

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет згідно з заявою на патент США із серійним номером 62/886283, поданою 13 серпня 2019 року, яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Рівень техніки

IL-2 зв'язує три субодиниці трансмембранного рецептора: IL-2R β і IL-2R γ , які спільно активують внутрішньоклітинні події передачі сигналу у разі зв'язування IL-2, і CD25 (IL-2R α), який служить для стабілізації взаємодії між IL-2 і IL-2R $\beta\gamma$. Сигнали, що доставляються IL-2R $\beta\gamma$, включають сигнали шляхів PI 3-кінази, Ras-MAP-кінази та STAT5.

Т-клітинам потрібна експресія CD25 для відповіді на низькі концентрації IL-2, які зазвичай присутні у тканинах. Т-клітини, які експресують CD25, включають FOXP3+ регуляторні Т-клітини (клітини Treg), які необхідні для пригнічення аутоімунного запалення, і FOXP3-Т-клітини, які активуються для експресії CD25. FOXP3-CD25+Т-ефекторні клітини (Teff) можуть являти собою або CD4+, або CD8+ клітини, обидва з яких можуть сприяти запаленню, аутоімунітету, відторгненню трансплантата органа або реакції "трансплантат проти хазяїна". Стимульована IL-2 передача сигналів за участю STAT5 є критичною для нормального росту й виживання клітин Т-reg і для високої експресії FOXP3.

У WO 2010/085495, що перебуває в спільному використанні, авторами описано застосування мутеїнів IL-2 для переважної експансії або стимуляції клітин Treg. Під час введення суб'єктові вплив на клітини Treg є корисним для лікування запальних і аутоімунних захворювань. Хоча мутеїни IL-2, описані в даному документі, застосовні для експансії клітин Treg порівняно з клітинами Teff in vivo, було необхідно створити мутеїни IL-2, які характеризувалися б оптимальними властивостями як терапевтичний засіб для людини.

Суть винаходу

У даному документі описані мутеїни IL-2, які можна виготовляти з високим виходом, та які характеризуються фармакологічною активністю. Зокрема, мутеїни IL-2 за даним винаходом характеризуються покращеним віком селективності Treg:Teff. За спроби одержати такі молекули для застосування як терапевтичних засобів для лікування людини виник ряд несподіваних і непередбачених спостережень. Композиції й способи, описані в даному документі, являють собою результат цієї спроби.

Мутеїни IL-2, описані в даному документі, характеризуються відносно низькою ймовірністю створення імунної відповіді проти мутеїну IL-2 і/або ендогенного IL-2 та забезпечують переважну експансію й активацію Treg. Більш того, у певних варіантах здійснення мутеїн IL-2 злитий з молекулою, наприклад, антитілом Fc, що приводить до підвищення періоду напівжиття в сироватці крові при введенні суб'єктові. Мутеїни IL-2 характеризуються коротким періодом напівжиття в сироватці крові (від 3 до 5 годин у разі підшкірної ін'єкції). Ілюстративні злиття мутеїну IL-2 і Fc, описані в даному документі, характеризуються періодом напівжиття у людини, що становлять щонайменше 1 день, щонайменше 3 дні, щонайменше 5 днів, щонайменше 10 днів, щонайменше 15 днів, щонайменше 20 днів або щонайменше 25 днів. Цей ефект щодо фармакокінетики мутеїнів IL-2 дозволяє знижувати або рідше вводити дозу терапевтичного засобу на основі мутеїну IL-2.

Більш того, у разі створення великої фармацевтичної молекули необхідно враховувати можливість одержання великої молекули в більших кількостях за зведення до мінімуму агрегації й приведенні до максимуму стабільності молекули. Молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка демонструють такі властивості.

Крім того, у певних варіантах здійснення білок на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка містить Fc-ділянку IgG1. За необхідності усунути ефекторні функції IgG1 (наприклад, активність ADCC) було виявлено, що мутація аспарагіну в положенні 297 на гліцин (N297G; схема нумерації згідно EU) забезпечувала значно покращену ефективність очищення й біофізичні властивості порівняно з іншими мутаціями, які призводять до аглікозилювання Fc IgG1. У переважних варіантах здійснення в Fc вбудовують цистеїни для створення дисульфідних зв'язків, що призводило до підвищення стабільності аглікозилюваної Fc-вмісної молекули. Застосовність аглікозилюваного Fc виходить за межі контексту молекули на основі Fc-злитого білка й мутеїну IL-2. Таким чином, у даному документі передбачені Fc-вмісні молекули, Fc-злиті білки й антитіла, що містять заміну N297G і необов'язково заміну одного або декількох додаткових залишків на цистеїн.

В одному аспекті даний винахід стосується мутеїну людського інтерлейкіну-2 (IL-2), що містить амінокислотну послідовність, яка на щонайменше 90 % ідентична амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:1, при цьому вказаний мутеїн IL-2 містить щонайменше одну мутацію, вибрану з 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; та V91S, H16E; і переважно стимулює регуляторні Т-клітини порівняно з іншими Т-клітинами або NK-клітинами, як в аналізах *in vitro*, так і в гуманізованих мишей (миші NSG, реконструйовані за допомогою CD34+ гемопоетичних стовбурових клітин). В одному варіанті здійснення вказаний мутеїн на щонайменше 95 % ідентичний амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:1. В іншому варіанті здійснення вказаний мутеїн на щонайменше 97 % ідентичний амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:1. В іншому варіанті здійснення амінокислотна послідовність вказаного мутеїну відрізняється від амінокислотної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:1, тільки в положенні C125A і в одному положенні, вибраному з 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; та V91S, H16E.

В іншому аспекті даний винахід стосується Fc-злитого білка, що містить Fc і мутеїн людського IL-2, як описано вище. В одному варіанті здійснення Fc являє собою Fc людського IgG1. В іншому варіанті здійснення Fc людського IgG1 містить одну або декілька мутацій, що змінюють ефекторну функцію вказаного Fc. В іншому варіанті здійснення людський IgG1 передбачає заміну в N297. В іншому варіанті здійснення заміна в положенні N297 являє собою N297G. В іншому варіанті здійснення Fc-злитий білок передбачає заміну або делецію C-кінцевого лізину вказаного Fc людського IgG. В іншому варіанті здійснення C-кінцевий лізин вказаного Fc людського IgG видалений. В іншому варіанті здійснення лінкер з'єднує ділянки Fc і мутеїну людського IL-2 вказаного білка. В іншому варіанті здійснення лінкер являє собою GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT або (SEQ ID NO: 6) і YGNGT (SEQ ID NO: 7). В іншому варіанті здійснення лінкер являє собою GGGGS (SEQ ID NO: 5). В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає приєднання, заміну або делецію амінокислоти, що призводять до зміни профілю глікозилювання вказаного Fc-злитого білка у разі експресії в клітинах ссавців. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3N або T3A. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3N. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає мутацію S5. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає мутацію S5T. В іншому варіанті здійснення вказаний Fc-злитий білок містить димер Fc. В іншому варіанті здійснення вказаний Fc-злитий білок містить два мутеїни IL-2. В іншому варіанті здійснення вказаний Fc-злитий білок містить один мутеїн IL-2.

В іншому аспекті даний винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує мутеїн людського IL-2, як описано вище.

В іншому аспекті даний винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує Fc-ділянку антитіла й мутеїн людського IL-2, як описано вище. В одному варіанті здійснення вказана Fc-ділянка антитіла й мутеїн людського IL-2 кодується в одній відкритій рамці зчитування. В іншому варіанті здійснення Fc являє собою Fc людського IgG1. В іншому варіанті здійснення Fc людського IgG1 містить одну або декілька мутацій, що змінюють ефекторну функцію вказаного Fc. В іншому варіанті здійснення людський IgG1 передбачає заміну в N297. В іншому варіанті здійснення заміна в положенні N297 являє собою N297G. В іншому варіанті здійснення нуклеїнова кислота кодує заміну або делецію C-кінцевого лізину вказаного Fc людського IgG. В іншому варіанті здійснення C-кінцевий лізин вказаного Fc людського IgG видалений. В іншому варіанті здійснення нуклеїнова кислота додатково кодує лінкер, що з'єднує Fc-ділянку антитіла й мутеїн людського IL-2. В іншому варіанті здійснення лінкер являє собою GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT, або (SEQ ID NO: 6), та YGNGT (SEQ ID NO: 7). В іншому варіанті здійснення лінкер являє собою GGGGS (SEQ ID NO: 5). В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає приєднання, заміну або делецію амінокислоти, що приводять до зміни профілю глікозилювання білка, що містить вказаний мутеїн

IL-2, при експресії в клітинах ссавців. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3N або T3A. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 передбачає заміну T3N. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає мутацію S5. В іншому варіанті здійснення мутеїн IL-2 додатково передбачає мутацію S5T.

В іншому аспекті даний винахід стосується вектора експресії, що містить виділену нуклеїнову кислоту, описану вище, функціонально пов'язану із промотором.

В іншому аспекті даний винахід стосується клітини-хазяїна, що містить виділену нуклеїнову кислоту, описану вище. В одному варіанті здійснення виділена нуклеїнова кислота функціонально пов'язана із промотором. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою прокариотичну клітину. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою E. coli. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою клітинну лінію яєчника китайського хом'ячка (CHO).

В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання мутеїну людського IL-2, що включає культивування клітини-хазяїна, яка описана вище, в умовах, в яких експресується вказаний промотор, і збір мутеїну людського IL-2 із вказаної культури.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання Fc-злитого білка, що включає культивування клітини-хазяїна, яка описана вище, в умовах, в яких експресується вказаний промотор, і збір Fc-злитого білка із вказаної культури.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин у контакт із ефективною кількістю мутеїну людського IL-2, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у популяції Т-клітин, що включає приведення популяції Т-клітин у контакт із ефективною кількістю Fc-злитого білка, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну людського IL-2, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-злитого білка, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3+Foxp3- клітин підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до природних клітин-кілерів (NK) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості мутеїну людського IL-2, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до природних клітин-кілерів (NK) у периферичній крові суб'єкта, що включає введення ефективної кількості Fc-злитого білка, який описаний вище. В одному варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, підвищується. В іншому варіанті здійснення відношення CD3+Foxp3+ клітин до CD3-CD19- лімфоцитів, що експресують CD56 і/або CD16, підвищується на щонайменше 50 %.

В іншому аспекті в даному винаході передбачений спосіб лікування суб'єкта із запальним або аутоімунним захворюванням, при цьому вказаний спосіб включає введення вказаному суб'єктові терапевтично ефективної кількості мутеїну IL-2, який описаний вище, або терапевтично ефективної кількості Fc-злитого білка, який описаний вище. В одному варіанті здійснення введення спричиняє зменшення щонайменше одного симптому захворювання. В іншому варіанті здійснення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта підвищується після введення. В іншому варіанті здійснення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта залишається по суті на тому самому рівні після введення. В іншому варіанті здійснення запальне або аутоімунне захворювання

являє собою вовчак, реакцію "трансплантат проти хазяїна", васкуліт, індукований гепатитом С, діабет I типу, діабет II типу, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, осередкову алопецію, атеросклероз, псоріаз, відторгнення трансплантата органа, синдром Шегрена, хворобу Бехчета, мимовільне переривання вагітності, atopічні захворювання, астму або запальні захворювання кишечника.

Стислий опис графічних матеріалів

На фіг. 1 зображені результати вимірювання T_m мутеїнів IL-2 за допомогою DSC зі стабільністю при 40 °C протягом 10 днів, вимірюваною за допомогою SEC-хроматографії.

На фіг. 2 зображені криві підбору дози для трьох атенуєваних мутеїнів, H16R, V91K D20A M104V, D20W і контролів, Fc людського IL-2 дикого типу, рекомбінантного людського IL-2 і рекомбінантного IL-2 миші в аналізі pSTAT5 in vitro.

На фіг. 3 зображена оцінка мутеїнів людського IL-2 V91K D20A M104V, H16R, D20W і контрольного IL-2-Fc дикого типу щодо активності in vivo у мишей.

