

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048038**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.22**

(21) Номер заявки  
**202290569**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.13**

(51) Int. Cl. **C07K 14/55** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

---

(54) **МУТЕИНЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ДЛЯ ЭКСПАНСИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК**

---

(31) **62/886,283**

(32) **2019.08.13**

(33) **US**

(43) **2022.07.01**

(86) **PCT/US2020/046202**

(87) **WO 2021/030602 2021.02.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Бейтс Даррен Л., Сон Сью Дж.,  
Катгеролл Ханна, Ван Чжулунь (US)**

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

(56) **WO-A2-2016164937  
WO-A2-2014153111  
WO-A1-2017044464  
WO-A2-2009061853  
WO-A1-9960128**

**LAURENCE B. PETERSON ET AL.:**  
"A long-lived IL-2 mutein that selectively  
activates and expands regulatory T cells as a  
therapy for autoimmune disease", JOURNAL OF  
AUTOIMMUNITY, vol. 95, 13 November 2018  
(2018-11-13), pages 1-14, XP055746622, GB, ISSN:  
0896-8411, DOI: 10.1016/j.jaut.2018.10.017, the  
whole document

---

(57) В изобретении предусмотрены мутеины ИЛ-2 и молекулы на основе мутеина ИЛ-2 и Fc-слитого белка, которые предпочтительно увеличивают в количестве и активируют клетки и пригодны для крупномасштабного производства. Также в изобретении предусмотрены способы создания и применения композиций по изобретению.

**B1**

**048038**

**048038**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США с серийным номером 62/886283, поданной 13 августа 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Предпосылки

IL-2 связывает три субъединицы трансмембранного рецептора: IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ , которые совместно активируют внутриклеточные события передачи сигнала при связывании IL-2, и CD25 (IL-2R $\alpha$ ), который служит для стабилизации взаимодействия между IL-2 и IL-2R $\beta\gamma$ . Сигналы, доставляемые IL-2R $\beta\gamma$ , включают сигналы путей PI3-киназы, Ras-MAP-киназы и STAT5.

T-клеткам требуется экспрессия CD25 для ответа на низкие концентрации IL-2, которые обычно присутствуют в тканях. T-клетки, которые экспрессируют CD25, включают FOXP3+ регуляторные T-клетки (клетки Treg), которые необходимы для подавления аутоиммунного воспаления, и FOXP3- T-клетки, которые активируются для экспрессии CD25. FOXP3- CD25+ T-эффекторные клетки (Teff) могут представлять собой либо CD4+, либо CD8+ клетки, оба из которых могут способствовать воспалению, аутоиммунитету, отторжению трансплантата органа или реакции "трансплантат против хозяина". Стимулированная IL-2 передача сигналов с участием STAT5 является критической для нормального роста и выживания клеток T-reg и для высокой экспрессии FOXP3.

В WO 2010/085495, находящейся в совместном использовании, авторами описано применение мутеинов IL-2 для преимушественной экспансии или стимуляции клеток Treg. При введении субъекту воздействие на клетки Treg является полезным для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Хотя мутеины IL-2, описанные в данном документе, применимы для экспансии клеток Treg по сравнению с клетками Teff *in vivo*, было желательно создать мутеины IL-2, которые характеризовались бы оптимальными свойствами в качестве терапевтического средства для человека.

### Краткое описание

В данном документе описаны мутеины IL-2, которые можно изготавливать с высоким выходом, и которые характеризуются фармакологической активностью. В частности, мутеины IL-2 по настоящему изобретению характеризуются улучшенным окном селективности Treg:Teff. При попытке получить такие молекулы для применения в качестве терапевтических средств для лечения человека произошел ряд неожиданных и непредсказуемых наблюдений. Композиции и способы, описанные в данном документе, представляют собой результат этой попытки.

Мутеины IL-2, описанные в данном документе, характеризуются относительно низкой вероятностью создания иммунного ответа против мутеина IL-2 и/или эндогенного IL-2 и обеспечивают предпочтительную экспансию и активацию Treg. Более того, в определенных вариантах осуществления мутеин IL-2 слит с молекулой, например антителом Fc, что приводит к повышению периода полужизни в сыворотке крови при введении субъекту. Мутеины IL-2 характеризуются коротким периодом полужизни в сыворотке крови (от 3 до 5 часов при подкожной инъекции). Иллюстративные слияния мутеина IL-2 и Fc, описанные в данном документе, характеризуются периодом полужизни у человека, составляющим по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней или по меньшей мере 25 дней. Этот эффект в отношении фармакокинетики мутеинов IL-2 позволяет снижать или реже вводить дозу терапевтического средства на основе мутеина IL-2.

Более того, при создании большой фармацевтической молекулы необходимо учитывать возможность производства большой молекулы в больших количествах при сведении к минимуму агрегации и приведении к максимуму стабильности молекулы. Молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка демонстрируют такие свойства.

Кроме того, в определенных вариантах осуществления белок на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержит Fc-область IgG1. При желании устранить эффекторные функции IgG1 (например, активность ADCC) было обнаружено, что мутация аспарагина в положении 297 на глицин (N297G; схема нумерации согласно EU) обеспечивала значительно улучшенную эффективность очистки и биофизические свойства по сравнению с другими мутациями, которые приводят к агликозилированию Fc IgG1. В предпочтительных вариантах осуществления в Fc встраивают цистеины для создания дисульфидных связей, что приводило к повышению стабильности агликозилированной Fc-содержащей молекулы. Применимость агликозилированного Fc выходит за рамки контекста молекулы на основе Fc-слитого белка и мутеина IL-2. Таким образом, в данном документе предусмотрены Fc-содержащие молекулы, Fc-слитые белки и антитела, содержащие замену N297G и необязательно замену одного или более дополнительных остатков на цистеин.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мутеину человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:1, при этом указанный мутеин IL-2 содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K,

D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E, M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и V91S, H16E; и преимущественно стимулирует регуляторные Т-клетки по сравнению с другими Т-клетками или NK-клетками, как в анализах *in vitro*, так и у гуманизированных мышей (мышь NSG, реконструированные посредством CD34+ гемопоэтических стволовых клеток). В одном варианте осуществления указанный мутеин на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:1. В другом варианте осуществления указанный мутеин на по меньшей мере 97% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:1. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность указанного мутеина отличается от аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:1, только по C125A и в одном положении, выбранном из V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K, D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E, M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и V91S, H16E.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к Fc-слитому белку, содержащему Fc и мутеин человеческого IL-2, как описано выше. В одном варианте осуществления Fc представляет собой Fc человеческого IgG1. В другом варианте осуществления Fc человеческого IgG1 содержит одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного Fc. В другом варианте осуществления человеческого IgG1 предусматривает замену в N297. В другом варианте осуществления замена в N297 представляет собой N297G. В другом варианте осуществления Fc-слитый белок предусматривает замену или делецию С-концевого лизина указанного Fc человеческого IgG. В другом варианте осуществления С-концевой лизин указанного Fc человеческого IgG удален. В другом варианте осуществления линкер соединяет участки Fc и мутеина человеческого IL-2 в указанном белке. В другом варианте осуществления линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7). В другом варианте осуществления линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5). В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает присоединение, замену или делецию аминокислоты, приводящие к изменению профиля гликозилирования указанного Fc-слитого белка при экспрессии в клетках млекопитающих. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3N или T3A. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3N. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает мутацию S5. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает мутацию S5T. В другом варианте осуществления указанный Fc-слитый белок содержит димер Fc. В другом варианте осуществления указанный Fc-слитый белок содержит два мутеина IL-2. В другом варианте осуществления указанный Fc-слитый белок содержит один мутеин IL-2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей мутеин человеческого IL-2, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2, как описано выше. В одном варианте осуществления указанная Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2 кодируются в одной открытой рамке считывания. В другом варианте осуществления Fc представляет собой Fc человеческого IgG1. В другом варианте осуществления Fc человеческого IgG1 содержит одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного Fc. В другом варианте осуществления человеческого IgG1 предусматривает замену в N297. В другом варианте осуществления замена в N297 представляет собой N297G. В другом

варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует замену или делецию С-концевого лизина указанного Fc человеческого IgG. В другом варианте осуществления С-концевой лизин указанного Fc человеческого IgG удален. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота дополнительно кодирует линкер, соединяющий Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2. В другом варианте осуществления линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT, или (SEQ ID NO: 6), и YGNGT (SEQ ID NO: 7). В другом варианте осуществления линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5). В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает присоединение, замену или делецию аминокислоты, приводящие к изменению профиля гликозилирования белка, содержащего указанный мутеин IL-2, при экспрессии в клетках млекопитающих. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3N или T3A. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 предусматривает замену T3N. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает мутацию S5. В другом варианте осуществления мутеин IL-2 дополнительно предусматривает мутацию S5T.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, описанную выше, функционально связанную с промотором.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, описанную выше. В одном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. В другом варианте осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В другом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой *E. coli*. В другом варианте осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В другом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В другом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения мутеина человеческого IL-2, включающему культивирование клетки-хозяина, которая описана выше, в условиях, в которых экспрессируется указанный промотор, и сбор мутеина человеческого IL-2 из указанной культуры.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения Fc-слитого белка, включающему культивирование клетки-хозяина, которая описана выше, в условиях, в которых экспрессируется указанный промотор, и сбор Fc-слитого белка из указанной культуры.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в популяции Т-клеток, включающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством мутеина человеческого IL-2, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в популяции Т-клеток, включающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством Fc-слитого белка, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества мутеина человеческого IL-2, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества Fc-слитого белка, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к естественным клеткам-киллерам (NK) в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества мутеина человеческого IL-2, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к естественным клеткам-киллерам (NK) в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества Fc-слитого белка, который описан выше. В одном варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56

и/или CD16, повышается. В другом варианте осуществления отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается на по меньшей мере 50%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества мутеина IL-2, который описан выше, или терапевтически эффективного количества Fc-слитого белка, который описан выше. В одном варианте осуществления введение вызывает уменьшение по меньшей мере одного симптома заболевания. В другом варианте осуществления отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта повышается после введения. В другом варианте осуществления отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта остается по сути на том же уровне после введения. В другом варианте осуществления воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом С, диабет I типа, диабет II типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, очаговую алопецию, атеросклероз, псориаз, отторжение трансплантата органа, синдром Шегрена, болезнь Бехчета, самопроизвольное прерывание беременности, атопические заболевания, астму или воспалительные заболевания кишечника.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 изображены результаты измерения Tm мутеинов IL-2 посредством DSC со стабильностью при 40°C в течение 10 дней, измеряемой посредством SEC-хроматографии.

На фиг. 2 изображены кривые подбора дозы для трех аттенуированных мутеинов, H16R, V91K D20A M104V, D20W и контролей, Fc человеческого IL-2 дикого типа, рекомбинантного человеческого IL-2 и рекомбинантного IL-2 мыши в анализе pSTAT5 in vitro.

На фиг. 3 изображена оценка мутеинов человеческого IL-2 V91K D20A M104V, H16R, D20W и контрольного IL-2-Fc дикого типа в отношении активности in vivo у мышей.

#### **Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления**

Используемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект настоящего изобретения. Все приведенные в тексте данного описания литературные источники включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования и трансформации тканей, очистки белков и т.д. можно применять стандартные методики. Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии с описаниями производителя или так, как это обычно делается в уровне техники, или как описано в данном документе. Следующие процедуры и методики обычно можно осуществлять в соответствии с обычными способами, хорошо известными из уровня техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые приводятся и рассматриваются в описании. См., например, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. Если не предусмотрены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, органической химии, медицинской и фармацевтической химии, описанными в данном документе, хорошо известна и обычно используется в уровне техники. Стандартные методики можно применять для химического синтеза, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

IL-2.

Мутеины IL-2, описанные в данном документе, представляют собой варианты человеческого IL-2 дикого типа. Используемый в данном документе термин "человеческого IL-2 дикого типа", "IL-2 WT" или "IL-2 дикого типа" обозначает полипептид, характеризующийся следующей аминокислотной последовательностью:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPKKATELKHLLQCLEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

где X представляет собой C, S, V или A (SEQ ID NO:2).

