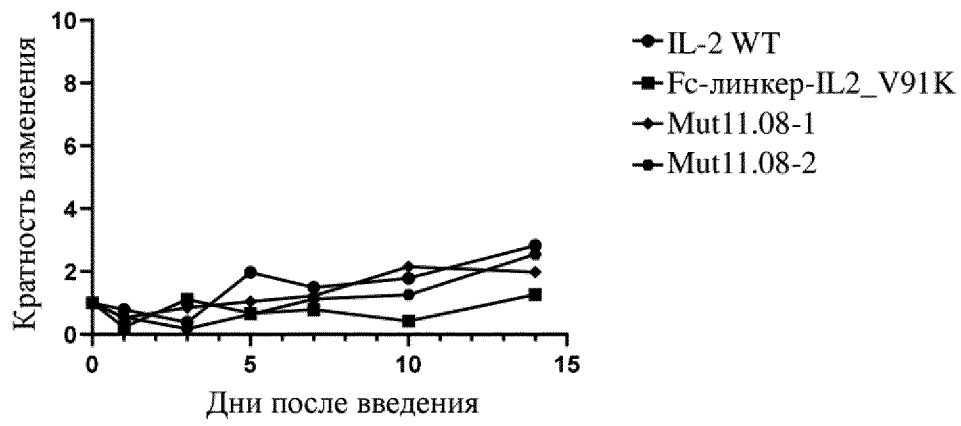
Фиг. 21С



Фиг. 21D



Фиг. 21E

Кратность изменения числа НК-клеток**Фиг. 21F**