Докладний опис переважних варіантів здійснення

Використовувані в даному документі заголовки розділів служать тільки для організаційних цілей і не повинні тлумачитися як такі, що обмежують описуваний об'єкт даного винаходу. Усі наведені в тексті даного опису літературні джерела включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Для рекомбінантної ДНК, синтезу олігонуклеотидів, культивування й трансформації тканин, очищення білків тощо можна застосовувати стандартні методики. Ферментативні реакції й методики очищення можна здійснювати згідно з описами виробника або так, як це зазвичай робиться в рівні техніки, або як описано в даному документі. Наступні процедури й методики зазвичай можна здійснювати відповідно до звичайних способів, добре відомих з рівня техніки, і як описано в різних загальних й більш конкретних посиланнях, які приводяться й розглядаються в описі. Див., наприклад, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., яка включена в даний документ за допомогою посилання для будь-якої мети. Якщо не передбачені конкретні визначення, номенклатура, використовувана у зв'язку з лабораторними процедурами й методиками аналітичної хімії, органічної хімії, медичної й фармацевтичної хімії, описаними в даному документі, добре відома й зазвичай використовується в рівні техніки. Стандартні методики можна застосовувати для хімічного синтезу, хімічних аналізів, одержання, складання й доставки фармацевтичних засобів, а також лікування пацієнтів.

IL-2

Мутеїни IL-2, описані в даному документі, являють собою варіанти людського IL-2 дикого типу. Використовуваний у даному документі термін "людський IL-2 дикого типу", "IL-2 WT" або "IL-2 дикого типу" позначає поліпептид, що характеризується наступною амінокислотою послідовністю:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

де X являє собою C, S, V або A (SEQ ID NO:2).

Варіанти можуть передбачати одну або декілька замін, делецій або вставок в амінокислотній послідовності IL-2 дикого типу. Залишки позначаються в даному документі однобуквеним кодом амінокислоти, за яким йде положення амінокислоти IL-2, наприклад, K35 являє собою залишок лізину в положенні 35 SEQ ID NO: 2. Заміни позначаються в даному документі однобуквеним амінокислотним кодом, за яким йде положення амінокислоти IL-2, за яким йде амінокислотний код, що заміщає однобуквений, наприклад, K35A являє собою заміну залишку лізину в положенні 35 в SEQ ID NO:2 залишком аланіну.

Мутеїни IL-2

У даному документі передбачені мутеїни людського IL-2 і антитіла до IL-2, які переважно стимулюють регуляторні Т-клітини (Treg). Використовуваний у даному документі термін "переважно стимулює регуляторні Т-клітини" означає, що мутеїн або антитіло сприяє проліферації, виживанню, активації й/або здійсненню функції CD3+Foxp3+Т-клітин порівняно з CD3+Foxp3-Т-клітинами. Способи вимірювання здатності переважно стимулювати Treg можуть бути виміряні за допомогою проточної цитометрії лейкоцитів периферичної крові, у якій спостерігається підвищення відсоткового вмісту FOXP3+CD4+Т-клітин серед усіх CD4+Т-клітин, підвищення відсоткового вмісту FOXP3+CD8+Т-клітин серед усіх CD8+Т-клітин, підвищення відсоткового вмісту FOXP3+Т-клітин порівняно з NK-клітинами й/або більш високе підвищення рівня експресії CD25 на поверхні FOXP3+Т-клітин порівняно з підвищенням експресії CD25 на інших Т-клітинах. Переважний ріст клітин Treg також може бути виявлений у вигляді підвищеної представленості деметильованої ДНК промотору FOXP3 (тобто Treg-специфічної деметильованої ділянки або TSDR) порівняно з деметильованими генами CD3 у ДНК, виділеній із цільної крові, як виявляється за допомогою секвенування у разі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) продуктів обробленої бісульфітом геномної ДНК (J. Sehouli, et al. 2011. *Epigenetics* 6:2, 236-246). Зокрема, мутеїни IL-2 за даним винаходом характеризуються розширеним вікном Treg:Teff, тобто зберігали високий рівень

Мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки, які переважно стимулюють клітини Treg, призводять до підвищення відношення CD3+Foxp3+T-клітин до CD3+Foxp3-T-клітин у суб'єкта або в зразку периферичної крові на щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 100 %, щонайменше 150 %, щонайменше 200 %, щонайменше 300 %, щонайменше 400 %, щонайменше 500 %, щонайменше 600 %, щонайменше 700 %, щонайменше 800 %, щонайменше 900 % або щонайменше 1000 %.

У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються менше ніж 50 % активації pSTAT ефекторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються менше ніж 40 % активації pSTAT ефекторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються менше ніж 30 % активації pSTAT ефекторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються менше ніж 20 % активації pSTAT ефекторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються менше ніж 10 % активації pSTAT ефекторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки також характеризуються 10-денною стабільністю, що становить більше 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, або 90 %, за використання протоколу із прикладу 2.

У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються більш ніж 30 % активації pSTAT регуляторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються більш ніж 40 % активації pSTAT регуляторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються більш ніж 50 % активації pSTAT регуляторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються більш ніж 60 % активації pSTAT регуляторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки характеризуються більш ніж 70 % активації pSTAT регуляторних Т-клітин у разі обробки 200 нМ IL-2 з використанням протоколу із прикладу 1. У деяких варіантах здійснення

мутеїни IL-2 або їх Fc-злиті білки також характеризуються 10-денною стабільністю, що становить більше 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, або 90 %, за використання протоколу із прикладу 2.

Приклади мутеїнів IL-2 включають без обмеження мутеїни IL-2, що передбачають заміну(заміни) 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; та/або V91S, H16E в амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:2. Мутеїни IL-2 за даним винаходом необов'язково передбачають заміну C125A. Хоча може бути переважним зниження кількості додаткових мутацій у послідовності IL-2 дикого типу, у даному винаході передбачені мутеїни IL-2, що також передбачають усікання й/або додаткові вставки, делеції й/або заміни на додаток до заміни 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; та/або V91S, H16E, за умови, що вказані мутеїни зберігають активність, що переважно імітує Treg. Таким чином, у варіантах здійснення передбачені мутеїни IL-2, які переважно стимулюють клітини Treg і містять амінокислотну послідовність, що передбачає заміну 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; та/або V91S, H16E, і які на щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичні амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:2. В особливо переважних варіантах здійснення такі мутеїни IL-2 містять амінокислотну послідовність, яка на щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентична амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:2.

У випадку амінокислотних послідовностей ідентичність і/або подібність послідовностей визначають із застосуванням стандартних методик, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження алгоритм локальної ідентичності послідовностей за Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм вирівнювання ідентичності послідовностей за Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, пошук за методом подібності за Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, комп'ютеризовані реалізації даних алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA в

Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Медисон, штат Вісконсин, США), програму для послідовностей Best Fit, описану в Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, переважно із застосуванням параметрів за замовчуванням, або за допомогою перегляду. Переважно відсоток ідентичності розраховують за допомогою FastDB на підставі наступних параметрів: штраф за розбіжність 1; штраф за введення гена 1; штраф за продовження гена 0,33 і штраф за зв'язування 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, " Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Прикладом застосовного алгоритму є PILEUP. За допомогою PILEUP одержують множинне вирівнювання послідовностей на підставі групи споріднених послідовностей із застосуванням послідовних попарних вирівнювань. За його допомогою також можна побудувати дерево, за допомогою якого видні кластеризаційні взаємозв'язки, використовувані для створення вирівнювання. PILEUP використовує спрощення методу послідовного вирівнювання Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; спосіб подібний тому, який описаний в HlgGins and Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Застосовні параметри PILEUP включають стандартний штраф за введення гена 3,00, стандартний штраф за подовження гена 0,10 і оцінювані кінцеві гени.

Іншим прикладом застосовного алгоритму є алгоритм BLAST, описаний в Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; і Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особливо застосовною програмою BLAST є програма WU-BLAST-2, яка була створена Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 використовують декілька параметрів пошуку, для більшості з яких установлені значення за замовчуванням. Параметри, що коригуються, встановлені з наступними значеннями: довжина перекривання = 1, частка перекривання = 0,125, гранична довжина слова (T) = 11. Параметри HSP S і HSP S2 є динамічними значеннями й установлюються самою програмою залежно від складу конкретної послідовності й складу конкретної бази даних, за якої проводиться пошук послідовності, що становить інтерес; при цьому дані значення можуть бути скориговані для підвищення чутливості.

Додатковим застосовним алгоритмом є BLAST із уведенням генів, про який повідомляється в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. У BLAST із уведенням генів використовують показники заміни з BLOSUM-62; граничний параметр T встановлений на 9; метод двох хітів для запуску подовжень без уведення генів задає подовженню гена k значення $10+k$; X_u встановлений на 16, і X_d встановлений на 40 для стадії пошуку в базі даних і 67 для завершальної стадії алгоритмів. Вирівнювання з генами запускаються за допомогою показника, що відповідає приблизно 22 бітам.

Хоча ділянка для введення варіанта амінокислотної послідовності може бути визначена попередньо, саме мутація не потребує попереднього визначення. Наприклад, щоб оптимізувати характеристики мутації в даному сайті, можна провести випадковий мутагенез у кодоні- або ділянці-мішені й провести скринінг експресованого мутеїну IL-2 щодо оптимальної комбінації необхідної активності. Добре відомі методики здійснення мутацій із заміщенням у попередньо заданих сайтах у ДНК із відомою послідовністю, наприклад, мутагенез із праймером M13 і ПЛР-мутагенез. Скринінг мутантів можна проводити, наприклад, із застосуванням аналізів, описаних у даному документі.

Амінокислотні заміни зазвичай являють собою одиночні залишки; вставки зазвичай будуть становити від приблизно одного (1) до приблизно двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча допускаються значно більші вставки. Делеції варіюються від приблизно одного (1) до приблизно двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча в деяких випадках делеції можуть бути набагато більше.

Заміни, делеції, вставки або будь-яка їх комбінація можуть бути використані для одержання кінцевого похідного або варіанта. Як правило, ці зміни здійснюються щодо декількох амінокислот для зведення до мінімуму зміни молекули, зокрема, імуногенності й специфічності антигензв'язувального білка. Однак за певних обставин припустимі більші зміни. Консервативні заміни зазвичай виконують згідно з наступною схемою, представленою в таблиці 1.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Ілюстративні заміни
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp

Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Суттєві зміни у функції або імунологічної ідентичності виконують за допомогою вибору менш консервативних замінів, ніж показані в таблиці 1. Наприклад, можуть бути виконані заміни, які більш суттєво впливають на структуру поліпептидного кістяка в ділянці зміни, наприклад, структуру альфа-спіралі або бета-листа; заряд або гідрофобність молекули на ділянці-мішені; або основну частину бічного ланцюга. Заміни, які загалом спричиняють найбільші зміни у властивостях поліпептиду, являють собою ті, в яких (а) гідрофільний залишок, наприклад серил або треоніл, замінений на гідрофобний залишок, наприклад, лейцил, ізолейцил, фенілаланін, валіл або аланіл (або замінений ним); (б) цистеїн або пролін замінений на будь-який інший залишок (або замінений ним); (с) залишок, що містить електропозитивний бічний ланцюг, наприклад, лізил, аргініл або гістидил, замінений на електронегативний залишок, наприклад, глутаміл або аспартил (або замінений ним); або (д) залишок, що містить об'ємний бічний ланцюг, наприклад, фенілаланін, замінений на залишок, що не містить бічний ланцюг, наприклад, гліцин (або замінений ним).

Варіанти зазвичай характеризуються такою самою якісною біологічною активністю й будуть спричиняти таку саму імунну відповідь, як і аналог, що зустрічається в природі, хоча варіанти також відбирають для модифікації характеристик мутеїну IL-2 за мірою необхідності. Як альтернатива варіант може бути сконструйований таким чином, що біологічна активність мутеїну IL-2 буде змінена. Наприклад, сайти глікозилювання можуть бути змінені або видалені, як обговорюється в даному документі.