Варианты могут предусматривать одну или более замен, делеций или вставок в аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа. Остатки обозначаются в данном документе однобуквенным кодом аминокислоты, за которым следует положение аминокислоты IL-2, например, K35 представляет собой остаток лизина в положении 35 SEQ ID NO: 2. Замены обозначаются в данном документе однобуквенным аминокислотным кодом, за которым следует положение аминокислоты IL-2, за которым следует замещающий однобуквенный аминокислотный код, например K35A представляет собой замену остатка лизина в положении 35 в SEQ ID NO:2 остатком аланина.

Мутеины IL-2.

В данном документе предусмотрены мутеины человеческого IL-2 и антитела к IL-2, которые преимущественно стимулируют регуляторные Т-клетки (Treg). Используемый в данном документе термин "преимущественно стимулирует регуляторные Т-клетки" означает, что мутеин или антитело способству-

ет пролиферации, выживанию, активации и/или осуществлению функции CD3+FoxP3+ Т-клеток по сравнению с CD3+FoxP3- Т-клетками. Способы измерения способности преимущественно стимулировать Treg могут быть измерены посредством проточной цитометрии лейкоцитов периферической крови, в которой наблюдается повышение процентного содержания FOXP3+CD4+ Т-клеток среди всех CD4+ Т-клеток, повышение процентного содержания FOXP3+CD8+ Т-клеток среди всех CD8+ Т-клеток, повышение процентного содержания FOXP3+ Т-клеток по сравнению с NK-клетками и/или более высокое повышение уровня экспрессии CD25 на поверхности FOXP3+ Т-клеток по сравнению с повышением экспрессии CD25 на других Т-клетках. Предпочтительный рост клеток Treg также может быть обнаружен в виде повышенной представленности деметилированной ДНК промотора FOXP3 (т.е. Treg-специфической деметилированной области или TSDR) по сравнению с деметилированными генами CD3 в ДНК, выделенной из цельной крови, как обнаруживается посредством секвенирования при полимеразной цепной реакции (ПЦР) продуктов обработанной бисульфитом геномной ДНК (J. Sehouli, et al. 2011. *Epigenetics* 6:2, 236-246). В частности, мутеины IL-2 по настоящему изобретению характеризуются расширенным окном Treg:Teff, т.е. сохраняли высокий уровень активности в клетках Treg, при этом демонстрируя значительную аттенуацию в клетках Teff. Поскольку активированные клетки Teff экспрессируют повышенные уровни CD25, а пациенты с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями характеризуются повышенным содержанием этих клеток, авторы настоящего изобретения применяли CD25+гейтирование в отношении клеток Teff для имитирования более реалистичной дифференциации экспрессии CD25 у пациентов.

Мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки, которые преимущественно стимулируют клетки Treg, приводят к повышению отношения CD3+FoxP3+ Т-клеток к CD3+FoxP3- Т-клеткам у субъекта или в образце периферической крови на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 900% или по меньшей мере 1000%.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее 50% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 40% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 30% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 20% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 10% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки также характеризуются 10-дневной стабильностью, составляющей более 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% при использовании протокола из примера 2.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 50% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 40% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 30% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 20% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются менее чем 10% активации pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки также характеризуются 10-дневной стабильностью, составляющей более 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90%, при использовании протокола из примера 2.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 30% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 40% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 50% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 60% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления

мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 70% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки также характеризуются 10-дневной стабильностью, составляющей более 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90%, при использовании протокола из примера 2.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 30% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 40% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 50% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 60% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки характеризуются более чем 70% активации pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 200 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1. В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-2 или их Fc-слитые белки также характеризуются 10-дневной стабильностью, составляющей более 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90%, при использовании протокола из примера 2.

Примеры мутеинов IL-2 включают без ограничения мутеины IL-2, предусматривающие замену(ы) V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K, D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E, M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и/или V91S, H16E в аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2. Мутеины IL-2 по настоящему изобретению необязательно предусматривают замену C125A. Хотя может быть преимущественным снижение количества дополнительных мутаций в последовательности IL-2 дикого типа, в настоящем изобретении предусмотрены мутеины IL-2, также предусматривающие усечения и/или дополнительные вставки, делеции и/или замены в дополнение к замене V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K, D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E, M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и/или V91S, H16E, при условии, что указанные мутеины сохраняют активность, предпочтительно имитирующую Treg. Таким образом, в вариантах осуществления предусмотрены мутеины IL-2, которые преимущественно стимулируют клетки Treg и содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую замену V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K, D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E,

M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и/или V91S, H16E, и которые на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичны аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2. В особенно предпочтительных вариантах осуществления такие мутеины IL-2 содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2.

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют с применением стандартных методик, известных из уровня техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательности по Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательностей по Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, поиск по методу сходства по Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин, США), программу для последовательностей Best Fit, описанную в Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, предпочтительно с применением параметров по умолчанию, или посредством просмотра. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за введение гэпа 1; штраф за продолжение гэпа 0,33 и штраф за связывание 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером применимого алгоритма является PILEUP. С помощью PILEUP получают множественное выравнивание последовательностей на основании группы родственных последовательностей с применением последовательных попарных выравниваний. С его помощью также можно построить дерево, с помощью которого видны кластеризационные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение метода последовательного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; способ подобен тому, который описан в Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Применимые параметры PILEUP включают стандартный штраф за введение гэпа 3,00, стандартный штраф за удлинение гэпа 0,10 и оцениваемые концевые гэпы.

Другим примером применимого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Особенно применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была создана Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. В WU-BLAST-2 используют несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены значения по умолчанию. Регулируемые параметры устанавливаются со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)= II. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут регулироваться для повышения чувствительности.

Дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с введением гэпов, о котором сообщается в Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. В BLAST с введением гэпов используют показатели замены из BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двух хитов для запуска удлинений без введения гэпов задает удлинению гэпа k значение  $10+k$ ;  $X_u$  установлен на 16, и  $X_g$  установлен на 40 для стадии поиска в базе данных и 67 для завершающей стадии алгоритмов. Выравнивания с гэпами запускаются с помощью показателя, соответствующего приблизительно 22 битам.

Хотя участок для введения варианта аминокислотной последовательности может быть определен предварительно, собственно мутация не нуждается в предварительном определении. Например, чтобы оптимизировать характеристики мутации в данном сайте, можно провести случайный мутагенез в кодоне- или участке-мишени и провести скрининг экспрессированного мутеина IL-2 в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Хорошо известны методики осуществления мутаций с замещением в заранее заданных сайтах в ДНК с известной последовательностью, например, мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов можно проводить, например, с применением анализов, описанных в данном документе.

Аминокислотные замены обычно представляют собой одиночные остатки; вставки обычно будут составлять порядка от приблизительно одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя допускаются значительно более крупные вставки. Делеции варьируются от приблизительно одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях деле-



ции могут быть намного больше.

Замены, делеции, вставки или любая их комбинация могут быть использованы для получения конечного производного или варианта. Как правило, эти изменения осуществляются в отношении нескольких аминокислот для сведения к минимуму изменения молекулы, в частности, иммуногенности и специфичности антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах допустимы более крупные изменения. Консервативные замены обычно выполняют в соответствии со следующей схемой, представленной в табл. 1.

Таблица 1

Исходный остаток	Иллюстративные замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Существенные изменения в функции или иммунологической идентичности выполняют посредством выбора менее консервативных замен, чем показанные в табл. 1. Например, могут быть выполнены замены, которые более существенно влияют на: структуру полипептидного остова в области изменения, например, структуру альфа-спирали или бета-листа; заряд или гидрофобность молекулы на участке-мишени; или основную часть боковой цепи. Замены, которые в целом вызывают наибольшие изменения в свойствах полипептида, представляют собой те, в которых: (а) гидрофильный остаток, например серил или треонил, заменен на гидрофобный остаток, например лейцил, изолейцил, фенилаланил, валил или аланил (или заменен им); (b) цистеин или пролин заменен на любой другой остаток (или заменен им); (с) остаток, содержащий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, заменен на электроотрицательный остаток, например глутамил или аспартил (или заменен им); или (d) остаток, содержащий объемную боковую цепь, например фенилаланин, заменен на остаток, не содержащий боковой цепи, например глицин (или заменен им).

Варианты обычно характеризуются такой же качественной биологической активностью и будут вызывать такой же иммунный ответ, как и встречающийся в природе аналог, хотя варианты также отбирают для модификации характеристик мутеина IL-2 по мере необходимости. В качестве альтернативы вариант может быть сконструирован таким образом, что биологическая активность мутеина IL-2 изменена. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены, как обсуждается в данном документе.

Мутеины IL-2, характеризующиеся продленным периодом полужизни в сыворотке крови.

Поскольку мутеины IL-2, предусмотренные в данном документе, предпочтительно приводят к повышению количества Treg по сравнению, например, с клетками Teff или NK-клетками, ожидается, что профиль безопасности при введении пациенту будет отличаться от профиля безопасности IL-2 дикого типа или PROLEUKIN® (альдеслейкин; Novartis, Базель, Швейцария). Побочные эффекты, ассоциированные с IL-2 дикого типа или PROLEUKIN®, включают гриппоподобные симптомы, озноб/дрожь, артралгию, лихорадку, сыпь, зуд, реакции в месте инъекции, гипотензию, диарею, тошноту, тревожность, спутанность сознания и депрессию. Мутеины IL-2, предусмотренные в данном документе, могут быть изменены для включения или слияния с молекулами, которые продлевают период полужизни мутеина в сыворотке крови без повышения риска того, что такое продление периода полужизни приведет к повы-

шению вероятности или интенсивности побочного эффекта или нежелательного явления у пациента. Подкожное введение дозы такого мутеина с продленным периодом полужизни в сыворотке крови может обеспечить длительный охват мишени с более низким системным максимальным воздействием ( $C_{max}$ ). Продленный период полужизни в сыворотке крови может обеспечивать более низкий или менее частый режим введения дозы мутеина.

Период полужизни в сыворотке крови мутеинов IL-2, предусмотренных в данном документе, может быть продлен по сути любым способом, известным из уровня техники. Такие способы включают изменение последовательности мутеина IL-2 для включения пептида, который связывается с неонатальным Fc $\gamma$ -рецептором или связывается с белком, характеризующимся повышенным периодом полужизни в сыворотке крови, например IgG или человеческим сывороточным альбумином. В других вариантах осуществления мутеин IL-2 слит с полипептидом, который обеспечивает слитой молекуле продленный период полужизни. Такие полипептиды включают Fc IgG или другие полипептиды, которые связываются с неонатальным Fc $\gamma$ -рецептором, человеческим сывороточным альбумином или полипептидами, которые связываются с белком, характеризующимся продленным периодом полужизни в сыворотке крови. В предпочтительных вариантах осуществления мутеин IL-2 слит с молекулой Fc IgG.

Мутеин IL-2 может быть слит с N-концом или C-концом Fc-области IgG. Как показано в примерах, слияние с C-концом Fc-области IgG поддерживает активность мутеина IL-2 в большей степени, чем при слиянии с N-концом Fc IgG.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к димеру, содержащему два Fc-слитых полипептида, созданных путем слияния мутеина IL-2 с Fc-областью антитела. Димер можно получить, например, посредством вставки слитого гена, кодирующего слитый белок, в соответствующий вектор экспрессии, экспрессии слитого гена в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, и сборки экспрессируемого слитого белка во многом подобно молекулам антител, после чего между Fc-фрагментами образуются межцепочечные связи с образованием димера.

Термин "полипептид Fc" или "Fc-область", используемый в данном документе, включает нативные и мутеиновые формы полипептидов, полученных из Fc-области антитела, и может представлять собой часть либо слитых белков на основе мутеина IL-2, либо антител к IL-2 по настоящему изобретению. Также включены усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирный участок, который способствует димеризации. В определенных вариантах осуществления Fc-область содержит домен CH2 и CH3 антитела. Наряду с продленным периодом полужизни в сыворотке крови слитые белки, содержащие Fc-фрагменты (и олигомеры, образованные из них), характеризуются преимуществом легкой очистки посредством аффинной хроматографии по сравнению с колонками с белком A или белком G. Предпочтительные Fc-области получают из IgG человека, который включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В данном документе конкретные остатки в Fc идентифицируются по положению. Все положения Fc основаны на схеме нумерации согласно EU.

Одна из функций Fc-области антитела заключается в том, чтобы сообщать иммунной системе в случае, если антитело связывается со своей мишенью. Она считается "эффекторной функцией". Взаимодействие приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP опосредуются связыванием Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. CDC опосредуется посредством связывания Fc с белками системы комплемента, например C1q.

Подклассы IgG различаются по своей способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 намного превосходит IgG2 и IgG4 в опосредовании ADCC и CDC. Таким образом, в вариантах осуществления, в которых эффекторная функция является нежелательной, предпочтительным является Fc IgG2. Однако известно, что молекулы, содержащие Fc IgG2, являются более сложными в изготовлении и характеризуются менее привлекательными биофизическими свойствами, такими как более короткий период полужизни, по сравнению с молекулами, содержащими Fc IgG1.

Эффекторная функция антитела может быть повышена или снижена посредством введения одной или более мутаций в Fc. В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, содержащие Fc, сконструированный для усиления эффекторной функции (U.S. 7317091 и Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; оба включены в данный документ посредством ссылки во всей полноте). Иллюстративные молекулы Fc IgG1, характеризующиеся повышенной эффекторной функцией, включают молекулы со следующими заменами: S239D/I332E; S239D/A330S/I332E; S239D/A330L/I332E; S298A/D333A/K334A; P247I/A339D; P247I/A339Q; D280H/K290S; D280H/K290S/S298D; D280H/K290S/S298V; F243L/R292P/Y300L; F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; G236A/S239D/I332E; K326A/E333A; K326W/E333S; K290E/S298G/T299A; K290N/S298G/T299A; K290E/S298G/T299A/K326E и/или K290N/S298G/T299A/K326E.

Другой способ повышения эффекторной функции белков, содержащих Fc IgG, заключается в снижении фукозилации Fc. Удаление ядра фукозы из олигосахаридов типа биантенарных комплексов, присоединенных к Fc, привело к значительному повышению эффекторной функции в виде ADCC без

изменения связывания антигена или в виде эффекторной функции CDC. Известно несколько способов снижения или устранения фукозилирования молекул, содержащих Fc, например, антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в определенных клеточных линиях млекопитающих, в том числе линии клеток с нокаутом FUT8, вариантной линии CHO Lec13, линии клеток гибридомы крысы YB2/0, линии клеток, содержащих малую интерферирующую РНК, специфически направленную на ген FUT8, и линии клеток, коэкспрессирующих  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и  $\alpha$ -маннозидазу Гольджи II. В качестве альтернативы молекула, содержащая Fc, может экспрессироваться в клетке, отличной от клетки млекопитающего, например в растительной клетке, клетке дрожжей или прокариотической клетке, например *E. coli*.

В определенных вариантах осуществления молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 по настоящему изобретению содержат Fc, сконструированный для снижения эффекторной функции. Иллюстративные молекулы Fc, характеризующиеся сниженной эффекторной функцией, включают молекулы со следующими заменами: N297A или N297Q (IgG1); L234A/L235A (IgG1); V234A/G237A (IgG2); L235A/G237A/E318A (IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1); L234F/L235E/P331S (IgG1); и/или S267E/L328F (IgG1).

Известно, что IgG1 человека содержит сайт гликозилирования в N297 (система нумерации согласно EU), и гликозилирование способствует эффекторной функции антител на основе IgG1. Иллюстративная последовательность IgG1 представлена в SEQ ID NO:3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1            5                    10                    15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20                    25                    30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35                    40                    45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65                    70                    75                    80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 225

Группы мутировали в N297 при попытке получения агликозилированных антител. Мутации сосредотачивали на замене N297 аминокислотами, которые напоминают аспарагин по физико-химической природе, такими как глутамин (N297Q) или аланин (N297A), который имитирует аспарагины без полярных групп.

Используемый в данном документе термин "агликозилированное антитело" или "агликозилированный Fc" относится к статусу гликозилирования остатка в положении 297 Fc. Антитело или другая молекула могут характеризоваться гликозилированием в одном или более других положениях, но все равно могут считаться агликозилированным антителом или агликозилированным Fc-слитым белком.

При попытке создания эффекторно нефункционального Fc IgG1 было обнаружено, что мутация аминокислоты N297 IgG1 человека в глицин, т.е. N297G, обеспечивает гораздо более высокую эффективность очистки и биофизические свойства по сравнению с другими аминокислотными заменами этого остатка. См. пример 8. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержит Fc IgG1 человека, содержащий замену N297G. Fc, содержащий замену N297G, является применимым в любом контексте, в котором молекула содержит Fc IgG1 человека, и не ограничивается применением в контексте молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. В определенных вариантах осуществления антитело содержит Fc, содержащий замену N297G.

Fc, содержащий Fc IgG1 человека, содержащий мутацию N297G, может также предусматривать дополнительные вставки, делеции и замены. В определенных вариантах осуществления Fc IgG1 человека содержит замену N297G и идентичен на по меньшей мере 90%, идентичен на по меньшей мере 91%, идентичен на по меньшей мере 92%, идентичен на по меньшей мере 93%, идентичен на по меньшей мере 94%, идентичен на по меньшей мере 95%, идентичен на по меньшей мере 96%, идентичен на по меньшей мере 97%, идентичен на по меньшей мере 98% или идентичен на по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:3. В особенно предпочтительном варианте осуществления C-концевой остаток лизина заменен или удален. Аминокислотная последовательность IgG1 человека, предусматривающая замену N297G и делецию C-концевого лизина, изложена под SEQ ID NO:4.

Было показано, что агликозилированные молекулы, содержащие Fc IgG1, являются менее стабильными, чем гликозилированные молекулы, содержащие Fc IgG1. Fc-область может быть дополнительно сконструирована для повышения стабильности агликозилированной молекулы. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислот заменены на цистеин с образованием дисульфидных связей в димерном состоянии. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 аминокислотной последо-

вательности, изложенной под SEQ ID NO:3, могут быть заменены цистеином. В предпочтительных вариантах осуществления определенные пары остатков являются замещенными, так что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предупреждая скремблирование дисульфидных связей. Предпочтительные пары включают без ограничения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, а также V323C и I332C.

В данном документе предусмотрены Fc-содержащие молекулы, в которых один или более остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 заменены цистеином, примеры которых включают остатки, содержащие A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, или замены V323C и I332C.

Дополнительные мутации, которые могут быть внесены в Fc IgG1, включают мутации, облегчающие образование гетеродимера среди Fc-содержащих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована для создания "выступов" и "впадин", которые облегчают образование гетеродимера из двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при коэкспрессии в клетке. U.S. 7695963. В других вариантах осуществления Fc-область изменена для использования электростатического взаимодействия с целью стимулирования образования гетеродимера, в то же время препятствуя образованию гомодимера двух разных Fc-содержащих полипептидов при коэкспрессии в клетке. WO 09/089004, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Предпочтительные гетеродимерные Fc включают те, в которых одна цепь Fc содержит замены D399K и E356K, а другая цепь Fc содержит замены K409D и K392D. В других вариантах осуществления одна цепь Fc содержит замены D399K, E356K и E357K, а другая цепь Fc содержит замены K409D, K392D и K370D.

В определенных вариантах осуществления может быть предпочтительным, чтобы молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка была мономерной, т. е. содержала только одну молекулу мутеина IL-2. Аналогично может потребоваться би-, три- или тетраспецифическое антитело, которое может специфически связываться с одной или более дополнительными мишенями. В таких вариантах осуществления Fc-область слитого белка или антитела может содержать одну или более мутаций, которые облегчают образование гетеродимера. Слитый белок или антитело коэкспрессируются с Fc-областью, содержащей реципрокные мутации по сравнению с мутациями в молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого полипептида, но не содержащей мутеин IL-2 или переменного домена тяжелой цепи антитела к IL-2. При образовании гетеродимера двух Fc-содержащих полипептидов, полученный белок содержит только один мутеин IL-2 или домен, связывающий антитело к IL-2.

Другой способ создания мономерной молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка заключается в слиянии мутеина IL-2 с мономерным Fc, т.е. Fc-областью, которая не димеризуется. Стабильные мономерные Fc содержат мутации, которые предупреждают димеризацию и стабилизируют молекулу в мономерной форме. Предпочтительные мономерные Fc раскрыты в WO 2011/063348, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей полноте. В определенных вариантах осуществления молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержат Fc, содержащий отрицательно заряженные аминокислоты в положениях 392 и 409, наряду с заменой треонина в Y349, L351, L368, V397, L398, F405 или Y407.

В определенных вариантах осуществления молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержит линкер между Fc и мутеином IL-2. Из уровня техники известно множество различных линкерных полипептидов, которые можно применять в контексте молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. В предпочтительных вариантах осуществления молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка содержит одну или более копий пептида, состоящего из GGGGS (SEQ ID NO:5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) между Fc и мутеином IL-2. В некоторых вариантах осуществления полипептидная область между Fc-областью и областью мутеина IL-2 содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7). Как показано в данном документе, линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) гликозилируются при экспрессии в соответствующих клетках, и такое гликозилирование может способствовать стабилизации белка в растворе и/или при введении *in vivo*. Таким образом, в определенных вариантах осуществления слитый белок на основе мутеина IL-2 содержит гликозилированный линкер между Fc-областью и областью мутеина IL-2.

Предполагается, что гликозилированный линкер может быть применим, когда его помещают в контекст полипептида. В данном документе предусмотрены полипептиды, содержащие GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) вставлены в аминокислотную последовательность полипептида или заменены одной или более аминокислотами в аминокислотной последовательности полипептида. В предпочтительных вариантах осуществления GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) вставлены в петлю третичной структуры полипептида. В других вариантах осуществления одна или более аминокислот в петле заменены на GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

C-концевой участок Fc и/или аминоконцевой участок мутеина IL-2 может содержать одну или более мутаций, которые приводят к изменению профиля гликозилирования молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка при экспрессии в клетках млекопитающих. В определенных вариантах осуществления мутеин IL-2 дополнительно содержит замену T3, например T3N или T3A. Мутеин IL-2 может дополнительно содержать замену S5, такую как S5T.

Ковалентные модификации мутеина IL-2 и молекул на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка и

антител к IL-2 включены в объем настоящего изобретения и, как правило, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций вводят в молекулу путем проведения реакции между определенными аминокислотными остатками и органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с определенными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Цистеинильные остатки чаще всего реагируют с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с образованием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватируются за счет реакции с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртуть-бензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки дериватируются за счет реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку это средство является относительно специфическим для гистидильной боковой цепи. Также применим пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилата натрия при pH 6,0.

Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация этими средствами имеет эффект изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколиминидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфокислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или более традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина требуется, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого  $pK_a$  функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также эpsilon-аминогруппой аргинина.