Мутеїни IL-2, що характеризуються подовженим періодом напівжиття в сироватці крові

Оскільки мутеїни IL-2, передбачені в даному документі, переважно призводять до підвищення кількості Treg порівняно, наприклад, із клітинами Teff або NK-клітинами, очікується, що профіль безпеки при введенні пацієнтові буде відрізнятися від профілю безпеки IL-2 дикого типу або PROLEUKIN® (алдеслейкін; Novartis, Базель, Швейцарія). Побічні ефекти, асоційовані з IL-2 дикого типу або PROLEUKIN®, включають грипоподібні симптоми, озноб/тремтіння, артралгію, лихоманку, висип, сверблячку, реакції в місці ін'єкції, гіпотензію, діарею, нудоту, тривожність, сплутаність свідомості й депресію. Мутеїни IL-2, передбачені в даному документі, можуть бути змінені для включення або злиття з молекулами, які подовжують період напівжиття мутеїну в сироватці крові без підвищення ризику того, що таке подовження періоду напівжиття призведе до підвищення ймовірності або інтенсивності побічного ефекту або небажаного явища в пацієнта. Підшкірне введення дози такого мутеїну із подовженим періодом напівжиття в сироватці крові може забезпечити тривале охоплення мішені з більш низьким системним максимальним впливом (C_{max}). Подовжений період напівжиття в сироватці крові може забезпечувати більш низький або менш частий режим введення дози мутеїну.

Період напівжиття в сироватці крові мутеїнів IL-2, передбачених у даному документі, може бути подовжений по суті будь-яким способом, відомим з рівня техніки. Такі способи включають зміну послідовності мутеїну IL-2 для включення пептиду, який зв'язується з неонатальним Fc γ -рецептором або зв'язується з білком, що характеризується підвищеним періодом напівжиття в сироватці крові, наприклад, IgG або людським сироватковим альбуміном. В інших варіантах здійснення мутеїн IL-2 злитий з поліпептидом, який забезпечує злитій молекулі подовжений період напівжиття. Такі поліпептиди включають Fc IgG або інші поліпептиди, які зв'язуються з неонатальним Fc γ -рецептором, людським сироватковим альбуміном або поліпептидами, які зв'язуються з білком, що характеризується подовженим періодом напівжиття в сироватці крові. У переважних варіантах здійснення мутеїн IL-2 злитий з молекулою Fc IgG.

Мутеїн IL-2 може бути злитий з N-кінцем або C-кінцем Fc-ділянки IgG. Як показано в прикладах, злиття з C-кінцем Fc-ділянки IgG підтримує активність мутеїну IL-2 більшою мірою, ніж у разі злиття з N-кінцем Fc IgG.

Один варіант здійснення даного винаходу стосується димеру, що містить два Fc-злитих поліпептиди, створені шляхом злиття мутеїну IL-2 з Fc-ділянкою антитіла. Димер можна одержати, наприклад, за допомогою вставки злитого гена, що кодує злитий білок, у відповідний вектор експресії, експресії злитого гена в клітинах-хазяїнах, трансформованих рекомбінантним вектором

експресії, і складання експресованого злитого білка у багато чому подібно молекулам антитіл, після чого між Fc-фрагментами утворюються міжланцюгові зв'язки з утворенням димера.

Термін "поліпептид Fc" або "Fc-ділянка", використовуваний у даному документі, включає нативні й мутейнові форми поліпептидів, одержаних з Fc-ділянки антитіла, і може являти собою частину або злитих білків на основі мутейну IL-2, або антитіл до IL-2 за даним винаходом. Також включені усічені форми таких поліпептидів, що містять шарнірну ділянку, яка сприяє димеризації. У певних варіантах здійснення Fc-ділянка містить домен CH2 і CH3 антитіла. Поряд із подовженим періодом напівжиття в сироватці крові злиті білки, що містять Fc-фрагменти (й олігомери, утворені з них), характеризуються перевагою легкого очищення за допомогою афінної хроматографії порівняно з колонками з білком А або білком G. Переважні Fc-ділянки одержують із IgG людини, який включає IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. У даному документі конкретні залишки в Fc ідентифікуються за положенням. Усі положення Fc засновані на схемі нумерації згідно EU.

Одна з функцій Fc-ділянки антитіла полягає в тому, щоб повідомляти імунну систему у випадку, якщо антитіло зв'язується зі своєю мішенню. Вона вважається "ефекторною функцією". Взаємодія призводить до антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC), антитілозалежного клітинного фагоцитозу (ADCP) і/або комплементзалежної цитотоксичності (CDC). ADCC і ADCP опосередковуються зв'язуванням Fc з Fc-рецепторами на поверхні клітин імунної системи. CDC опосередковується за допомогою зв'язування Fc з білками системи комплементу, наприклад C1q.

Підкласи IgG відрізняються за своєю здатністю опосередковувати ефекторні функції. Наприклад, IgG1 набагато перевершує IgG2 і IgG4 в опосередкуванні ADCC і CDC. Таким чином, у варіантах здійснення, в яких ефекторна функція є небажаною, переважним є Fc IgG2. Однак відомо, що молекули, які містять Fc IgG2, є більш складні у виготовленні й характеризуються менш привабливими біофізичними властивостями, такими як більш короткий період напівжиття, порівняно з молекулами, що містять Fc IgG1.

Ефекторна функція антитіла може бути підвищена або знижена за допомогою введення однієї або декількох мутацій в Fc. У варіантах здійснення даного винаходу передбачені молекули на основі мутейну IL-2 і Fc-злитого білка, що містять Fc, сконструйований для посилення ефекторної функції (U.S. 7317091 і Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; обидва включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті). Ілюстративні молекули Fc IgG1, що характеризуються підвищеною ефекторною функцією, включають молекули з наступними замінами: 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; та/або K290N/S298G/T299A/K326E.

Інший спосіб підвищення ефекторної функції білків, що містять Fc IgG, полягає в зниженні фукозилювання Fc. Видалення ядра фукози з олігосахаридів типу біантенарних комплексів, приєднаних до Fc, привело до значного підвищення ефекторної функції у вигляді ADCC без зміни зв'язування антигену або у вигляді ефекторної функції CDC. Відомо декілька способів зниження або усунення фукозилювання молекул, що містять Fc, наприклад, антитіл. Вони включають рекомбінантну експресію в певних клітинних лініях ссавців, у тому числі лінії клітин з нокаутом FUT8, варіантної лінії CHO Lec13, лінії клітин гібридами пацюка YB2/0, лінії клітин, що містять малу інтерферувальну РНК, специфічно спрямовану на ген FUT8, і лінії клітин, що коекспресують β-1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферазу III і α-манозидазу Гольджи II. Як альтернатива молекула, що містить Fc, може експресуватися в клітині, відмінній від клітини ссавця, наприклад, у рослинній клітині, клітині дріжджів або прокаріотичній клітині, наприклад, E. coli.

У певних варіантах здійснення молекули на основі мутейну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 за даним винаходом містять Fc, сконструйований для зниження ефекторної функції. Ілюстративні молекули Fc, що характеризуються зниженою ефекторною функцією, включають молекули з наступними замінами: N297A або N297Q (IgG1); L234A/L235A (IgG1); V234A/G237A (IgG2); L235A/G237A/E318A (IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1); L234F/L235E/P331S (IgG1); та/або S267E/L328F (IgG1).

Відомо, що IgG1 людини містить сайт глікозилювання в N297 (система нумерації згідно з EU), і глікозилювання сприяє ефекторній функції антитіла на основі IgG1.

Ілюстративна послідовність IgG1 представлена під 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

Групи мутували в N297 у разі спроби одержання аглікозильованих антитіл. Мутації зосереджували на заміні N297 амінокислотами, які нагадують аспарагін за фізико-хімічною природою, такими як глутамін (N297Q) або аланін (N297A), який імітує аспарагіни без полярних груп.

Використовуваний у даному документі термін "аглікозильоване антитіло" або "аглікозильований Fc" стосується статусу глікозильовання залишку в положенні 297 Fc. Антитіло або інша молекула можуть характеризуватися глікозильованням в одному або декількох інших положеннях, але однаково можуть вважатися аглікозильованим антитілом або аглікозильованим Fc-злитим білком.

У разі спроби створення ефекторно нефункціонального Fc IgG1 було виявлено, що мутація амінокислоти N297 IgG1 людини в гліцин, тобто N297G, забезпечує набагато більш високу ефективність очищення й біофізичні властивості порівняно з іншими амінокислотними замінами цього залишку. Див. приклад 8. Таким чином, у переважних варіантах здійснення молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка містить Fc IgG1 людини, що містить заміну N297G. Fc, що містить заміну N297G, є застосовним у будь-якому контексті, в якому молекула містить Fc IgG1 людини, і не обмежується застосуванням у контексті молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка. У певних варіантах здійснення антитіло містить Fc, що містить заміну N297G.

Fc, що містить Fc IgG1 людини, що містить мутацію N297G, може також передбачати додаткові вставки, делеції й заміни. У певних варіантах здійснення Fc IgG1 людини містить заміну N297G і ідентичний на щонайменше 90 %, ідентичний на щонайменше 91 %, ідентичний на щонайменше 92 %, ідентичний на щонайменше 93 %, ідентичний на щонайменше 94 %, ідентичний на щонайменше 95 %, ідентичний на щонайменше 96 %, ідентичний на щонайменше 97 %, ідентичний на щонайменше 98 % або ідентичний на щонайменше 99 % амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:3. В особливо переважному варіанті здійснення С-кінцевий залишок лізину замінений або видалений. Амінокислотна послідовність IgG1 людини, що передбачає заміну N297G і делецію С-кінцевого лізину, викладена під SEQ ID NO:4.

Було показано, що аглікозильовані молекули, що містять Fc IgG1, є менш стабільними, ніж глікозильовані молекули, що містять Fc IgG1. Fc-ділянка може бути додатково сконструйована для підвищення стабільності аглікозильованої молекули. У деяких варіантах здійснення одна або декілька амінокислот замінені на цистеїн з утворенням дисульфідних зв'язків у димерному стані. Залишки V259, A287, R292, V302, L306, V323 або I332 амінокислотної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:3, можуть бути замінені цистеїном. У переважних варіантах здійснення певні пари залишків є заміщеними, так що вони переважно утворюють дисульфідний зв'язок один з одним, у такий спосіб обмежуючи або попереджаючи скремблювання дисульфідних зв'язків. Переважні пари включають без обмеження A287C і L306C, V259C і L306C, R292C і V302C, а також V323C і I332C.

У даному документі передбачені Fc-вмісні молекули, в яких один або декілька залишків V259, A287, R292, V302, L306, V323 або I332 замінені цистеїном, приклади яких включають залишки, що містять A287C і L306C, V259C і L306C, R292C і V302C, або заміни V323C і I332C.

Додаткові мутації, які можуть бути внесені в Fc IgG1, включають мутації, що полегшують утворення гетеродимера серед Fc-вмісних поліпептидів. У деяких варіантах здійснення Fc-ділянка сконструйована для створення "виступів" і "западин", які полегшують утворення гетеродимера із двох різних Fc-вмісних поліпептидних ланцюгів у разі коекспресії в клітині. U.S. 7695963. В інших варіантах здійснення Fc-ділянка змінена для використання електростатичної взаємодії з метою стимулювання утворення гетеродимера, у той же час перешкоджаючи утворенню гомодимера двох різних Fc-вмісних поліпептидів у разі коекспресії в клітині. WO 09/089004, яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Переважні гетеродимерні Fc включають ті, в яких один ланцюг Fc містить заміни D399K і E356K, а інший ланцюг Fc містить заміни K409D і K392D. В інших варіантах здійснення один ланцюг Fc містить заміни D399K, E356K і E357K, а інший ланцюг Fc містить заміни K409D, K392D і K370D.