Можно проводить специфическую модификацию тирозильных остатков, при этом особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют N-ацетилимидизол и тетранитрометан соответственно. Тирозильные остатки иодируют с применением  $^{125}I$  или  $^{131}I$ , чтобы получить меченые белки для использования в радиоиммуноанализе, при этом подходит описанный выше способ с хлорамином T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ( $R^1-N=C=N-R^2$ ), где R и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания антигенсвязывающих белков с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью для применения в различных способах. Обычно используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, сложные гомобифункциональные имидоэфиры, в том числе сложные дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитио-бис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, дают фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные сшивки в присутствии света. В качестве альтернативы для иммобилизации белков применяют реакционноспособные водонерастворимые матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно. В качестве альтернативы эти остатки дезамидируют в умеренно кислотных условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2, включенных в объем настоящего изобретения, предусматривает изменение паттерна гликозилирования белка. Как известно из уровня техники, паттерны гликозилирования могут

зависеть как от последовательности белка (например, от присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, связанных с гликозилированием, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма-хозяина, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также может применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление сайтов гликозилирования к мутеину IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антителу к IL-2 можно удобно осуществлять посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять добавлением одного или более сериновых или треониновых остатков в исходную последовательность или заменой на них (в случае сайтов O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, посредством мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях таким образом, что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

Другим средством повышения количества углеводных фрагментов в мутеине IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Эти процедуры являются предпочтительными по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для обеспечения N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида связывания сахар(сахара) может(могут) быть присоединен(ы) к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, как, например, к группам цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, как, например, к группам серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, как, например, к остаткам фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном мутеине IL-2, молекуле на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения, представляющего собой трифторметансульфоновую кислоту, или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Nakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативного отщепления углеводных фрагментов на полипептидах можно достичь посредством применения целого ряда эндо- и экзо-гликозидаз, которые описаны в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем применения соединения туникамицина, которое описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование N-гликозидных связей с белком.

Другой тип ковалентной модификации мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 предусматривает связывание белка с различными небелковыми полимерами, включая без ограничения различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксипропилены, как указано в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, аминокислотные замены могут быть выполнены в различных положениях мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2 для облегчения добавления полимеров, таких как PEG. Таким образом, в вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены пегелированный мутеин IL-2, молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2. Такие пегелированные белки могут характеризоваться повышенным периодом полужизни и/или сниженной иммуногенностью по сравнению с их непегелированными формами.

Полинуклеотиды, кодирующие мутеины IL-2 и молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка.

В объем настоящего изобретения входят нуклеиновые кислоты, кодирующие мутеины IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2. В аспектах настоящего изобретения предусмотрены варианты полинуклеотидов (например, вследствие вырождения), которые кодируют аминокислотные последовательности, описанные в данном документе.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие аминокислотным последовательностям, описанным в данном документе, для применения в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве поисковых последовательностей для поиска в базе данных, могут быть получены посредством "обратной трансляции" из аминокислотных последовательностей. Хорошо известную процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей мутеины IL-2 и молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. Олигонуклеотиды, которые определяют требуемые концы комбинации фрагментов ДНК, используются в качестве 5'- и 3'-праймеров. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз для облегчения вставки амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в вектор экспрессии. Методики ПЦР описаны в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. Термин "выделенная нуклеиновая кислота", представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого нуклеиновая кислота была выделена, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативно с матрицы или химически, таких как ПЦР-продукты, молекулы cDNA или, например, олигонуклеотиды, понятно, что нуклеиновые кислоты, образующиеся в результате таких процессов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции на основе нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновые кислоты практически свободны от загрязняющего эндогенного материала. Молекулу нуклеиновой кислоты предпочтительно получают из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз, в практически чистой форме и в количестве или концентрации, позволяющих идентифицировать, манипулировать и восстанавливать составляющие ее нуклеотидные последовательности с помощью стандартных биохимических способов (таких как способы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно предусмотрены и/или сконструированы в виде открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут быть представлены 5'- или 3'-концами открытой рамки считывания, где то же самое не мешает манипуляции или экспрессии кодирующей области.

Мутеины IL-2 в соответствии с настоящим изобретением обычно получают посредством сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей мутеин IL-2 или молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, с применением касетного или ПЦР-мутагенеза или других методик, широко известных из уровня техники, для получения ДНК, кодирующей вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в культуре клеток, как описано в данном документе. Однако мутеины IL-2 и молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка могут быть получены посредством синтеза *in vitro* с применением общепринятых методик. Варианты обычно демонстрируют ту же качественную биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, например экспансию Treg, хотя также могут быть выбраны варианты, которые характеризуются модифицированными характеристиками, как будет более подробно описано ниже.

Как будет понятно специалистам в данной области, вследствие вырожденности генетического кода каждый мутеин IL-2, молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка и антитело к IL-2 по настоящему изобретению кодируются крайне большим количеством нуклеиновых кислот, каждая из которых входит в объем настоящего изобретения и может быть получена с применением стандартных методик. Таким образом, идентифицировав конкретную аминокислотную последовательность, специалисты в данной области могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот с помощью простой модификации последовательности одного или более кодонов таким путем, который не приводит к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка.

Настоящее изобретение также относится к системам и конструкциям экспрессии в форме плазмид, векторов экспрессии, транскрипционных или экспрессионных касет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как указано выше. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим такие системы или конструкции экспрессии.

Как правило, векторы экспрессии, применяемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазмид, а также для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления такие последовательности, совокупно называемые "фланкирующими последовательностями", как правило, будут включать одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную ин-



тронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей подлежащий экспрессии полипептид, и элемент селективируемого маркера. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Необязательно вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т.е. олигонуклеотидную молекулу, расположенную на 5'- или 3'-конце кодирующей последовательности мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2; олигонуклеотидная последовательность кодирует polyHis (такую как hexaHis (SEQ ID NO: 21)) или другую "метку", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, к которым существуют коммерчески доступные антитела. Как правило, эта метка слита с полипептидом при экспрессии полипептида, и она может служить в качестве средства для его аффинной очистки или выявления из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, посредством колоночной хроматографии с применением антител к метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно, впоследствии метка может быть удалена с применением различных способов, таких как применение определенных пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. из того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. из вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (т.е. комбинацией фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована посредством механизма клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах по настоящему изобретению, можно получать любым из нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Как правило, применяемые в данном документе фланкирующие последовательности будут предварительно идентифицированы с помощью картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и, следовательно, могут быть выделены из соответствующего источника, представляющего собой ткань, с применением подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В таком случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с применением способов, описанных в данном документе, которые служат для синтеза и клонирования нуклеиновых кислот.

Вне зависимости от того, известна ли вся или только часть фланкирующей последовательности, ее можно получить с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с помощью подходящего зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности от того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, то фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, можно выделить из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность и даже другой ген или гены. Выделение может быть выполнено посредством расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с применением очистки на агарозном геле, хроматографии на колонке Qiagen® (Чатсворт, штат Калифорния, США) или других способов, известных специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели будет очевиден для рядового специалиста в данной области.

Как правило, точка начала репликации представляет собой часть тех векторов экспрессии для прокариотических клеток, которые приобретаются в коммерческих источниках, и такая точка начала помогает амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайт точки начала репликации, то его можно химически синтезировать на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, штат Массачусетс, США) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, и различные источники вирусного происхождения (например, SV40, вирус полиомы, аденовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусы, такие как HPV или BPV) подходят для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент точки начала репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (например, точка начала репликации SV40 часто используется только потому, что она также содержит промотор ранних генов вируса).

Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в 3'-направлении относительно конца кодирующей полипептид области и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой фрагмент с высоким содержанием G-C, за которым следует последовательность поли-Т. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести в коммерческих источниках в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением способов синтеза нуклеиновых кислот, описываемых в данном документе.

Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой в селективной среде для культивирования. Типичные гены маркеров отбора кодируют

белки, которые: (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину, в случае прокариотических клеток-хозяев; (b) восполняют ауксотрофные недостатки у клетки; или (с) обеспечивают необходимые питательные вещества, недоступные из комплексной или определенной среды. Специфические селективируемые маркеры представляют собой ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев можно также с успехом применять ген устойчивости к неомицину.

Для амплификации гена, который будет экспрессироваться, можно применять другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, которые требуются для продуцирования белка, крайне важного для роста или выживания клеток, многократно повторяются в tandem в хромосомах последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и гены тимидинкиназы, не содержащие промоторов. Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия давления отбора, где только лишь трансформанты адаптированы к выживанию вследствие присутствия в векторе гена селективируемого маркера. Давление отбора устанавливают посредством культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация средства для отбора в среде последовательно увеличивается, приводя тем самым к амплификации как селективируемого гена, и следовательно, так и гена, который кодирует требуемый полипептид, такой как мутеин IL-2, молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или тяжелая и/или легкая цепь антитела к IL-2. В результате с амплифицированной ДНК синтезируются повышенные количества полипептида.

Сайт связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции mRNA, и для него характерно наличие последовательности Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательности Козак (эукариоты). Как правило, этот элемент расположен в направлении 3'-конца относительно промотора и в направлении 5'-конца относительно кодирующей последовательности полипептида, подлежащего экспрессии. В определенных вариантах осуществления одна или более кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES), что позволяет осуществлять трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, если в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, можно манипулировать с различными пре- или пропоследовательностями для улучшения гликозилирования или выхода. Например, можно изменять сайт расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавлять пропоследовательности, которые также могут воздействовать на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или более дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или более аминокислотных остатков, находящихся в сайте расщепления пептидазой, присоединенных к аминоконцу. В качестве альтернативы, применение некоторых сайтов расщепления ферментами может приводить к получению слегка усеченной формы требуемого полипептида, если фермент осуществляет разрезание в такой области в пределах зрелого полипептида.

Векторы экспрессии и клонирующие векторы по настоящему изобретению обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей мутеин IL-2, молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или тяжелую и/или легкую цепь антитела к IL-2. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т.е. в 5'-направлении) стартового кодона структурного гена (как правило, в пределах приблизительно 100-1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы подразделяют на два класса: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы запускают повышенные уровни транскрипции с ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторое изменение в условиях культивирования, как, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы приводят к постоянной транскрипции гена, с которым они функционально связаны, т.е. они осуществляют незначительную регуляцию экспрессии гена или такая регуляция отсутствует. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами.

Также из уровня техники хорошо известны промоторы, подходящие для применения с дрожжевыми клетками-хозяевами. Дрожжевые энхансеры предпочтительно применяют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы генов, кодирующих белки теплового шока, и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без ограничения: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-концевом длинном повторе ви-

руса саркомы Paуca (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промоторные и регуляторные последовательности из гена металлотионина, Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42), и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) или промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Также представляют интерес следующие области транскрипционного контроля животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, активная в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротейна, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, активная в олигодендроцитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи-2 миозина, активная в скелетных мышцах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, активная в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Энхансерную последовательность можно вставлять в вектор для повышения транскрипции ДНК у высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК длиной обычно приблизительно 10-300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Энхансеры являются относительно независимыми от ориентации и положения, они были обнаружены в положениях в направлении как 5'-конца, так и 3'-конца относительно транскрипционной единицы. Известны некоторые энхансерные последовательности, полученные из генов млекопитающих (например, генов глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Как правило, обычно применяют энхансер из вируса. Известные из уровня техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы и энхансеры аденовируса представляют собой иллюстративные энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может находиться в векторе как в направлении 5'-, так и 3'-конца относительно кодирующей последовательности, как правило, он расположен в 5'-сайте относительно промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в вектор экспрессии для стимуляции внеклеточной секреции мутеина IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или тяжелой и/или легкой цепи антитела к IL-2. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых должно продуцироваться белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, включают следующие: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846. В одном варианте осуществления молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка по настоящему изобретению содержат лидерную последовательность, как изображено на фиг. 24.

Вектор может содержать один или более элементов, облегчающих экспрессию, когда вектор интегрирован в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) и область прикрепления к матрице (MAR). MAR опосредуют структурную организацию хроматина и могут изолировать интегрированный вектор от эффекта "положения". Таким образом, MAR особенно применимы, когда вектор используется для создания стабильных трансфектантов. Из уровня техники известен ряд природных и синтетических нуклеиновых кислот, содержащих MAR, например патенты США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать все требуемые фланкирующие последовательности или не содержать их. Если одна или более из фланкирующих последовательностей, описанных в данном документе, еще не присутствует в векторе, то их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих после-

довательностей, хорошо известны специалисту в данной области.

После того, как вектор был сконструирован, и в надлежащий сайт вектора была вставлена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутеин IL-2, молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, или тяжелую и/или легкую цепь антитела к IL-2, полный вектор может быть встроен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектором экспрессии выбранной клетки-хозяина можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ отчасти будет зависеть от применяемого типа клетки-хозяина. Данные способы и другие подходящие способы широко известны специалисту в данной области и изложены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

При культивировании в соответствующих условиях клетка-хозяин синтезирует мутеин IL-2, молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, или тяжелую и/или легкую цепь антитела к IL-2, которые впоследствии могут быть собраны из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые требуются или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость фолдинга в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), и любые клеточные линии, используемые в системе экспрессии, известной из уровня техники, могут быть использованы для получения рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению. Как правило, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным вектором экспрессии, который содержит ДНК, кодирующую требуемый мутеин IL-2, молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитело к IL-2. Среди клеток-хозяев, которые могут быть использованы, находятся прокариоты, дрожжи или клетки высших эукариот. Прокариоты включают граммотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. К клеткам высших эукариот относятся клетки насекомых и хорошо известные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию COS-7 клеток почки обезьян (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клетки HeLa, клеточные линии ВНК (ATCC CRL 10) и клеточную линию CV1/EBNA, полученную из клеточной линии почки африканской зеленой марьяшки CV1 (ATCC CCL 70), как описано McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки человека A431, клетки человека Colo205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культуры первичной ткани *in vitro*, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Необязательно клеточные линии млекопитающих, такие как HepG2/3B, KB, NIH 3T3 или S49, например, могут быть использованы для экспрессии полипептида, когда желательнее использовать полипептид в различных анализах трансдукции сигнала или репортерных анализах.

В качестве альтернативы полипептид можно получить в низших эукариотах, таких как дрожжи, или в прокариотах, таких как бактерии. Подходящие дрожжи включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluveromyces*, *Candida* или любой штамм дрожжей, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой бактериальный штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Если полипептид получают в дрожжах или бактериях, может быть желательнее модифицировать продуцируемый ими полипептид, например, посредством фосфорилирования или гликозилирования соответствующих сайтов с получением функционального полипептида. Такие ковалентные присоединения могут быть выполнены с применением известных химических или ферментативных способов.

Полипептид также может быть получен посредством функционального связывания выделенной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с подходящими контрольными последовательностями в одном или более векторах экспрессии насекомых и с применением системы экспрессии насекомых. Материалы и способы для систем экспрессии бакуловируса/клетка насекомого коммерчески доступны в форме набора, например, от Invitrogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США (набор MaxVac®), и такие способы хорошо известны из уровня техники, как описано в Summers and Smith, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Бесплодные системы трансляции также можно применять для получения полипептидов с использованием РНК, полученных из конструкций нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми клет-

ками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную с по меньшей мере одной последовательностью для регуляции экспрессии, представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяина".

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую мутеин человеческого IL-2, который предпочтительно стимулирует регуляторные Т-клетки и предусматривает замену V91K, D20L; D84R, E61Q; V91K, D20A, E61Q, M104T; N88K, M104L; V91H, M104L; V91K, H16E, M104V; V91K, H16R, M104V; V91K, H16R, M104T; V91K, D20A, M104T; V91K, H16E, M104T; V91K, H16E, E61Q, M104T; V91K, H16R, E61Q, M104T; V91K, H16E; V91H, D20A, M104T; H16E, V91H, M104V; V91H, D20A, E61Q, M104T; V91H, H16R, E16Q; V91K, D20A, M104V; H16E, V91H; V91H, D20A, M104V; H16E, V91H, M104T; H16E, V91H, E61Q, M104T; V91K, E61Q, H16E; V91K, H16R, M104L; H16E, V91H, E16Q; V91K, E61Q, H16R; D20W, V91K, E61Q; V91H, H16R; V91K, H16R; D20W, V91K, E61Q, M104T; V91K, D20A; V91H, D20A, E16Q; V91K, D20A, M104L; V91H, D20A; V91K, E61Q, D20A; V91H, M104T; V91H, M104V; V91K, E61Q; V91K, N88K, E61Q, M104T; V91K, N88K, E61Q; V91H, E61Q; V91K, N88K; D20A, H16E, M104T; D20A, M104T; H16E, N88K; D20A, M104V; D20A, M104L; H16E, M104T; H16E, M104V; N88K, M104V; N88K, E61Q; D20A, E61Q; H16R, D20A; D20W, E61Q; H16E, E61Q; H16E, M104L; N88K, M104T; D20A, H16E; D20A, H16E, E16Q; D20A, H16R, E16Q; V91K, D20W; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S; и/или V91S, H16E и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1.

Также включены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из иллюстративных молекул на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, описанных в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2 кодируются в одной открытой рамке считывания, необязательно с линкером, кодируемым между Fc-областью и мутеином IL-2.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие указанный выше мутеин IL-2 или молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, функционально связанные с промотором.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные выше мутеины IL-2, молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка или антитела к IL-2. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*, или может представлять собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO).

В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы получения мутеина человеческого IL-2. Способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется промотор, функционально связанный с мутеином человеческого IL-2. Затем из указанной культуры собирают мутеин человеческого IL-2. Мутеин IL-2 может быть получен из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы получения молекулы на основе мутеина человеческого IL-2 и Fc-слитого белка. Способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется промотор, функционально связанный с молекулой на основе мутеина человеческого IL-2 и Fc-слитого белка. Затем из указанной культуры собирают молекулу на основе мутеина человеческого IL-2 и Fc-слитого белка. Молекула на основе мутеина человеческого IL-2 и Fc-слитого белка может быть получена из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы получения антитела к IL-2. Способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируются промоторы, функционально связанные с тяжелой и легкой цепями антитела к IL-2. Затем из указанной культуры собирают антитело к IL-2. Антитело к IL-2 может быть получено из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

**Фармацевтические композиции.**

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество мутеина IL-2 или антитела к IL-2 вместе с фармацевтически эффективными разбавителями, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. В определенных вариантах осуществления мутеин IL-2 находится в контексте молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Предпочтительно материалы для составления являются нетоксичными для реципиентов при ис-

пользуемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы, содержащей мутеин IL-2, например молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модифицирования, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (как например, натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенолиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты; см., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В определенных вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и требуемой дозы. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления основные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящими средой-носителем или носителем могут быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными иллюстративными средами-носителями. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 могут быть подготовлены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, характеризующейся требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной массы или водного раствора. Дополнительно, в определенных вариантах осуществления продукт на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 может быть составлен в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы могут быть выбраны композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для участка введения. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, используют буферы.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут предусматриваться в виде апиrogenного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемую композицию на основе мутеина IL-2 или антите-

ла к IL-2 в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой композицию на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 составляют в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъеклируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия увеличению времени пребывания в системном кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть использованы для введения композиции на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2.

Специалистам в данной области будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, в том числе составы, включающие композиции на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2, в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области известны методики составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации заявок на европейские патенты №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. В случае если композицию лиофилизируют, то стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

В аспектах настоящего изобретения предусмотрены составы на основе самобуферизирующегося мутеина IL-2 или антитела к IL-2, которые можно использовать в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах осуществления предусмотрены композиции на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2, в частности, фармацевтические молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, которые включают в дополнение к композиции на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2, один или более вспомогательных веществ, таких как те, которые иллюстративно описаны в этом разделе и в других разделах данного документа. При этом вспомогательные вещества могут применяться в настоящем изобретении для самых разнообразных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, как, например, регулирование вязкости, и/или способов по настоящему изобретению для повышения эффективности, и/или стабилизации таких составов и способов во избежание деградации и ухудшения качества, например, вследствие стрессовых воздействий, возникающих во время производства, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него.

Доступные различные объяснения, касающиеся стабилизации белка, а также материалов для составления и способов, применимых в этом отношении, как, например, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", в *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, особенно в частях, относящихся к вспомогательным веществам и связанным с ними способам, для составов на основе самобуферизирующегося бел-

ка в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для применения на животных и/или людях.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения можно использовать соли, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Хорошо известно, что ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, путем связывания денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, за счет этого, предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка.

Разновидности ионов существенно отличаются по своим влияниям на белки. Был разработан ряд категориальных рангов ионов и их влияния на белки, которые можно применять при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Один пример представляет собой ряд Гофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряде Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения в качестве объемобразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден при лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств таблетки. Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин пригоден в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и, для обсуждаемых в данном документе целей, полиэтиленгликоль (PEG) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой применимые стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физической и химической деградации. Полиолы также пригодны для регулирования тоничности составов.

В число полиолов, применимых в выбранных вариантах осуществления настоящего изобретения, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности массы в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность массы. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, обусловленных замораживанием-оттаиванием, во время транспортировки или при получении нерасфасованного продукта в способе производства. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для применения в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные молекулы, такие как сахароза, которая гидролизуется до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG применим для стабилизации белков и в качестве крипротектора, и в этом отношении может применяться в настоящем изобретении.

В вариантах осуществления составов на основе мутеина IL-2 и/или антитела к IL-2 дополнительно предусмотрены поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются при физическом перемешивании, например, возникающем при транспортировке и манипуляциях с продуктом.

Для предотвращения, сведения к минимуму или уменьшения адсорбции на поверхности традиционно применяются поверхностно-активные вещества. Применимые в этом отношении поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и сорбитанполиэтоксилатов и полоксамер 188.



Поверхностно-активные вещества также обычно используются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество, как правило, стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты подвержены окислительной деградации и зачастую при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять осторожно, и при их применении их следует использовать в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует использовать в их наименьших эффективных концентрациях.

В вариантах осуществления составов на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 дополнительно предусмотрены один или более антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предупреждения окислительной деградации белков. К числу применимых в данном отношении антиоксидантов относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в составах на основе терапевтического белка в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. В данном отношении EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстанавливающие средства, в частности, такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении, среди прочего, выбраны для устранения или достаточной степени уменьшения возможности повреждения белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и которые необходимы для образования координационных комплексов в белках, как, например, цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут использоваться для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы  $\text{Ca}^{+2}$  (не более 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$  могут дестабилизировать ghDNase. Аналогичным образом,  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может дестабилизироваться за счет ионов  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$ , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов  $\text{Al}^{+3}$ .

В вариантах осуществления составов на основе мутеина IL-2 или антитела к IL-2 дополнительно предусмотрены один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного отбора из того же контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности или срока применения лекарственного продукта. Широко применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты давно применяются с низкомолекулярными препаратами для парентерального введения, разработка составов на основе белков, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты практически всегда оказывают дестабилизирующее действие (способствуют агрегации) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозовых составах на основе белков. На сегодняшний день большинство лекарственных средств на основе белка были составлены только для однократного применения. Однако, если возможно получать многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и улучшении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многоразовых шприцев-ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде шприцев-ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный--двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол.

В одном варианте осуществления мутеин IL-2 или молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, такие как, например, любой из мутеинов IL-2 или Fc-слитого белка мутеина IL-2, описанных в данном документе, составлен в 10 мМ KPi, 161 мМ L-аргинина, pH 7,6.

При составлении и разработке составов с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены мутеины IL-2 или Fc-слитые белки мутеинов IL-2 в лиофилизированных составах. Высушенные сублимацией продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать разбавителем, содержащим консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При использовании жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (приблизительно 18-24 месяца). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Составы на основе IL-2, как правило, будут конструировать для конкретных путей и способов введения, для конкретных вводимых доз и частоты введения, для конкретных средств лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме, помимо прочего. Таким образом, составы могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая без ограничения пероральный, ушной, глазной, ректальный, и вагинальный, и парентеральный пути, включая внутривенную и внутриартериальную инъекции, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После того как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. Настоящее изобретение также предусматривает наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. Каждый набор по настоящему изобретению может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество подлежащей применению фармацевтической композиции, содержащей мутеин IL-2, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области будет принимать во внимание, что соответствующие уровни доз для лечения, отчасти, будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания, для которого применяют мутеин IL-2 или антитело к IL-2, пути введения и размера (массы тела, площади поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления клиницист может подбирать дозу и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг или больше в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных вариантах осуществления доза может находиться в диапазоне от 0,5 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг, оптимально от 2,5 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество мутеина IL-2 или антитела к IL-2 по настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или предупреждению нарушений или недееспособности вследствие поражения заболеванием.