У певних варіантах здійснення може бути переважним, щоб молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка була мономерною, тобто містила тільки одну молекулу мутеїну IL-2. Аналогічно може знадобитися бі-, три- або тетраспецифічне антитіло, яке може специфічно зв'язуватися з однією або декількома додатковими мішенями. У таких варіантах здійснення Fc-ділянка злитого білка або антитіла може містити одну або декілька мутацій, які полегшують утворення гетеродимера. Злитий білок або антитіло коекспресуються з Fc-ділянкою, що містить реципрокні мутації порівняно з мутаціями в молекулі на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого поліпептиду, але що не містить мутеїн IL-2 або варіабельного домена важкого ланцюга антитіла до IL-2. У разі утворення гетеродимера двох Fc-вмісних поліпептидів, одержаний білок містить тільки один мутеїн IL-2 або домен, що зв'язує антитіло до IL-2.

Інший спосіб створення мономерної молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка полягає в злитті мутеїну IL-2 з мономерним Fc, тобто Fc-ділянкою, яка не димеризується. Стабільні мономерні Fc містять мутації, які попереджають димеризацію й стабілізують молекулу в мономерній формі. Переважні мономерні Fc розкриті в WO 2011/063348, яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій повноті. У певних варіантах здійснення молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка містять Fc, що містить негативно заряджені амінокислоти в положеннях 392 і 409, разом із заміною треоніну в положеннях Y349, L351, L368, V397, L398, F405 або Y407.

У певних варіантах здійснення молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка містить лінкер між Fc і мутеїном IL-2. З рівня техніки відома безліч різних лінкерних поліпептидів, які можна застосовувати в контексті молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка. У переважних варіантах здійснення молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка містить одну або декілька копій пептиду, що складається з GGGGS (SEQ ID NO:5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7) між Fc і мутеїном IL-2. У деяких варіантах здійснення поліпептидна ділянка між Fc-ділянкою й ділянкою мутеїну IL-2 містить одну копію GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7). Як показано в даному документі, лінкери GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7) глікозильовуються у разі експресії у відповідних клітинах, і таке глікозильовання може сприяти стабілізації білка в розчині й/або під час введення *in vivo*. Таким чином, у певних варіантах здійснення злитий білок на основі мутеїну IL-2 містить глікозильований лінкер між Fc-ділянкою й ділянкою мутеїну IL-2.

Передбачається, що глікозильований лінкер може бути застосований, коли його поміщають у контекст поліпептиду. У даному документі передбачені поліпептиди, що містять GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7), вставлені в амінокислотну послідовність поліпептиду або замінено однієї або декількома амінокислотами в амінокислотній послідовності поліпептиду. У переважних варіантах здійснення GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7) вставлені в петлю третинної структури поліпептиду. В інших варіантах здійснення одна або декілька амінокислот у петлі замінені на GGNGT (SEQ ID NO: 6) або YGNGT (SEQ ID NO: 7).

С-кінцева ділянка Fc і/або амінокінцева ділянка мутеїну IL-2 може містити одну або декілька мутацій, які призводять до зміни профілю глікозильовання молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка у разі експресії в клітинах ссавців. У певних варіантах здійснення мутеїн IL-2

додатково містить заміну Т3, наприклад, Т3N або Т3А. Мутеїн IL-2 може додатково містити мутацію S5, таку як S5T.

Ковалентні модифікації мутеїну IL-2 і молекул на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка й антитіл до IL-2 включені в обсяг даного винаходу й, як правило, але не завжди, здійснюються посттрансляційно. Наприклад, декілька типів ковалентних модифікацій уводять у молекулу шляхом проведення реакції між певними амінокислотними залишками й органічним дериватизуючим засобом, який здатний вступати в реакцію з певними бічними ланцюгами N- або C-кінцевих залишків.

Цистеїнільні залишки найчастіше реагують із α -галогенацетатами (і відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, з утворенням карбоксиметильних або карбоксиамідометильних похідних. Цистеїнільні залишки піддають дериватизації за допомогою реакції із бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-імідозол)пропіоновою кислотою, хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїмідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил-2-піридилдисульфідом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом.

Гістидильні залишки дериватизують за допомогою реакції з діетилпірокарбонатом за pH 5,5-7,0, оскільки даний засіб є порівняно специфічним для бічного ланцюга гістиду. Також застосовним є пара-бромфенацилбромід; реакцію переважно проводять у 0,1 М какодилату натрію за pH 6,0.

Лізинільні і амінокінцеві залишки піддають реакції з ангітридами бурштинової або інших карбонових кислот. Дериватизація цими засобами має ефект зміни заряду лізинільних залишків на протилежний. Інші придатні реагенти для дериватизації залишків, що містять альфа-аміногрупу, включають імідоестери, такі як метилпіколімінат; піридоксальфосфат; піридоксаль; хлорборогідрид; тринітробензолсульфокислоту; O-метилізосечовину; 2,4-пентандіон і гліоксилат у реакції, що каталізується трансаміназою.

Аргінільні залишки модифікують за допомогою реакції з одним або декількома традиційними реагентами, серед яких фенілгліоксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон і нінгідрин. Для дериватизації аргінільних залишків потрібно, щоб реакцію проводили в лужних умовах через високий pK_a функціональної групи гуанідину. Крім того, ці реагенти можуть вступати в реакцію із групами лізину, а також з епсилон-аміногрупою аргініну.

Можна проводити специфічну модифікацію тирозильних залишків, при цьому особливий інтерес становить введення спектральних міток у тирозильні залишки за допомогою реакції з ароматичними сполуками діазонію або з тетранітрометаном. Для утворення O-ацетилтирозильних сполук і 3-нітропохідних найчастіше застосовують N-ацетилімідизол і тетранітрометан відповідно. Тирозильні залишки йодують із використанням ^{125}I або ^{131}I для одержання мічених білків для застосування в радіоімунаналізі, при цьому є придатним описаний вище спосіб із хлораміном Т.

Карбоксильні бічні групи (аспартил або глутаміл) селективно модифікують за допомогою реакції з карбодіімідами ($R-N=C=N-R'$), де R і R' необов'язково являють собою різні алкільні групи, такими як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил)карбодіімід або 1-етил-3-(4-азоній-4,4-диметилпентил)карбодіімід. Крім того, аспартильні та глутамільні залишки перетворюють на аспарагінільні та глутамінільні залишки за допомогою реакції з іонами амонію.

Дериватизація за допомогою біфункціональних засобів застосовна для зшивання антигензв'язувальних білків з нерозчинною у воді матрицею-підкладкою або поверхнею для застосування в різних способах. Зазвичай використовувані зшивальні засоби включають, наприклад, естери 1,1-біс(діазацетил)-2-фенілетану, глутаральдегіду, N-гідроксисукциніміду, наприклад, естери 4-азидосаліцилової кислоти, гомобіфункціональні імідоестери, включаючи дисукцинімідильні естери, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат) і біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан. Дериватизуючі засоби, такі як метил-3-[(п-азидофеніл)дитіо]пропіоїмідат, утворюють проміжні сполуки, що активуються світлом, які здатні утворювати поперечні зв'язки за наявності світла. Альтернативно для іммобілізації білків застосовують реакційноздатні водонерозчинні матриці, такі як вуглеводи, що активуються ціаногенбромідом, і реакційноздатні субстрати, описані в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 і 4330440.

Глутамінільні та аспарагінільні залишки часто дезамідують до відповідних глутамільних та аспартильних залишків відповідно. Як альтернатива ці залишки дезамідують у слабкокислих умовах. Будь-яка форма цих залишків знаходиться в межах обсягу даного винаходу.

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

Інший тип ковалентної модифікації мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2, включених в обсяг даного винаходу, передбачає зміну профілю глікозилювання білка. Як відомо з рівня техніки, профілі глікозилювання можуть залежати як від

послідовності білка (наприклад, від наявності або відсутності конкретних амінокислотних залишків для глікозилювання, обговорюваних нижче), так і від клітини-хазяїна або організму, у яких продукується білок. Конкретні системи експресії обговорюються нижче.

Глікозилювання поліпептидів зазвичай є або N-зв'язаним, або O-зв'язаним. N-зв'язане належить до приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагінового залишку. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X являє собою будь-яку амінокислоту, за винятком проліну, являють собою послідовності розпізнавання для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, наявність будь-якої з цих трипептидних послідовностей у поліпептиді створює потенційний сайт глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання стосується приєднання одного із цукрів – N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози – гідроксамінокислоти, найчастіше серину або треоніну, хоча також можливе використання 5-гідроксипроліну або 5-гідроксилізіну.

Додавання сайтів глікозилювання до мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 можна зручно здійснювати за допомогою зміни амінокислотної послідовності таким чином, щоб вона містила одну або декілька описаних вище трипептидних послідовностей (для сайтів N-зв'язаного глікозилювання). Зміна також може бути здійснена шляхом додавання одного або декількох серинових або треонінових залишків до вихідної послідовності або заміни на них (у випадку сайтів O-зв'язаного глікозилювання). Для зручності амінокислотну послідовність мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 переважно змінюють за допомогою змін на рівні ДНК, зокрема, за допомогою мутації ДНК, що кодує цільовий поліпептид, у попередньо вибраних основах таким чином, що утворюються кодони, які будуть транслюватися в необхідні амінокислоти.

Іншим засобом підвищення кількості вуглеводних фрагментів у мутеїні IL-2, молекулі на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 є хімічне або ферментативне зв'язування глікозидів з білком. Ці процедури є переважними з тієї причини, що вони не потребують продукування білка в клітині-хазяїні, яка має здатності до глікозилювання для забезпечення N- і O-зв'язаного глікозилювання. Залежно від використовуваного виду зв'язування цукор(цукри) може(можуть) бути приєднаний(приєднані) до (а) аргініну і гістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, як наприклад, до груп цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, як наприклад, до груп серину, треоніну або гідроксипроліну, (e) ароматичних залишків, як наприклад, до залишків фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (f) амідної групи глутаміну. Ці способи описані в WO 87/05330, опублікованій 11 вересня 1987 року, і в Apelin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Видалення вуглеводних фрагментів, присутніх у вихідному мутеїні IL-2, молекулі на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2, можна здійснювати хімічним або ферментативним способом. Хімічне деглікозилювання потребує впливу на білок сполуки, що являє собою трифторметансульфонову кислоту, або еквівалентної сполуки. Така обробка зумовлює відщеплення більшості або всіх цукрів, за винятком зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозаміну або N-ацетилгалактозаміну), тоді як поліпептид залишається інтактним. Хімічне деглікозилювання описане в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, і Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативне розщеплення вуглеводних фрагментів на поліпептиди може бути досягнуто шляхом застосування низки ендо- та екzogлікозидаз, як описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Глікозилюванню у потенційних сайтах глікозилювання можна запобігти шляхом застосування сполуки тунікаміцину, як описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Тунікаміцин блокує утворення N-глікозидних зв'язків із білком.

Інший тип ковалентної модифікації мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 передбачає зв'язування білка з різними небілковими полімерами, включаючи без обмеження різні полііоли, такі як поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь або поліоксисилікени, як зазначено в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337. Крім того, амінокислотні заміни можуть бути виконані в різних положеннях мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2 для полегшення додавання полімерів, таких як PEG. Таким чином, у варіантах здійснення даного винаходу передбачені пегільований мутеїн IL-2, молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2. Такі пегільовані білки можуть характеризуватися підвищеним періодом напівжиття й/або зниженою імуногенністю порівняно з їх непегільованими формами.

Полінуклеотиди, що кодують мутеїни IL-2 і молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка

В обсяг даного винаходу входять нуклеїнові кислоти, що кодують мутеїни IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2. В аспектах даного винаходу передбачені варіанти полінуклеотидів (наприклад, внаслідок виродження), які кодують амінокислотні послідовності, описані в даному документі.