Фармацевтические композиции можно вводить с применением устройства медицинского назначения. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая способы лечения аутоиммунных или воспалительных нарушений.

В определенных вариантах осуществления мутеин IL-2 или антитело к IL-2 по настоящему изобретению применяют для лечения аутоиммунного или воспалительного нарушения. В предпочтительных вариантах осуществления применяют молекул на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка.

Нарушения, которые особенно поддаются лечению мутеином IL-2 или антителом к IL-2, раскрыты в данном документе, включают без ограничения, воспаление, аутоиммунное заболевание, атопическое заболевание, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, олигоарткулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиарткулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилозирующий спондилоартрит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (серонегативность, энтеропатия, артропатия), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориазический артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, олигоарткулярный ревматоидный артрит, полиарткулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилоартрит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (серонегативность, энтеропатия, артропатия), дерматомиозит, псо-

риатический артрит, склеродермию, васкулит, миолит, полимиолит, дерматомиолит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (SLE), тяжелую миастению, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, глютеиновою болезнь, рассеянный склероз (MS), астму, COPD, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, GVHD, отторжение трансплантата, поражение почек, васкулит, индуцированный гепатитом C, самопроизвольное прерывание беременности и т.п.

В предпочтительных вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное нарушение представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом C, диабет I типа, рассеянный склероз, самопроизвольное прерывание беременности, атопические заболевания и воспалительные заболевания кишечника.

В другом варианте осуществления пациент, у которого имеется аутоиммунное или воспалительное нарушение, или у которого имеется риск его развития, получает лечение мутеином IL-2 или антителом к IL-2 (например, мутеином IL-2, раскрытым в данном документе, таким как молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, раскрытая в данном документе, или другим мутеином IL-2, известный из уровня техники, или IL-2 дикого типа, необязательно в виде части Fc-слитой молекулы типа, описанного в данном документе), и отслеживают ответ пациента на лечение. Отслеживаемой реакцией пациента может быть любой обнаружимый или измеримый ответ пациента на лечение или любая комбинация таких ответов. Например, реакция может представлять собой изменение физиологического состояния пациента, такое как температура тела или лихорадка, аппетит, потливость, головная боль, тошнота, усталость, чувство голода, жажда, ясность ума и т.п. В качестве альтернативы ответ может представлять собой изменение количества типа клеток или продукта гена (например, белка, пептида или нуклеиновой кислоты), например, в образце периферической крови, взятом у пациента. В одном варианте осуществления схема лечения пациента изменяется, если у пациента наблюдается обнаружимый или измеримый ответ на лечение или если такой ответ превышает определенный порог. Изменение может заключаться в снижении или повышении частоты введения дозы, или снижении или повышении количества мутеина IL-2 или антитела к IL-2, вводимого на дозу, или "перерыве" от введения дозы (т.е. временном прекращении лечения либо на определенный период времени, либо до тех пор, пока лечащий врач не решит, что лечение следует продолжать, или пока контролируемый ответ пациента не укажет, что лечение следует или можно возобновить), или прекращении лечения. В одном варианте осуществления ответ представляет собой изменение температуры пациента или уровней CRP. Например, ответ может представлять собой повышение температуры тела пациента или повышение уровня CRP в образце периферической крови, или и то, и другое. В одном конкретном варианте осуществления лечение пациента сокращается, приостанавливается или прекращается, если температура тела пациента повышается во время курса лечения на по меньшей мере 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2°, или 2,5°C. В другом конкретном варианте осуществления лечение пациента сокращают, приостанавливают или прекращают, если концентрация CRP в образце периферической крови пациента повышается в ходе курса лечения на по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5, или 2 мг/мл. Другие реакции пациента, которые можно отслеживать и использовать при принятии решения об изменении, уменьшении, приостановке или прекращении лечения, включают развитие или ухудшение состояния синдрома повышенной проницаемости капилляров (гипотонию и сердечно-сосудистую нестабильность), нарушение функции нейтрофилов (например, приводящее к обнаружимому развитию или обострению инфекции или представляющее собой их), тромбоцитопению, тромботическую ангиопатию, реакции в месте инъекции, васкулит (например, васкулит, индуцированный вирусом гепатита C) или воспалительные симптомы или заболевания. Дополнительные реакции пациента, которые можно отслеживать и использовать при принятии решения об изменении, уменьшении, увеличении, приостановке или прекращении лечения, включают повышение количества NK-клеток, клеток Treg, FOXP3<sup>-</sup> CD4 T-клеток, FOXP3<sup>+</sup> CD4 T-клеток, FOXP3<sup>-</sup> CD8 T-клеток или эозинофилов. Повышение этих типов клеток может быть обнаружено, например, в виде повышения количества таких клеток в единице периферической крови (например, выраженное в виде повышения количества клеток в миллилитре крови) или в виде повышения процентного содержания такого типа клеток по сравнению с другим типом клеток или клеток в образце крови. Другой реакцией пациента, которую можно отслеживать, является повышение количества мутеина IL-2, связанного с клеточной поверхностью, или антитела к IL-2 на CD25<sup>+</sup> клетках в образце периферической крови пациента.

Способы экспансии клеток Treg.

Мутеин IL-2, антитело к IL-2 или молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка можно использовать для экспансии клеток Treg в организме или образце субъекта. В данном документе рассмотрены способы повышения отношения Treg к нерегуляторным T-клеткам. Способ включает приведение популяции T-клеток в контакт с эффективным количеством мутеина человеческого IL-2, антитела к

IL-2 или молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка. Отношение может быть измерено путем определения отношения CD3+FOXP3+ клеток к CD3+FOXP3- клеткам в популяции Т-клеток. Типичная частота Treg в крови человека составляет 5-10% от общего количества CD4+CD3+ Т-клеток, однако при заболеваниях, перечисленных выше, это процентное содержание может быть ниже или выше. В предпочтительных вариантах осуществления процентное содержание Treg повышается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 900% или по меньшей мере 1000%. Максимальная кратность повышения Treg может варьироваться в зависимости от конкретных заболеваний; однако максимальная частота Treg, которая может быть получена при лечении мутеином IL-2, составляет 50% или 60% от общего числа CD4+CD3+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят мутеин IL-2, антитело к IL-2 или молекулу на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка, и отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта повышается.

Поскольку мутеин IL-2, антитело к IL-2 и молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка предпочтительно приводят к экспансии Treg по сравнению с другими типами клеток, они также применимы для повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к естественным клетка-киллерам (NK) в периферической крови субъекта. Отношение может быть измерено путем определения отношения CD3+FOXP3+ клеток к CD16+ и/или CD56+ лимфоцитам, которые являются CD19- и CD3-.

Предполагается, что мутеин IL-2, антитело к IL-2 или молекула на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка могут оказывать терапевтический эффект на заболевание или нарушение у пациента без значительного повышения отношения Treg к нерегуляторным Т-клеткам или NK-клеткам в периферической крови пациента. Терапевтический эффект может быть обусловлен локализованной активностью мутеина IL-2, антитела к IL-2 или молекулы на основе мутеина IL-2 и Fc-слитого белка в месте воспаления или аутоиммунитета.

### Примеры

Следующие примеры, как фактические, так и гипотетические, приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Передача сигналов мутеинов IL-2 с участием pSTAT5.

Мутеины IL-2 исследовали в отношении относительной активации pSTAT5. Скрининг в отношении активности разрабатывали для идентификации мутеинов с расширенным окном Treg: Teff, т.е. таких, которые сохраняли высокий уровень активности в клетках Treg, при этом демонстрируя значительную аттенуацию в клетках Teff. Поскольку активированные клетки Teff экспрессируют повышенные уровни CD25, а пациенты с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями характеризуются повышенным содержанием этих клеток, авторы настоящего изобретения применяли CD25+-гейтирование в отношении клеток Teff для имитирования более реалистичной дифференциации экспрессии CD25 у пациентов. Активность мутеинов IL-2 оценивали по ответу фосфорилированного STAT5 в клетках, измеренному посредством анализа на основе FACS. Вкратце, ранее замороженные PBMC человека размораживали и выдерживали в полной среде в течение 0,5-2 ч. Клетки суспендировали при концентрации 5-10 млн клеток/мл и распределяли на аликвоты по 100 мкл на лунку в 96-луночной планшете с глубокими лунками (0,5-1 млн клеток на лунку). Клетки стимулировали мутеинами IL-2 при 10-кратном титровании дозы в диапазоне от 1 нМ до 200 нМ при конечном объеме 10 мкл в течение 30 мин. Уровень фосфорилирования STAT5 измеряли с использованием набора буферов BD phosflow. Вкратце, для прекращения стимуляции добавляли 1 мл буфера для лизиса/фиксации BD phosflow. Клетки фиксировали в течение 10-15 мин при 37°C и пермеабелизовали с помощью буфера 1x BD phosflow на льду перед окрашиванием в отношении CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 и pSTAT5. Результаты для двух доноров PBMC показаны в табл. 2 ниже.

## Активация мутеинов IL-2 посредством pSTAT5

IL2	Донор 1				Донор 2			
	Обработка 1		Обработка 200		Обработка 1		Обработка 200	
	нм IL2		нм IL2		нм IL2		нм IL2	
	%pST AT5+ Treg	%pST AT5+ Teff	%pST AT5+ Treg	%pST AT5+ Teff	%pST AT5+ Treg	%pST AT5+ Teff	%pST AT5+ Treg	%pST AT5+ Teff
Только среда	1,86	0,655	2,57	0,68	0,29	1,24	0,59	0,4
WTIL2	89,95	48,3	94,4	41	96,6	80,4	95,4	78,1
N88D			92,2	27	89,3	39,9	95,2	56
V91R	87,45	40,3	97,25	39,25				
H16R	47,5	5,135	66,5	11,85	56,4	14,6	73,7	19,3
N88R	70,2	20,1	87,6	38,8	84,3	32,6	91,7	44,5
V91H	90,4	61,35	95,8	54,35	95,7	81,7	96,3	76,6
N88K	31,2	3,195	67,1	17,35	42	6,61	77,3	15,5
D20W	5,445	1,15	31,1	5,5	8,48	2,55	27,9	2,66
D20A	38,85	5,435	63,65	19,45	49	5,94	64	15
H16E	88,2	52,3	95,5	52,25	95,7	70,8	95,4	72
E61Q	88,65	68,05	95,4	67,3	96,3	84	96,5	83,2
V91K, H16E	41,45	5,425	60,25	15,55	53	10,1	67,9	15,3
V91R, C125A	88,95	50,45	95,7	51,7	95,7	76,6	96,2	75,7
V91H, E61Q	87,05	43,8	96,75	68,85	93	59,7	97,5	83,1
V91K, H16R	1,61	0,63	6,96	1,845	2,31	2,22	2,96	1,65
V91K, D20W	1,215	0,85	3,265	1,465	2,14	2,68	1,74	1,99
V91K, D20A	9,19	1,185	30,15	4,385	15,9	2,43	30,8	5,79
V91K, N88K	1,69	0,64	6,87	1,075	2,01	1,65	2,68	0,91
H16E, V91H	78,45	24,75	88,1	36,55	89,6	42,2	92,1	48,7
V91H, D20A	7,15	0,805	24,55	3,11	11,1	1,83	22,5	4,32
H16R, D20A	1,205	1,13	4,27	0,93	2,19	1,45	0,86	1,89
D20A, H16E	19,85	1,66	39,3	5,945	28,6	3,67	39	5,3
V91H, H16R	14,35	1,35	35,1	4,55	24,5	3,3	36,1	4,8
H16E, N88K	1,475	0,495	3,14	0,625	1,09	1,09	0,8	0
D20A, E61Q	10,13	1,005	65,95	20,1	9,72	1,82	68,9	16,3
H16E, E61Q	64,95	12,05	95,45	61,35	70,6	10,2	96	75,5
V91K, E61Q	69,5	14,3	95,4	57,05	73,7	12,1	96,6	74,1
V91K, E61Q, H16E	6,02	1,135	52,5	11,7	6,21	1,15	58,6	10,5
V91K, E61Q, H16R	3,075	1,435	8,52	1,155	1,87	0,65	3,74	1,68
V91K, E61Q, D20A	2,215	0,88	26,6	2,71	1,84	0,98	22,5	2,51
D20A, H16E, E61Q	2,715	0,775	32,25	3,325	1,49	0,81	27,6	3,73
D20A, H16R, E61Q	15,35	1,465	80,9	27,65	13,3	1,88	86	29,9

## 048038

<b>V91H, E61Q</b>	<b>H16R,</b>	76,85	24,6	95,1	44,3	82,5	24,7	95,4	68,3
<b>H16E, E61Q</b>	<b>V91H,</b>	24,4	1,235	83,4	33,55	26,7	2,04	90,9	44,1
<b>V91H, E61Q</b>	<b>D20A,</b>	16,8	1,3	94,1	51,6	19	2,54	95,3	64,2
<b>N88K, M104T</b>		2,2	0,71	11,035	0,98	3,6	1,06	9,22	1,47
<b>V91H, M104T</b>		89,35	47,65	97,65	44,6	96,9	77,5	97,1	69,5
<b>D20A, M104T</b>		52,7	7,195	70,3	17,1	67	12,3	78,3	19,8
<b>H16E, M104T</b>		88,15	47,7	96,25	44	95,9	71,7	95,9	63,3
<b>N88K, M104V</b>		4,89	1,025	21	1,655	4,26	0,91	17,7	2,72
<b>V91H, M104V</b>		89,35	50,8	97	50,9	95,2	73,1	96,7	71,7
<b>D20A, M104V</b>		52,55	6,245	70,05	16,2	66,7	12	76,2	18,9
<b>H16E, M104V</b>		88,95	47,4	96,25	44,2	91,1	59,8	96,5	67,5
<b>V91K, M104T</b>	<b>H16E,</b>	44,45	4,105	62,7	11,175	54,7	7,07	70,7	17,2
<b>V91K, M104T</b>	<b>H16R,</b>	1,92	1,16	10,9	2,3	3,22	1,64	5,64	1,65
<b>V91K, M104T</b>	<b>D20A,</b>	9,34	0,9	31,05	4,78	18,5	2,52	28,9	1,59
<b>D20A, M104T</b>	<b>H16E,</b>	22,25	1,94	42	8,835	34,2	2,33	46	9,92
<b>H16E, M104T</b>	<b>V91H,</b>	78,6	24,6	89,05	37,75	91	35,2	93,2	46,7
<b>V91H, M104T</b>	<b>D20A,</b>	8,825	1,105	27,1	4,355	15,3	1,9	21,7	3,48
<b>V91K, M104V</b>	<b>H16E,</b>	39,15	4,94	57,5	13,1	56,6	9,66	66,7	11,7
<b>V91K, M104V</b>	<b>H16R,</b>	2,175	1,06	8,995	1,74	4,09	1,5	3,98	0,7
<b>V91K, M104V</b>	<b>D20A,</b>	9,07	1,275	30,2	4,165	21,3	2,74	34,8	4,81
<b>H16E, M104V</b>	<b>V91H,</b>	79,3	22,7	86,3	33,4	90,3	36,8	92,3	50,4
<b>V91H,</b>	<b>D20A,</b>	7,985	1,365	25,6	3,78	11,2	2,96	21,1	2,6

<b>M104V</b>									
<b>V91K, H16E, E61Q, M104T</b>	35,25	3,21	88,1	35,95	37,6	4,74	93,4	45,4	
<b>V91K, H16R, E61Q, M104T</b>	1,57	0,81	13,8	1,4	1,68	0,74	6,93	1,27	
<b>H16E, V91H, E61Q, M104T</b>	25,8	1,925	84,1	39,8	38,9	2,63	91,9	47,7	
<b>V91H, D20A, E61Q, M104T</b>	49,5	6,74	71,2	18,2	67,4	11,3	79,5	22,9	
<b>D20W, E61Q</b>	2,29	0,77	6,655	1,34	2,45	1,2	2,97	1	
<b>D20W, V91K, E61Q</b>	3,855	1,1	36,3	4,41	2,89	1,15	32,5	4,57	
<b>N88K, E61Q</b>	18,2	1,64	92,95	45,7	26,7	4,22	97,1	64,1	
<b>V91K, N88K, E61Q</b>	5,42	0,485	83,25	30,15	6,34	1,45	91,5	41,5	
<b>V91K, N88K, E61Q, M104T</b>	2,9	0,765	76,2	21,4	4,02	1,35	87,7	29,6	
<b>D20W, V91K, E61Q, M104T</b>	80,6	27,05	95,2	41,25	89,2	35,7	97	61,5	
<b>V91H, M104L</b>	90,55	47,85	96,85	39,65	98,1	63,9	96,9	66,3	
<b>D20A, M104L</b>	47,7	5,28	69,2	15,35	66	12,6	76,7	24,4	
<b>H16E, M104L</b>	89,25	43,45	95,6	38,75	97,2	61	96,6	62,1	
<b>V91K, H16R, M104L</b>	3,4	1,04	10,265	0,785	5,19	2,74	5,93	1,64	
<b>V91K, D20A, M104L</b>	11,95	1,47	30,55	3,665	21	2,89	30,5	4,89	

Пример 2. Стабильность мутеинов IL-2.

Для отбора стабильных молекул с высоким потенциалом технологичности тестировали анализы оценки молекул в отношении измерения Tm посредством DSC совместно с 10-дневной стабильностью при 40°C, измеряемой посредством SEC-хроматографии. Результаты %MP через 10 дней изображены на фиг. 1.

Пример 3. Аттенуация мутеинов человеческого IL-2.

Аттенуированные мутеины человеческого IL-2 оценивали в отношении активности в спленоцитах мыши в анализе *in vitro* pSTAT5. Авторы данного изобретения подтверждали активность выбранных мутеинов в отношении иммунных клеток мыши в анализе pSTAT5 спленоцитов мыши (фиг. 2). Изображены кривые подбора дозы для трех аттенуированных мутеинов, H16R, V91K D20A M104V, D20W и контролей, Fc человеческого IL-2 дикого типа, рекомбинантного человеческого IL-2 и рекомбинантного IL-2 мыши. Спленоциты мыши стимулировали в течение 30 мин в среде, содержащей титрующие концентрации мутеинов, и анализировали посредством FACS. Мутеины продемонстрировали такой же ранговый порядок активности как в клетках Treg мыши, как и в клетках Treg человека (т.е. WT>H16R>V91K D20A M104V>D20W). Ранговый порядок был аналогичным для T-эффекторных клеток.

Пример 4. Активность *in vivo* мутеинов IL-2 человека у мышей.

Мышам C57Bl6 вводили однократную дозу PBS (контроль носителя), IL-2-Fc дикого типа, V91K D20A M104V, H16R или D20W в день 0, а спленоциты собирали и анализировали в день 4 в отношении воздействия на клетках Treg, CD8 T-клетки и NK-клетки. Оценивали три дозы (1 мкг, 5 мкг или 25 мкг на мышь), за исключением D20W, который вводили только в дозе 25 мкг. Процентное содержание клеток Treg, определяемое CD4+ CD25+ FoxP3+ клетками, в общем количестве живых гейтированных клеток показан на (A), и показаны рассчитанное общее количество клеток Treg (B), CD8 T-клеток (C) и NK-клеток (D). Как изображено на фиг. 3, IL-2 дикого типа, H16R и V91K D20A M104V индуцировали значительную экспансию клеток Treg *in vivo* дозозависимым образом. Два мутеина, H16R и V91K D20A M104V, продемонстрировали неожиданно устойчивую активность в отношении клеток Treg в такой же или даже большей степени, чем IL-2.Fc дикого типа. В отличие от этого, ни H16R, ни V91K D20A

M104V не продемонстрировали значительной активности в отношении CD8 T- или NK-клеток по сравнению с IL-2.Fc дикого типа. Эти результаты демонстрируют, что, несмотря на значительное ослабление активности, измеряемое путем считывания pSTAT5 *in vitro*, ослабленные мутеины сохраняют способность индуцировать устойчивый ответ в отношении Treg *in vivo*, индуцируя при этом минимальный ответ в отношении CD8 T-клеток и NK-клеток. Таким образом, аттенуация непропорционально влияет на селективность Treg:не-Treg *in vivo*.

Пример 5. Передача сигналов мутеинов IL-2 с участием pSTAT5.

Мутеины IL-2 исследовали в отношении относительной активации pSTAT5. Скрининг в отношении активности разрабатывали для идентификации мутеинов с расширенным окном Treg:Teff, т.е. таких, которые сохраняли высокий уровень активности в клетках Treg, при этом демонстрируя значительную аттенуацию в клетках Teff. Поскольку активированные клетки Teff экспрессируют повышенные уровни CD25, а пациенты с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями характеризуются повышенным содержанием этих клеток, авторы настоящего изобретения применяли CD25+-гейтирование в отношении клеток Teff для имитирования более реалистичной дифференциации экспрессии CD25 у пациентов. Активность мутеинов IL-2 оценивали по ответу фосфорилированного STAT5 в клетках, измеренному посредством анализа на основе FACS. Вкратце, ранее замороженные PBMC человека размораживали и выдерживали в полной среде в течение 0,5-2 ч. Клетки суспендировали при концентрации 5-10 млн клеток/мл и распределяли на аликвоты по 100 мкл на лунку в 96-луночной планшете с глубокими лунками (0,5-1 млн клеток на лунку). Клетки стимулировали мутеинами IL-2 при 10-кратном титровании дозы в диапазоне от 0,4 нМ до 25 нМ при конечном объеме 10 мкл в течение 30 мин. Уровень фосфорилирования STAT5 измеряли с использованием набора буферов BD phosflow. Вкратце, для прекращения стимуляции добавляли 1 мл буфера для лизиса/фиксации BD phosflow. Клетки фиксировали в течение 10-15 мин при 37°C и пермеабелизировали с помощью буфера 1x BD phosflow на льду перед окрашиванием в отношении CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 и pSTAT5. Результаты для двух доноров PBMC показаны в табл. 2 ниже.



Таблица 3

Активация мутеинов IL-2 посредством pSTAT5									
Донор 1					Донор 2				
IL2	Обработка 25		Обработка 0,4		Обработка 25		Обработка 0,4		
	нм IL2		нм IL2		нм IL2		нм IL2		
	%pSTA	%pSTA	%pST	%pSTA	%pST	%pSTA	%pST	%pSTA	
	T5+	T5+	AT5+	T5+	AT5+	T5+	AT5+	T5+	
	Treg	Teff	Treg	Teff	Treg	Teff	Treg	Teff	
<b>Только среда</b>	3,85	.045							
<b>WTIL2</b>	100	87,7	99,7	85,3	99,8	91,9	99,5	90,3	
<b>V91A, H16A</b>	99,7	89	99,8	85,8	99,8	91,4	99,2	43,4	
<b>V91A, H16D</b>	99,4	82,9	99,7	76,4	100	84,5	95,1	22	
<b>V91A, H16E</b>	99,6	76,7	100	63,6	99,6	69,4	84,4	11	
<b>V91A, H16S</b>	99,9	84,1	99,8	80,9	99,7	88,6	99,1	38,1	
<b>V91E, H16A</b>	99,6	85	99,8	78,1	99,8	87,5	96,4	28,3	
<b>V91E, H16D</b>	99,5	72,6	99,2	56,9	99,8	64,7	81,2	11,2	
<b>V91E, H16E</b>	99,3	63,3	99,3	48,1	99	62,3	74,3	7,16	
<b>V91E, H16S</b>	100	84,2	99,3	76,1	99,8	87,3	96,6	28,3	
<b>V91K, H16A</b>	99,3	73,4	98,9	55,9	100	65,6	82,4	12,6	
<b>V91K, H16D</b>	96,1	37,5	93,8	22,8	95,4	30	45,1	2,1	
<b>V91K, H16S</b>	99,4	71	99	53,3	99,8	68,5	70,7	3,36	
<b>V91S, H16E</b>	98,6	60,1	98,9	45	98,9	53,6	70,5	7,58	

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутеин человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:1, где указанный мутеин IL-2 содержит мутации V91K, H16E; H16E, V91H; V91H, H16R; V91A, H16A; V91A, H16D; V91A, H16E; V91A, H16S; V91E, H16A; V91E, H16D; V91E, H16E; V91E, H16S; V91K, H16A; V91K, H16D; V91K, H16S или V91S, H16E и указанный мутеин IL-2 преимущественно стимулирует регуляторные Т-клетки по сравнению с другими Т-клетками.