Нуклеотидні послідовності, що відповідають амінокислотним послідовностям, описаним у даному документі, для застосування як зондів або праймерів для виділення нуклеїнових кислот або як пошукових послідовностей для пошуку в базі даних, можуть бути одержані за допомогою

"зворотної трансляції" із амінокислотних послідовностей. Добре відому процедуру полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) можна використовувати для виділення й ампліфікації послідовності ДНК, що кодує мутеїни IL-2 і молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка. Олігонуклеотиди, які визначають необхідні кінці комбінації фрагментів ДНК, використовують як 5'- і 3'-праймерів. Олігонуклеотиди можуть додатково містити сайти розпізнавання рестрикційних ендонуклеаз для полегшення вставки ампліфікованої комбінації фрагментів ДНК у вектор експресії. Методики ПЛР описані в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; і *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом включають ДНК та РНК як в одноланцюговій, так і у дволанцюговій формі, а також відповідні комплементарні послідовності. Термін "виділена нуклеїнова кислота" являє собою нуклеїнову кислоту, яка була відділена від суміжних генетичних послідовностей, присутніх у геномі організму, з якого нуклеїнова кислота була виділена, у випадку нуклеїнових кислот, виділених із джерел, що зустрічаються в природі. У випадку нуклеїнових кислот, синтезованих ферментативно з матриці або хімічно, таких як продукти ПЛР, молекули кДНК або, наприклад, олігонуклеотиди, зрозуміло, що нуклеїнові кислоти, що утворюються в результаті таких процесів, являють собою виділені нуклеїнові кислоти. Виділена молекула нуклеїнової кислоти стосується молекули нуклеїнової кислоти у вигляді окремого фрагмента або як компонента більшої конструкції нуклеїнової кислоти. В одному переважному варіанті здійснення винаходу нуклеїнові кислоти фактично не містять забруднювальний ендегенний матеріал. Молекулу нуклеїнової кислоти переважно одержують із ДНК або РНК, виділеної щонайменше один раз, фактично в чистій формі та у кількості або концентрації, що дають можливість ідентифікувати, маніпулювати та відновлювати нуклеотидні послідовності, з яких вона складається, за допомогою стандартних біохімічних способів (таких, як описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такі послідовності переважно надаються та/або сконструйовані у вигляді відкритої рамки зчитування, що не переривається внутрішніми нетрансльованими послідовностями або інтронами, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованої ДНК можуть бути представлені 5'- або 3'-кінцями з відкритої рамки зчитування, де те саме не заважає маніпуляції або експресії кодувальної ділянки.

Мутеїни IL-2 згідно з даним винаходом зазвичай одержують за допомогою сайт-специфічного мутагенезу нуклеотидів у ДНК, що кодує мутеїн IL-2 або молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, із застосуванням касетного або ПЛР-мутагенезу або інших методик, широко відомих з рівня техніки, для одержання ДНК, що кодує варіант, і наступної експресії рекомбінантної ДНК у культурі клітин, як описано в даному документі. Однак мутеїни IL-2 і молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка можуть бути одержані за допомогою синтезу *in vitro* із застосуванням загальноприйнятих методик. Варіанти зазвичай демонструють ту саму якісну біологічну активність, що й аналог, який зустрічається в природі, наприклад, експансію Treg, хоча також можуть бути вибрані варіанти, які характеризуються модифікованими характеристиками, як буде більш докладно описано нижче.

Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, внаслідок виродженості генетичного коду кожний мутеїн IL-2, молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка й антитіло до IL-2 за даним винаходом кодуються вкрай великою кількістю нуклеїнових кислот, кожна з яких входить в обсяг даного винаходу й може бути одержана із застосуванням стандартних методик. Таким чином, ідентифікував конкретну амінокислотну послідовність, фахівці в даній галузі можуть одержати будь-яку кількість різних нуклеїнових кислот за допомогою простої модифікації послідовності одного або декількох кодонів таким шляхом, який не приводить до зміни амінокислотної послідовності кодованого білка.

Даний винахід також стосується систем і конструкцій експресії у формі плазмід, векторів експресії, транскрипційних або експресійних касет, які містять щонайменше один полінуклеотид, як зазначено вище. Крім того, даний винахід стосується клітин-хазяїнів, що містять такі системи або конструкції експресії.

Як правило, експресійні вектори, які використовуються в будь-якій з клітин-хазяїнів, містять послідовності для підтримки плазмід, а також для клонування і експресії екзогенних нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, що узагальнено називаються "фланкувальними послідовностями", в деяких варіантах здійснення, як правило, містять одну або декілька з наступних нуклеотидних послідовностей: промотор, одну або декілька енхансерних послідовностей, точку початку реплікації, послідовність термінації транскрипції, повну інтронну послідовність, що містить донорну та акцепторну ділянки сплайсингу, послідовність, яка кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, ділянку зв'язування рибосоми, послідовність поліаденілювання, полілінкерну ділянку для вставки нуклеїнової кислоти, що кодує призначений для експресії поліпептид, та елемент маркера селекції. Кожна із цих послідовностей обговорюється нижче.

Необов'язково вектор може містити послідовність, що кодує "мітку", тобто олігонуклеотидну молекулу, розташовану на 5'- або 3'-кінці послідовності, що кодує, мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2; олігонуклеотидна послідовність кодує polyHis (таку як hexaHis (SEQ ID NO: 21)) або іншу "мітку", таку як FLAG, HA (гемаглютинін вірусу грипу) або тус, до яких існують комерційно доступні антитіла. Як правило, ця мітка злита з поліпептидом під час експресії поліпептиду, та вона може служити як засіб для афінного очищення або виявлення його із клітини-хазяїна. Афінне очищення можна здійснювати, наприклад, за допомогою колонкової хроматографії з використанням антитіл до мітки як афінної матриці. Необов'язково, потім мітка може бути видалена із застосуванням різних способів, таких як застосування певних пептидаз для розщеплення.

Фланкувальні послідовності можуть бути гомологічними (тобто з того самого виду і/або штаму, що й клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто з виду, відмінного від виду і/або штаму клітини-хазяїна), гібридними (тобто комбінація фланкувальних послідовностей більше ніж з одного джерела), синтетичними або нативними. У зв'язку з цим, джерелом фланкувальної послідовності може бути будь-який прокаріотичний або еукаріотичний організм, будь-який організм хребетних або безхребетних, або будь-яка рослина, за умови, що ця фланкувальна послідовність є функціональною в апараті клітини-хазяїна і може активуватися ним.

Фланкувальні послідовності, застосовувані у векторах за даним винаходом, можна одержати будь-яким з декількох способів, добре відомих з рівня техніки. Як правило, фланкувальні послідовності, які застосовуються в даному документі, були попередньо ідентифіковані за допомогою картування та/або розщеплення рестрикційними ендонуклеазами, а отже можуть бути виділені з відповідного тканинного джерела з використанням придатних рестрикційних ендонуклеаз. У деяких випадках може бути відома повна нуклеотидна послідовність фланкувальної послідовності. У цьому випадку фланкувальна послідовність може бути синтезована за допомогою описаних у даному документі способів для синтезу та клонування нуклеїнових кислот.

Незалежно від того, відома вся або тільки частина фланкувальної послідовності, її можна одержати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та/або у разі скринінгу геномної бібліотеки за допомогою придатного зонда, такого як олігонуклеотид та/або фрагмент фланкувальної послідовності з того самого або іншого виду. Якщо фланкувальна послідовність невідома, то фрагмент ДНК, що містить фланкувальну послідовність, можна виділити з більшої ділянки ДНК, яка може містити, наприклад, кодувальну послідовність, або навіть інший ген або гени. Виділення може бути виконане за допомогою розщеплення рестрикційною ендонуклеазою з одержанням належного фрагмента ДНК з подальшим виділенням із застосуванням очищення на агарозному гелі, хроматографії на колонці Qiagen® (Чатсворт, Каліфорнія) або інших способів, відомих фахівцю в даній галузі. Вибір придатних ферментів для виконання цього завдання буде абсолютним очевидним фахівцям в даній галузі.

Як правило, точка початку реплікації є частиною придбаних на комерційній основі прокаріотичних експресійних векторів та сприяє ампліфікації вектора в клітині-хазяїні. Якщо вибраний вектор не містить точку початку реплікації, то її можна хімічно синтезувати на основі відомої послідовності та лігувати у вектор. Наприклад, точка початку реплікації із плазмиди pBR322 (New England Biolabs, Беверлі, Массачусетс) придатна для більшості грамнегативних бактерій, та різні вірусні точки початку реплікації (наприклад, SV40, вірус полііоми, аденовірус, вірус везикулярного стоматиту (VSV) або папіломавіруси, такі як HPV або BPV) придатні для клонування векторів у клітинах ссавців. У цілому, компонент точки початку реплікації необов'язковий в експресійних векторах ссавців (наприклад, точка SV40 часто використовується тільки тому, що вона також містить ранній вірусний промотор).

Як правило, послідовність термінації транскрипції розташована в 3'-положенні відносно кінця ділянки, що кодує поліпептид, і слугує для термінації транскрипції. Зазвичай послідовність термінації транскрипції в прокаріотичних клітинах являє собою фрагмент, багатий на G-C, за яким іде послідовність полі-Т. Хоча цю послідовність легко клонувати з бібліотеки або навіть придбати в комерційних джерелах як частину вектора, її також можна легко синтезувати із застосуванням методів синтезу нуклеїнових кислот, які наведені в даному документі.

Ген маркера селекції кодує білок, необхідний для виживання і росту клітини-хазяїна, яка росте в селективному середовищі для культивування. Типові гени маркерів селекції кодують білки, які (а) надають стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину прокаріотів клітин-хазяїнів; (b) доповнюють ауксотрофні недоліки клітини; або (c) забезпечують необхідними поживними речовинами, недоступними в складних середовищах або середовищах певного складу. Конкретними маркерами селекції є ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну та ген стійкості до тетрацикліну. Переважно, може також використовуватися ген стійкості до неоміцину для селекції як у прокаріотичних, так і в еукаріотичних клітинах-хазяїнах.

Для ампліфікації гена, призначеного для експресії, можна використовувати інші гени селекції. Ампліфікація являє собою процес, за якого гени, необхідні для продукування білка, вкрай важливого для росту або виживання клітин, повторюються послідовно в хромосомах наступних

покоління рекомбінантних клітин. Приклади придатних маркерів селекції для клітин ссавців включають дигідрофолатредуктазу (DHFR) та гени тимідинкінази, що не містять промоторів. Трансформанти клітин ссавців поміщають в умови селекційного тиску, в яких тільки трансформанти однозначно здатні до виживання завдяки гену селекції, що присутній у векторі. Тиск відбору встановлюють за допомогою культивування трансформованих клітин в умовах, за яких концентрація засобу для відбору в середовищі послідовно збільшується, приводячи тим самим до ампліфікації як гена селекції, й отже, так і гена, який кодує необхідний поліпептид, такий як мутеїн IL-2, молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або важкий й/або легкий ланцюг антитіла до IL-2. У результаті з ампліфікованої ДНК синтезується підвищена кількість поліпептиду.

Сайт зв'язування рибосоми зазвичай необхідний для ініціації трансляції mRNA та характеризується наявністю послідовності Шайна-Дальгарно (прокаріоти) або послідовності Козак (еукаріоти). Як правило, цей елемент розташований в напрямку 3'-кінця щодо промотора та 5'-кінця щодо кодувальної послідовності поліпептиду, який підлягає експресії. У певних варіантах здійснення одна або декілька кодувальних ділянок можуть бути функціонально пов'язані із внутрішнім сайтом зв'язування рибосом (IRES), що дає можливість переносити дві відкриті рамки зчитування з одиничного транскрипту РНК.

У деяких випадках, таких, в яких глікозилювання є бажаним в системі експресії еукаріотичної клітини-хазяїна, для поліпшення глікозилювання або виходу можуть бути використані різні передпослідовності або пропослідовності. Наприклад, можна змінювати сайт розщеплення пептидазами конкретного сигнального пептида або додавати пропослідовності, які також можуть впливати на глікозилювання. Кінцевий білковий продукт може мати в положенні -1 (щодо першої амінокислоти зрілого білка) одну або декілька додаткових амінокислот, характерних для експресії, які не можуть бути повністю видалені. Наприклад, кінцевий білковий продукт може містити один або декілька амінокислотних залишків, що знаходяться у сайті розщеплення пептидазами, приєднаних до аміно-кінця. В альтернативному варіанті, застосування деяких сайтів ферментативного розщеплення може призводити до отримання злегка вкороченої форми бажаного поліпептиду, якщо в цій ділянці всередині зрілого поліпептиду відбувається ферментативне розщеплення.

Вектори експресії й клонування за даним винаходом зазвичай містять промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і функціонально пов'язаний з молекулою, що кодує мутеїн IL-2, молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або важкий й/або легкий ланцюг антитіла до IL-2. Промотори являють собою нетранскрибовані послідовності, розташовані вище стартового кодону (тобто у 5'-напрямку) структурного гена (загалом, у межах від приблизно 100 до 1000 п. о.), які регулюють транскрипцію структурного гена. Традиційно промотори підрозділяють на два класи: індукцйбельні промотори та конститутивні промотори. Індукцйбельні промотори ініціюють підвищені рівні транскрипції із ДНК, що знаходиться під їхнім керуванням, у відповідь на деякі зміни в умовах культивування, такі як присутність або відсутність поживних речовин або зміна температури. З іншого боку, конститутивні промотори рівномірно транскрибують ген, з яким вони функціонально пов'язані, тобто відбувається незначний контроль експресії гена або він відсутній. Добре відомо велика кількість промоторів, розпізнаваних різними потенційними клітинами-хазяїнами.

Придатні промотори для застосування з дріжджовими клітинами-хазяїнами також добре відомі з рівня техніки. Дріжджові енхансери переважно використовують із дріжджовими промоторами. Придатні промотори для застосування з клітинами-хазяїнами ссавців добре відомі і включають без обмеження промотори, одержані з геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи курей, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровіруси, вірус гепатиту В і вірус мавп 40 (SV40). Інші придатні промотори ссавців включають гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори теплового шоку та промотор актину.

Додаткові промотори, які можуть становити інтерес, включають без обмеження Ранній промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); промотор, що втримується в 3'-кінцевому довгому повторі вірусу саркоми Рауса (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); промотор тимідинкінази вірусу герпесу (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промоторні й регуляторні послідовності з гена металотіоніну, Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42), і прокаріотичні промотори, такі як промотор бета-лактамази (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) або промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Також становлять інтерес наступні транскрипційні регуляторні ділянки тварин, які демонструють тканинну специфічність та застосовувалися в трансгенних тварин: регуляторна ділянка гена еластази I, активна в ацинарних клітинах підшлункової залози (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); регуляторна ділянка гена інсуліну, активна в бета-клітинах підшлункової залози (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); регуляторна ділянка гена імуноглобуліну, активна в лімфоїдних клітинах (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al.,

1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); регуляторна ділянка вірусу пухлини молочної залози миші, яка активна в клітинах яєчка, молочної залози, лімфоїдних і гладких клітинах (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); регуляторна ділянка гена альбуміну, яка активна в печінці (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); регуляторна ділянка гена альфа-фетопротейну, яка активна в печінці (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); регуляторна ділянка гена альфа-1-антитрипсину, яка активна в печінці (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); регуляторна ділянка гена бета-глобіну, активна в мієлоїдних клітинах (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); регуляторна ділянка гена основного білка мієліну, активна в олігодендроцитах у головному мозку (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); регуляторна ділянка гена легкого ланцюга-2 міозину, активна в кісткових м'язах (Sanj, 1985, *Nature* 314:283-286); і регуляторна ділянка гена гонадотропного рилізінг-гормону, активна в гіпоталамусі (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Енхансерну послідовність можна вставляти у вектор для підвищення транскрипції ДНК у вищих еукаріот. Енхансери являють собою цис-діючі елементи ДНК довжиною зазвичай приблизно 10-300 п. о., які впливають на промотор для підвищення транскрипції. Енхансери є відносно орієнтаційно та позиційно незалежними та можуть перебувати в положеннях як 5', так і 3' щодо транскрипційної одиниці. Відомо декілька енхансерних послідовностей, доступних з генів ссавців (наприклад, глобін, еластаза, альбумін, альфа-фетопротейн і інсулін). Як правило, зазвичай застосовують енхансер з вірусу. Відомі з рівня техніки енхансер SV40, енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми та енхансер аденовірусу є ілюстративними енхансерними елементами для активації еукаріотичних промоторів. Хоча енхансер може перебувати у векторі як з 5'-, так і з 3'-кінця щодо кодувальної послідовності, як правило, він розташований з 5'-кінця від промотора. Послідовність, що кодує відповідну нативну або гетерологічну сигнальну послідовність (лідерну послідовність або сигнальний пептид), може бути вбудована у вектор експресії для стимуляції позаклітинної секреції мутеїну IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або важкого й/або легкого ланцюга антитіла до IL-2. Вибір сигнального пептиду або лідерної послідовності залежить від типу клітин-хазяїнів, у яких повинен продукуватися білок, і гетерологічна сигнальна послідовність може заміщати нативну сигнальну послідовність. Приклади сигнальних пептидів, які є функціональними у клітинах-хазяїнах ссавців, включають наступне: сигнальну послідовність інтерлейкіну-7 (IL-7), описану в патенті США № 4965195; сигнальну послідовність рецептора інтерлейкіну-2, описану в Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-4, описаний у Європейському патенті № 0367566; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу I, описаний у патенті США № 4968607; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу II, описаний у Європейському патенті № 0460846. В одному варіанті здійснення молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка за даним винаходом містять лідерну послідовність, як зображено на фігурі 24.

Вектор може містити один або декілька елементів, що полегшують експресію, коли вектор інтегрований у геном клітини-хазяїна. Приклади включають елемент EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) і ділянку прикріплення до матриці (MAR). MAR опосередковують структурну організацію хроматину й можуть ізолювати інтегрований вектор від ефекту "положення". Таким чином, MAR особливо застосовні, коли вектор використовується для створення стабільних трансфектантів. З рівня техніки відомий ряд природних і синтетичних нуклеїнових кислот, що містять MAR, наприклад патенти США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Вектори експресії за даним винаходом можуть бути сконструйовані з вихідного вектора, такого як комерційно доступний вектор. Такі вектори можуть містити всі необхідні фланкувальні послідовності або не містити їх. Якщо одна або декілька з описаних у даному документі фланкувальних послідовностей спочатку не є присутніми у векторі, то їх можна одержати окремо та лігувати у вектор. Способи, які застосовуються для одержання кожної з фланкувальних послідовностей, добре відомі фахівцям в цій галузі техніки.

Після того, як вектор був сконструйований і в належний сайт вектора була вставлена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує мутеїн IL-2, молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, або важкий й/або легкий ланцюг антитіла до IL-2, повний вектор може бути вбудований у придатну клітину-хазяїна для ампліфікації й/або експресії поліпептиду. Трансформацію вектором експресії вибраної клітини-хазяїна можна здійснювати за допомогою добре відомих способів, включаючи трансфекцію, інфекцію, спільне осадження з фосфатом кальцію, електропорацію, мікроін'єкцію, ліпофекцію, трансфекцію, опосередковану DEAE-декстраном, або інші відомі методики. Вибраний спосіб частково буде залежати від використовуваного типу клітини-хазяїна. Такі способи та інші придатні способи широко відомі фахівцям у даній галузі та наведені, наприклад, у Sambrook et al., 2001, вище.

Під час культивування у відповідних умовах клітина-хазяїн синтезує мутеїн IL-2, молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, або важкий й/або легкий ланцюг антитіла до IL-2, які згодом можуть бути зібрані з культурального середовища (якщо клітина-хазяїн секретує його в

середовище) або безпосередньо із клітини-хазяїна, що продукує його (якщо він не секритується). Вибір придатної клітини-хазяїна буде залежати від різних факторів, таких як необхідні рівні експресії, поліпептидні модифікації, бажані або необхідні для активності (такі як глікозилювання або фосфорилування), і легкість згортання в біологічно активну молекулу. Клітина-хазяїн може бути еукаріотичною або прокаріотичною.

Клітинні лінії ссавців, доступні як хазяїни для експресії, добре відомі з рівня техніки й включають без обмеження іморталізовані клітинні лінії, доступні з Американської колекції типових культур (ATCC), і будь-які клітинні лінії, використовувані в системі експресії, відомої з рівня техніки, можуть бути використані для одержання рекомбінантних поліпептидів за даним винаходом. Як правило, клітини-хазяїни трансформують рекомбінантним вектором експресії, який містить ДНК, що кодує необхідний мутеїн IL-2, молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіло до IL-2. Серед клітин-хазяїнів, які можуть бути використані, знаходяться прокаріоти, дріжджі або клітини вищих еукаріот. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад *E. coli* або бацили. До клітин вищих еукаріот стосуються клітини комах і добре відомі клітинні лінії ссавців. Приклади придатних ліній клітин-хазяїнів ссавців включають лінію COS-7 клітин нирки мавп (ATCC CRL 1651) Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клітини, клітини 293, клітини C127, клітини 3T3 (ATCC CCL 163), клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або їх похідні, такі як Veggie CHO і споріднені клітинні лінії, які ростуть у безсироватковому середовищі (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клітини HeLa, клітинні лінії BHK (ATCC CRL 10) і клітинну лінію CV1/EBNA, одержану із клітинної лінії нирки африканської зеленої мавпи CV1 (ATCC CCL 70), як описано McMahon et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, ембріональні клітини бруньки людини, такі як 293, 293 EBNA або MSR 293, епідермальні клітини людини A431, клітини людини Colo205, інші трансформовані клітинні лінії приматів, нормальні диплоїдні клітини, клітинні штами, одержані з культури первинної тканини *in vitro*, первинні експлантати, клітини HL-60, U937, HaK або Jurkat. Необов'язково клітинні лінії ссавців, такі як HepG2/3B, KB, NIH 3T3 або S49, наприклад, можуть бути використані для експресії поліпептиду, коли бажано використовувати поліпептид у різних аналізах трансдукції сигналу або репортерних аналізах.

Як альтернатива поліпептид можна одержати в нижчих еукаріотах, таких як дріжджі, або в прокаріотах, таких як бактерії. Придатні дріжджі включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штами *Kluuyveromyces*, *Candida* або будь-який штам дріжджів, здатний експресувати гетерологічні поліпептиди. Придатні бактеріальні штами включають *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* або будь-який бактеріальний штам, здатний експресувати гетерологічні поліпептиди. Якщо поліпептид одержують у дріжджах або бактеріях, може бути бажано модифікувати продукований ними поліпептид, наприклад, за допомогою фосфорилування або глікозилювання відповідних сайтів з одержанням функціонального поліпептиду. Такі ковалентні приєднання можуть бути виконані із застосуванням відомих хімічних або ферментативних способів.

Поліпептид також може бути одержаний за допомогою функціонального зв'язування виділеної нуклеїнової кислоти за даним винаходом з придатними контрольними послідовностями в одному або декількох векторах експресії комах та із застосуванням системи експресії комах. Матеріали й способи для систем експресії бакуловірус/клітина комах комерційно доступні у формі набору, наприклад, від Invitrogen, Сан-Дієго, штат Каліфорнія, США (набір MaxBac®), і такі способи добре відомі з рівня техніки, як описано в Summers and Smith, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), і Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Безклітинні системи трансляції також можна застосовувати для одержання поліпептидів з використанням РНК, одержаних з конструкцій нуклеїнових кислот, описаних у даному документі. Придатні вектори клонування й експресії для застосування з бактеріальними, грибовими, дріжджовими клітинами-хазяїнами й клітинами-хазяїнами ссавців описані Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клітина-хазяїн, яка містить виділену нуклеїнову кислоту за даним винаходом, переважно функціонально пов'язану із щонайменше однією послідовністю для регуляції експресії, являє собою "рекомбінантну клітину-хазяїн".

У певних аспектах даний винахід передбачає виділену нуклеїнову кислоту, що кодує мутеїн людського IL-2, який переважно стимулює регуляторні Т-клітини й передбачає заміну 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; та/або V91S, H16E і амінокислотну послідовність, яка на щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO:1.

Також включені виділені нуклеїнові кислоти, що кодують будь-яку з ілюстративних молекул на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, описаних у даному документі. У переважних варіантах здійснення Fc-ділянка антитіла й мутеїн людського IL-2 кодуються в одній відкритій рамці зчитування, необов'язково з лінкером, що кодується між Fc-ділянкою й мутеїном IL-2.