2. Мутеин человеческого IL-2 по п.1, где мутеин IL-2 дополнительно преимущественно стимулирует регуляторные Т-клетки по сравнению с NK-клетками.

3. Мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1 и 2, где указанный мутеин IL-2 дополнительно содержит мутацию C125A.

4. Мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-3, где мутеин IL-2 характеризуется менее чем 30% активацией pSTAT эффекторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1.

5. Мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-4, где мутеин IL-2 характеризуется менее чем 30% активацией pSTAT эффекторных Т-клеток и более чем 40% активацией pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1.

6. Мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-5, где мутеин IL-2 характеризуется более чем 40% активацией pSTAT регуляторных Т-клеток при обработке 1 нМ IL-2 с использованием протокола из примера 1.

7. Мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-6, где дополнительно мутеин IL-2 характеризуется более чем 30% стабильностью при использовании протокола из примера 2.

8. Fc-слитый белок, содержащий Fc и мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-7.

9. Fc-слитый белок по п.8, где Fc представляет собой Fc человеческого IgG1.

10. Fc-слитый белок по п.9, где Fc человеческого IgG1 предусматривает одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного Fc, где человеческий IgG1 предусматривает замену в N297, где замена в N297 представляет собой N297G.

11. Fc-слитый белок по любому из пп.9 или 10, предусматривающий замену или делецию С-концевого лизина указанного Fc человеческого IgG.

12. Fc-слитый белок по любому из пп.9-11, где линкер соединяет части Fc и мутеина человеческого IL-2 в указанном белке, где линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7).

13. Fc-слитый белок по любому из пп.9-12, где мутеин IL-2 дополнительно предусматривает присоединение, замену или делецию аминокислоты, приводящие к изменению профиля гликозилирования указанного Fc-слитого белка при экспрессии в клетках млекопитающих, где мутеин IL-2 предусматривает замену T3 или мутацию S5.

14. Fc-слитый белок по любому из пп.9-13, где указанный Fc-слитый белок содержит димер Fc.

15. Fc-слитый белок по п.14, где указанный Fc-слитый белок содержит два мутеина IL-2.

16. Fc-слитый белок по п.15, где указанный Fc-слитый белок содержит один мутеин IL-2.

17. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутеин человеческого IL-2 по любому из пп.1-7 или Fc-слитый белок по любому из пп.8-16.

18. Выделенная нуклеиновая кислота по п.17, где указанная Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2 кодируются в одной открытой рамке считывания.

19. Выделенная нуклеиновая кислота по п.17 или 18, где Fc представляет собой Fc человеческого IgG1.

20. Выделенная нуклеиновая кислота по п.19, где Fc человеческого IgG1 предусматривает одну или более мутаций, изменяющих эффекторную функцию указанного Fc, где человеческий IgG1 предусматривает замену в N297, где замена в N297 представляет собой N297G.

21. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп.17-20, кодирующая замену или делецию С-концевого лизина указанного Fc человеческого IgG.

22. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп.17-21, дополнительно кодирующая линкер, соединяющий Fc-область антитела и мутеин человеческого IL-2, где линкер представляет собой GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT или (SEQ ID NO: 6) и YGNGT (SEQ ID NO: 7).

23. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп.17-22, где мутеин IL-2 дополнительно предусматривает присоединение, замену или делецию аминокислоты, приводящие к изменению профиля гликозилирования белка, содержащего указанный мутеин IL-2, при экспрессии в клетках млекопитающих, где мутеин IL-2 предусматривает замену T3 или мутацию S5.

24. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп.17-23, функционально связанную с промотором.

25. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп.17-24.

26. Клетка-хозяин по п.25, где выделенная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором.

27. Способ получения мутеина человеческого IL-2 или Fc-слитого белка, включающий культивирование клетки-хозяина по п.25 или 26 в условиях, в которых происходит экспрессия с указанного промотора, и сбор мутеина человеческого IL-2 или Fc-слитого белка из указанной культуры.

28. Способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в популяции Т-клеток или в периферической крови субъекта, включающий приведение популяции Т-клеток в контакт с эффективным количеством мутеина человеческого IL-2 по любому из пп.1-7 или Fc-слитого белка по любому из пп.8-16.

29. Способ по п.28, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается.

30. Способ по п.29, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3+FoxP3- клеткам повышается по меньшей мере на 50%.

31. Способ повышения отношения регуляторных Т-клеток (Treg) к естественным клеткам-киллерам (NK) в периферической крови субъекта, включающий введение эффективного количества мутеина человеческого IL-2 по любому из пп.1-7 или Fc-слитого белка по любому из пп.8-16.

32. Способ по п.31, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается.

33. Способ по п.32, где отношение CD3+FoxP3+ клеток к CD3-CD19- лимфоцитам, экспрессирующим CD56 и/или CD16, повышается по меньшей мере на 50%.

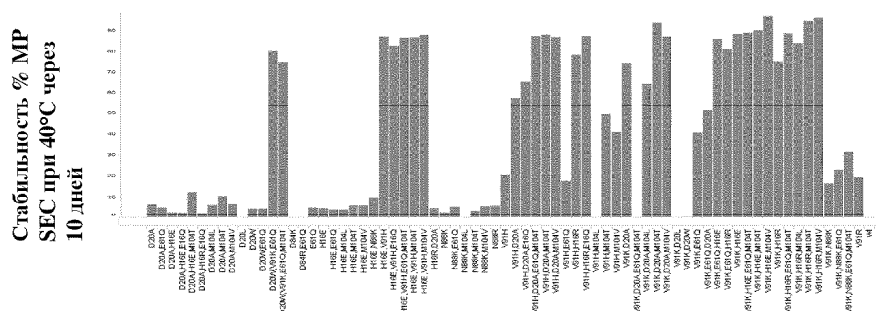
34. Способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества мутеина IL-2 по любому из пп.1-7 или Fc-слитого белка по любому из пп.8-16.

35. Способ лечения субъекта с воспалительным или аутоиммунным заболеванием по п.34, где введение приводит к снижению по меньшей мере одного симптома заболевания.

36. Способ по п.34, где отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта повышается после введения.

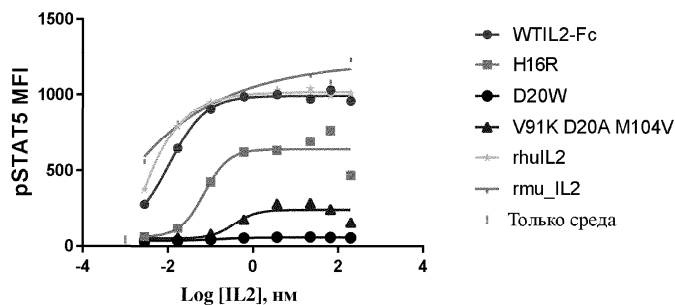
37. Способ по п.34, где отношение регуляторных Т-клеток (Treg) к нерегуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта остается практически неизменным после введения.

38. Способ по любому из пп.34-37, где воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", васкулит, индуцированный гепатитом С, диабет I типа, диабет II типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, очаговую алопецию, атеросклероз, псориаз, отторжение трансплантата органа, синдром Шегрена, болезнь Бехчета, самопроизвольное прерывание беременности, atopические заболевания, астму или воспалительные заболевания кишечника.

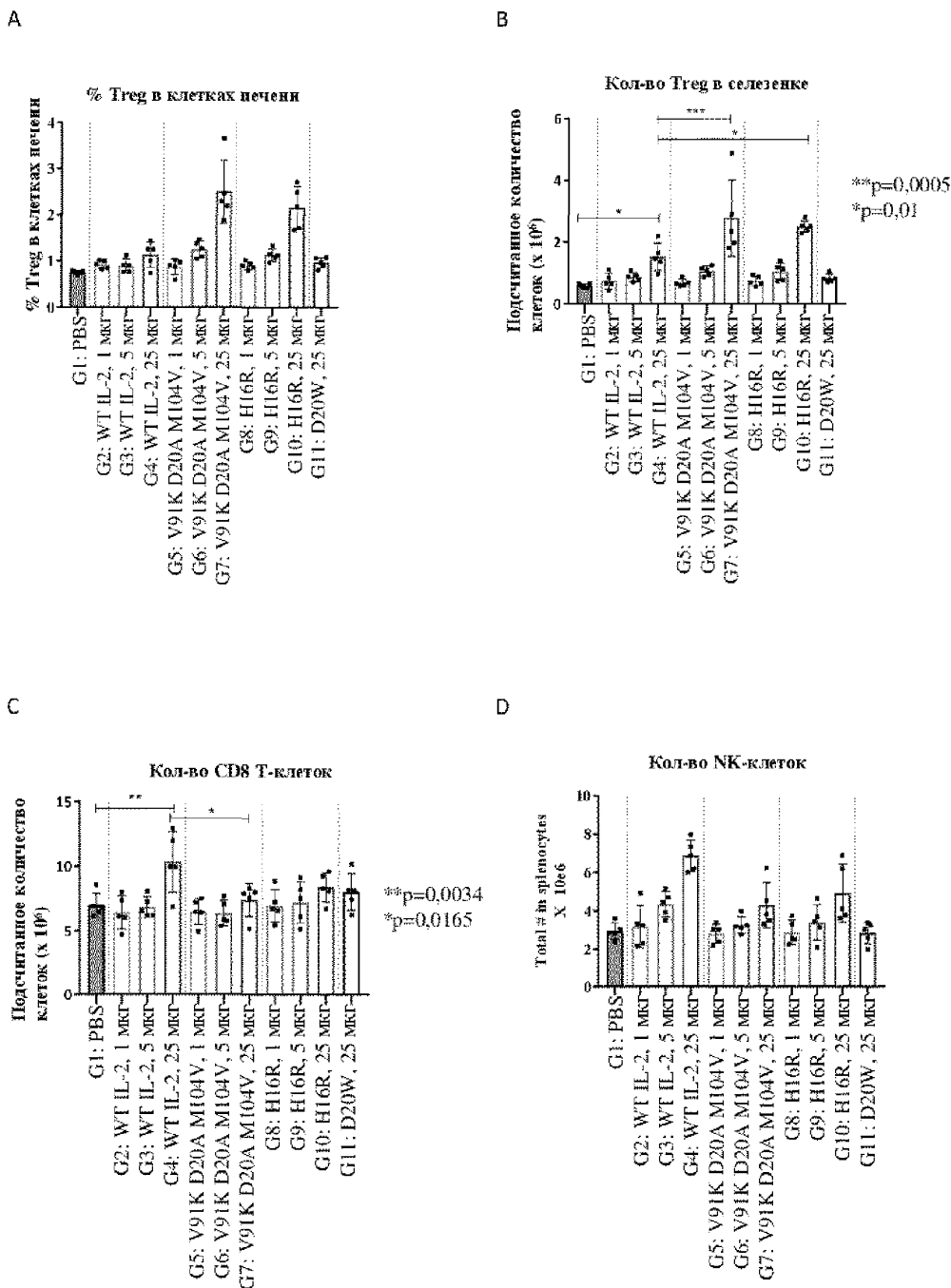


Фиг. 1

#### Трансформация X pSTAT5 MFI в Treg: CD4+ FOP3+



Фиг. 2



Фиг. 3