В іншому аспекті в даному документі передбачені вектори експресії, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують вказаний вище мутеїн IL-2 або молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, функціонально пов'язані із промотором.

В іншому аспекті в даному документі передбачені клітини-хазяїни, що містять виділені нуклеїнові кислоти, що кодують вказані вище мутеїни IL-2, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка або антитіла до IL-2. Клітина-хазяїн може являти собою прокаріотичну клітину, таку як E. coli, або може являти собою еукаріотичну клітину, таку як клітина ссавця. У певних варіантах здійснення клітина-хазяїн являє собою клітинну лінію яєчника китайського хом'ячка (CHO).

В іншому аспекті в даному документі передбачені способи одержання мутеїну людського IL-2. Способи включають культивування клітини-хазяїна в умовах, в яких експресується промотор, функціонально пов'язаний з мутеїном людського IL-2. Потім із вказаної культури збирають мутеїн людського IL-2. Мутеїн IL-2 може бути одержаний з культурального середовища й/або лізатів клітин-хазяїнів.

В іншому аспекті в даному документі передбачені способи одержання молекули на основі мутеїну людського IL-2 і Fc-злитого білка. Способи включають культивування клітини-хазяїна в умовах, в яких експресується промотор, функціонально пов'язаний з молекулою на основі мутеїну людського IL-2 і Fc-злитого білка. Потім із вказаної культури збирають молекулу на основі мутеїну людського IL-2 і Fc-злитого білка. Молекула на основі мутеїну IL-2 людини й Fc-злитого білка може бути одержана з культурального середовища й/або лізатів клітин-хазяїнів.

В іншому аспекті в даному документі передбачені способи одержання антитіла до IL-2. Способи включають культивування клітини-хазяїна в умовах, в яких експресуються промотори, функціонально пов'язані з важким й легким ланцюгами антитіла до IL-2. Потім із вказаної культури збирають антитіло до IL-2. Антитіло до IL-2 може бути одержане з культурального середовища й/або лізатів клітин-хазяїнів.

Фармацевтичні композиції

У деяких варіантах здійснення даний винахід передбачає фармацевтичну композицію, що містить терапевтично ефективна кількість мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 разом з фармацевтично ефективними розріджувачами, носієм, солюбілізатором, емульгатором, консервантом і/або ад'ювантом. У певних варіантах здійснення мутеїн IL-2 перебуває в контексті молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка. Фармацевтичні композиції за даним винаходом включають без обмеження рідкі, заморожені й ліофілізовані композиції.

Переважно матеріали для складання є нетоксичними для реципієнтів за використовуваних дозах і концентраціях. У конкретних варіантах здійснення передбачені фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість терапевтичної молекули, що містить мутеїн IL-2, наприклад, молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка.

У певних варіантах здійснення фармацевтична композиція може містити матеріали для складання, призначені для модифікування, підтримки або збереження, наприклад, рН, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або вивільнення, адсорбції або проникаючої здатності композиції. У таких варіантах здійснення придатні матеріали для складання включають без обмеження амінокислоти (такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін, пролін або лізин); протимікробні речовини; антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію або гідросульфат натрію); буфери (такі як боратний, бікарбонатний, Tris-HCl, цитратні, фосфатні буфери або буфери на основі інших органічних кислот); об'ємоутворювальні засоби (такі як маніт або гліцин); хелатоутворювальні засоби (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)); комплексоутворювальні засоби (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин); заповнювачі; моносахариди; дисахариди та інші вуглеводи (такі як глюкоза, маноза або декстрини); білки (такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); забарвлювальні, ароматизувальні та розріджувальні засоби; емульгувальні засоби, гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон); низькомолекулярні поліпептиди; солеутворювальні протиіони (такі як натрій); консерванти (такі як хлорид бензалконію, бензойна кислота, саліцилова кислота, тимеросал, фенетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або пероксид водню); розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь); цукрові спирти (такі

як маніт або сорбіт); суспендувальні засоби; поверхнево-активні речовини або змочувальні засоби (такі як Pluronic, PEG, сорбітанові естери, полісорбати, такі як полісорбат 20, полісорбат, Triton, трометамін, лецитин, холестерин, тилоксапол); засоби, які збільшують стабільність (такі як сахароза або сорбіт); засоби, які збільшують тонічність (такі як галогеніди лужних металів, переважно хлорид натрію або калію, маніт, сорбіт); середовища для доставки; розріджувачі; наповнювачі та/або фармацевтичні допоміжні засоби. Див., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

У певних варіантах здійснення оптимальна фармацевтична композиція буде визначатися фахівцем у даній галузі техніки в залежності, наприклад, від способу введення, формату доставки й необхідного дозування. Див., наприклад, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище. У певних варіантах здійснення такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення *in vivo* і швидкість кліренсу *in vivo* антигензв'язувальних білків за даним винаходом. У певних варіантах здійснення первинні середовище-носії або носії у фармацевтичній композиції можуть бути або водними, або неводними за своєю природою. Наприклад, придатним середовищем-носієм або носієм може бути вода для ін'єкцій, фізіологічний сольовий розчин або штучна спинномозкова рідина, ймовірно доповнена іншими матеріалами, які традиційно використовуються в композиціях для парентерального введення. Нейтральний забуферений сольовий розчин або сольовий розчин, змішаний із сироватковим альбуміном, є додатковими ілюстративними середовищами-носіями. У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні композиції містять Tris-буфер зі значенням рН, що становить приблизно 7,0-8,5, або ацетатний буфер зі значенням рН, що становить приблизно 4,0-5,5, і можуть додатково містити сорбіт або його придатний замінник. У певних варіантах здійснення даного винаходу композиції на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 можуть бути підготовлені для зберігання за допомогою змішування вибраної композиції, що характеризується необхідним ступенем чистоти, з необов'язковими засобами для складання (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище) у вигляді ліофілізованого осаду або водного розчину. Додатково, у певних варіантах здійснення продукт на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 може бути складений у вигляді ліофілізату із застосуванням відповідних допоміжних речовин, таких як сахароза.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути вибрані для парентеральної доставки. Як альтернатива можуть бути вибрані композиції для інгаляції або для доставки через травний тракт, наприклад перорально. Одержання таких фармацевтично прийнятних композицій перебуває в межах компетенції фахівця в даній галузі. Компоненти складу переважно присутні в концентраціях, які прийнятні для ділянки введення. У певних варіантах здійснення для підтримки композиції за фізіологічного рН або за трохи більш низького рН, як правило, рН у діапазоні від приблизно 5 до приблизно 8, використовують буфери.

Якщо передбачається парентеральне введення, то терапевтичні композиції для застосування в даному винаході можуть передбачатися у вигляді апірогенного, прийнятного для парентерального введення водного розчину, що містить необхідну композицію на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 у фармацевтично прийнятному середовищі-носії. Особливо придатним середовищем-носієм для парентерального введення є стерильна дистильована вода, в якій композицію на основі мутеїну або антитіла до IL-2 складають у вигляді стерильного ізотонічного розчину, що зберігається належним чином. У певних варіантах здійснення одержання може включати складання необхідної молекули з таким засобом, як мікросфери, що вводяться ін'єкцією, біорозкладні частинки, полімерні сполуки (такі як полімолочна кислота або полігліколева кислота), гранули або ліпосоми, які можуть забезпечувати контрольоване або сповільнене вивільнення продукту, який може бути доставлений за допомогою депо-ін'єкції. У певних варіантах здійснення також може застосовуватися гіалуронова кислота, яка забезпечує пролонговану дію у кровообігу. У певних варіантах здійснення імплантовані обладнання для доставки лікарських засобів можуть бути використані для введення композиції на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2.

Фахівцям у даній галузі техніки будуть очевидні додаткові фармацевтичні композиції, у тому числі склади, що включають композиції на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2, у вигляді складів, що забезпечують сповільнену або контрольовану доставку. Також фахівцям у даній області техніки відомі методики складання ряду інших засобів з уповільненою або контрольованою доставкою, таких як ліпосомні носії, біорозкладні мікрочастинки або пористі гранули, а також депо-ін'єкції. Див., наприклад, міжнародну патентну заявку № PCT/US93/00829, яка включена за допомогою посилання й описує контрольоване вивільнення пористих полімерних мікрочастинок для доставки фармацевтичних композицій. Препарати з уповільненим вивільненням можуть включати напівпроникні полімерні матриці у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Матриці для уповільненого вивільнення можуть включати поліестери, гідрогелі, полілактиди (розкриті в патенті США № 3773919 і публікації заявки на європейський патент № EP 058481, кожний з яких включений за допомогою посилання), співполімери L-глутамінової кислоти й етил-L-глутамату (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гідроксиетилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 і Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105),

етиленвінілацетат (Langer et al., 1981, вище) або полі-D(-)-3-гідроксималяну кислоту (публікація заявки на європейський патент EP № 133988). Композиції з уповільненим вивільненням можуть також включати ліпосоми, які можуть бути одержані за допомогою будь-якого з декількох способів, відомих у даній галузі техніки. Див., наприклад, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публікації заявок на європейський патент №№ EP 036676; EP 088046 і EP 143949, включені за допомогою посилання.

Фармацевтичні композиції, застосовувані для введення *in vivo*, як правило, передбачені у вигляді стерильних препаратів. Стерилізація може бути досягнута за допомогою фільтрації через мембрани для стерильної фільтрації. У випадку якщо композицію ліофілізують, то стерилізацію за допомогою даного способу можна виконувати або перед ліофілізацією і відновленням, або після них. Композиції для парентерального введення можуть зберігатися в ліофілізованій формі або у вигляді розчину. Як правило, композиції для парентерального введення поміщають у контейнер, що має стерильний вхідний отвір, наприклад, пакет або флакон для внутрішньовенного розчину із пробкою, що проколюється голкою для підшкірних ін'єкцій.

В аспектах даного винаходу передбачені складі на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2, що самостійно буферується, які можна використовувати як фармацевтичні композиції, як описано в міжнародній патентній заявці WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Як обговорювалося вище, у певних варіантах здійснення передбачені композиції на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2, зокрема, фармацевтичні молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, які включають на додаток до композиції на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2, один або декілька допоміжних речовин, таких як ті, які ілюстративно описані в цьому розділі й в інших розділах даного документа. При цьому допоміжні речовини можуть застосовуватися в даному винаході для найрізноманітніших цілей, таких як регулювання фізичних, хімічних або біологічних властивостей складів, як, наприклад, регулювання в'язкості, і/або способів за даним винаходом для підвищення ефективності, і/або стабілізації таких складів і способів від деградації й погіршення якості, наприклад, внаслідок стресових впливів, що виникають під час виробництва, доставки, зберігання, підготовки перед використанням, введення й після нього.

Доступні різні пояснення, що стосуються стабілізації білка, а також матеріалів для складання й способів, застосованих щодо цього, як, наприклад, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", в RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), і Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), кожний з яких включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті, особливо в частинах, що стосуються допоміжних речовин і способів, які стосуються них, для складів на основі білка, що самостійно буферизується, згідно з даним винаходом, особливо щодо білкових фармацевтичних продуктів і способів для застосування на тварин і/або людях.

Згідно з певними варіантами здійснення даного винаходу можна використовувати солі, наприклад, для регулювання іонної сили й/або ізотонічності складу й/або покращення розчинності й/або фізичної стабільності білка або іншого інгредієнта композиції згідно з даним винаходом.

Добре відомо, що іони можуть стабілізувати нативний стан білків шляхом зв'язування із зарядженими залишками на поверхні білка й шляхом екранування заряджених і полярних груп у білку й зниження сили їх електростатичних взаємодій, притягувальних і відштовхувальних взаємодій. Іони також можуть стабілізувати денатурований стан білка, зокрема, шляхом зв'язування денатурованих пептидних зв'язків (-CONH) білка. Крім того, іонна взаємодія із зарядженими й полярними групами в білку також може зменшити міжмолекулярні електростатичні взаємодії й, завдяки цьому, запобігати або зменшувати агрегацію й нерозчинність білка.

Різновиди іонів суттєво відрізняються за своїм впливом на білки. Був розроблений ряд категоріальних рангів іонів і їх впливу на білки, які можна застосовувати під час складання фармацевтичних композицій згідно з даним винаходом. Один приклад являє собою ряд Гофмейстера, який ранжує іонні й полярні неіонні розчинені речовини за їхнім впливом на конформаційну стабільність білків у розчині. Стабілізуючі розчинені речовини називаються "космотропними". Дестабілізуючі розчинені речовини називаються "хаотропними". Космотропи зазвичай використовуються у високих концентраціях (наприклад, >1 молярний сульфат амонію) для осадження білків з розчину ("висолювання"). Хаотропи зазвичай використовуються для протезування зубів та/або для солюбілізації білків ("усолювання"). Відносна ефективність іонів до "висолювання" і "висолювання" визначає їхнє положення в ряді Гофмейстера.

Вільні амінокислоти можна використовувати в складах на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 відповідно до різних варіантів здійснення даного винаходу як об'ємоутворюючих засобів, стабілізаторів і антиоксидантів, а також для інших стандартних варіантів застосування. Лізин, пролін, серин і аланін можуть бути використані для стабілізації білків у складі. Гліцин придатний при ліофілізації для забезпечення правильної структури й властивостей таблетки. Аргінін може

бути придатний для інгібування агрегації білка як у рідких, так і в ліофілізованих складах. Метіонін застосовний як антиоксидант.

Полііоли включають цукри, наприклад, маніт, сахарозу й сорбіт, і багатоатомні спирти, такі як, наприклад, гліцерин і пропіленгліколь, і для цілей обговорення в даному документі поліетиленгліколь (PEG) і споріднені до нього речовини. Полііоли є космотропними. Вони являють собою застосовні стабілізуючі засоби як у рідких, так і в ліофілізованих складах для захисту білків від процесів фізичної й хімічної деградації. Полііоли також застосовні для регулювання тоничності складів.

У число полііолів, застосовних у вибраних варіантах здійснення даного винаходу, входить маніт, зазвичай застосовуваний для забезпечення структурної стабільності маси в ліофілізованих складах. Він забезпечує структурну стабільність маси. Зазвичай його застосовують із ліопротектором, наприклад, сахарозою. Сорбіт і сахароза є одними із переважних засобів для регулювання тоничності й як стабілізатори для захисту від стресів, зумовлених замерзанням-відтаванням, під час транспортування або при одержанні нерозфасованого продукту в способі виробництва. Цукри, що відновлюють (які містять вільні альдегідні або кетоніві групи), такі як глюкоза й лактоза, можуть глікувати поверхневі залишки лізину й аргініну. Отже, вони зазвичай не входять до числа переважних полііолів для застосування згідно з даним винаходом. Крім того, цукри, які утворюють такі реакційноздатні сполуки, як наприклад, сахароза, яка гідролізується до фруктози і глюкози в кислих умовах, а отже викликає глікування, також не входять із даною метою до числа переважних полііолів за даним винаходом. PEG застосований для стабілізації білків і як кріопротектор, і у цьому відношенні може застосовуватися в даному винаході.

У варіантах здійснення складів на основі мутеїну IL-2 і/або антитіла до IL-2 додатково передбачені поверхнево-активні речовини. Молекули білка можуть бути піддані адсорбції на поверхнях і денатурації й наступній агрегації на межах розділу повітря-рідина, тверда речовина-рідина й рідина-рідина. Ці ефекти зазвичай підвищуються зворотно пропорційно концентрації білка. Зазвичай, ці шкідливі взаємодії зворотно пропорційні концентрації білка і, як правило, збільшуються фізичним перемішуванням, наприклад, що виникають при транспортуванні і маніпуляції із продуктом.

Для запобігання, зведення до мінімуму або зменшення адсорбції на поверхні традиційно застосовуються поверхнево-активні речовини. Застосовні у цьому відношенні поверхнево-активні речовини в даному винаході включають полісорбат 20, полісорбат 80, інші естери жирних кислот і сорбітанполіетоксилатів і полоксамер 188.

Поверхнево-активні речовини також зазвичай застосовуються для контролю конформаційної стабільності білка. Застосування поверхнево-активних речовин з даною метою є специфічним для білка, оскільки будь-яка вказана поверхнево-активна речовина, як правило, стабілізує одні білки і дестабілізує інші.

Полісорбати піддані окисній деградації й найчастіше під час постачання містять достатню кількість пероксидів, щоб викликати окиснення бічних ланцюгів білкових залишків, особливо метіоніну. Отже, полісорбати слід застосовувати обережно, і за їх застосування їх слід використовувати в найменшій ефективній концентрації. Щодо цього, полісорбати є прикладом загального правила, згідно з яким допоміжні речовини слід застосовувати в їхніх найнижчих ефективних концентраціях.

У варіантах здійснення складів на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 додатково передбачено один або декілька антиоксидантів. Деякою мірою шкідливе окиснення білків може бути попереджене у фармацевтичних складах шляхом підтримки належних рівнів кисню й температури навколишнього середовища й шляхом запобігання впливу світла. Антиоксидантні допоміжні речовини також можуть застосовуватися для запобігання окисній деградації білків. До числа застосовних у цьому відношенні антиоксидантів належать засоби, що відновлюють, поглиначі кисню/вільних радикалів і хелатувальні засоби. Антиоксиданти для застосування в складах на основі терапевтичного білка згідно з даним винаходом переважно є водорозчинними й зберігають свою активність протягом усього строку придатності продукту. У цьому відношенні EDTA є переважним антиоксидантом згідно з даним винаходом.

Антиоксиданти можуть ушкоджувати білки. Наприклад, засоби, що відновлюють, зокрема, такі як глутатіон, можуть порушувати внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Таким чином, антиоксиданти для застосування в даному винаході, серед іншого, вибрані для усунення або достатнього ступеня зменшення можливості ушкодження білків у складі.

Склади згідно з даним винаходом можуть включати іони металів, які є білковими кофакторами і які необхідні для утворення білкових координаційних комплексів, таких як цинк, необхідний для утворення певних суспензій інсуліну. Іони металів також можуть пригнічувати деякі процеси, які призводять до деградації білків. Однак іони металів також каталізують фізичні й хімічні процеси, які призводять до деградації білків.

Іони магнію (10-120 мМ) можуть бути використані для пригнічення ізомеризації аспарагінової кислоти в ізоаспарагінову кислоту. Іони Ca^{+2} (до 100 мМ) можуть підвищувати стабільність

дезоксирибонуклеази людини. Однак Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} можуть дестабілізувати rhDNase. Аналогічним чином, Ca^{+2} і Sr^{+2} можуть стабілізувати фактор VIII, при цьому він може бути дестабілізований іонами Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} , Cu^{+2} і Fe^{+2} , і його агрегація може бути збільшена завдяки іонам Al^{+3} .

У варіантах здійснення складів на основі мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 додатково передбачено один або декілька консервантів. Консерванти необхідні під час розробки багатодозових складів для парентерального введення, які передбачають більше одного відбору з того самого контейнера. Їх основна функція полягає в пригніченні росту мікроорганізмів і забезпеченні стерильності продукту протягом усього строку придатності або строку застосування лікарського продукту. Традиційно використовувані консерванти включають бензиловий спирт, фенол і м-крезол. Хоча консерванти давно застосовуються з низькомолекулярними препаратами для парентерального введення, розробка складів на основі білків, що включають консерванти, може бути складним завданням. Консерванти практично завжди характеризуються дестабілізуючим ефектом (агрегацією) щодо білків, і це стало основним фактором, який обмежує їх застосування в багатодозових білкових складах. На сьогодні більшість білкових лікарських засобів були складені тільки для однократного застосування. Однак, якщо можливо одержувати багатодозові склади, вони мають додаткову перевагу, що полягає в забезпеченні зручності для пацієнтів і покращенні ринкової привабливості. Гарним прикладом є гормон росту людини (hGH), у випадку з яким розробка складів з додаванням консервантів призвела до появи на ринку більш зручних форм випуску у вигляді багаторазових шприців-ручок. У цей час на ринку доступні щонайменше чотири такі пристрої у вигляді шприців-ручок, що містять склади на основі hGH з додаванням консервантів. Norditropin (рідина, Novo Nordisk), Nutropin AQ (рідина, Genentech) і Genotropin (ліофілізований–двокамерний картридж, Pharmacia & Upjohn) містять фенол, у той час як Somatropе (Eli Lilly) містить м-крезол.

В одному варіанті здійснення мутеїн IL-2 або молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, такі як, наприклад, будь-якої з мутеїнів IL-2 або Fc-злитого білка мутеїну IL-2, описаних у даному документі, складений в 10 mM KPi, 161 mM L-аргініну, pH 7,6.

Під час складання й розробки складів з додаванням консервантів необхідно враховувати декілька аспектів. Ефективна концентрація консерванту в лікарському засобі повинна бути оптимізована. Для цього необхідно провести тестування даного консерванту в лікарській формі в діапазонах концентрацій, які забезпечують протимікробну ефективність без порушення стабільності білка.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені мутеїни IL-2 або Fc-злиті білки мутеїнів IL-2 у ліофілізованих складах. Висушені сублімацією продукти можуть бути ліофілізовані без консерванту і відновлені розріджувачем, що містить консервант, у ході застосування. Це скорочує час, протягом якого консервант контактує з білком, значно мінімізуючи пов'язані із цим ризики для стабільності. У випадку застосування рідких складів ефективність і стабільність консерванту повинні підтримуватися протягом усього строку придатності продукту (від 18 до 24 місяців). Важливо відзначити, що ефективність консерванту повинна бути продемонстрована в кінцевому складі, що містить активний лікарський засіб і всі допоміжні компоненти.

Склади на основі IL-2, як правило, будуть конструювати для конкретних шляхів і способів введення, для конкретних дозувань, що вводяться, і частоти введення, для конкретних засобів лікування конкретних захворювань, з певними діапазонами біодоступності й здатності збереження в організмі, крім іншого. Таким чином, склади можуть бути розроблені згідно з даним винаходом для доставки будь-яким придатним шляхом, включаючи без обмеження пероральний, вушний, очний, ректальний і вагінальний, і парентеральний шляхи, включаючи внутрішньовенну й внутрішньоартеріальну ін'єкцію, внутрішньом'язову ін'єкцію й підшкірну ін'єкцію.

Після того, як фармацевтична композиція була складена, її можна зберігати в стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердої речовини, кристалу або у вигляді зневодненого або ліофілізованого порошку. Такі склади можна зберігати або в готовій до застосування формі, або у формі (наприклад, ліофілізований), яку відновлюють перед введенням. Даний винахід також передбачає набори для одержання одиниці введення у вигляді однократної дози. Кожний набір за даним винаходом може містити як перший контейнер із сухим білком, так і другий контейнер з водним складом. У певних варіантах здійснення даного винаходу передбачені набори, що містять одно- і багатокамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци з рідким вмістом і шприци з ліофілізатором).

Терапевтично ефективна кількість фармацевтичної композиції, яка підлягає застосуванню, що містить мутеїн IL-2, буде залежати, наприклад, від терапевтичного контексту й цілей. Фахівець у даній галузі буде брати до уваги, що відповідні рівні дозування для лікування, частково, будуть варіюватися залежно від молекули, що доставляється, показання, для якого застосовують мутеїн IL-2 або антитіло до IL-2, шляхи введення й розміру (маси тіла, площі поверхні тіла або розміру органа) і/або стану (віку й загального стану здоров'я) пацієнта. У певних варіантах здійснення практикуючий лікар може титрувати дозу і змінювати спосіб введення для одержання оптимального

терапевтичного ефекту. Типова доза може перебувати в діапазоні від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 1 мг/кг або більше залежно від вищезгаданих факторів. У конкретних варіантах здійснення доза може перебувати в діапазоні від 0,5 мг/кг до приблизно 100 мг/кг, необов'язково від 2,5 мг/кг до приблизно 50 мг/кг.

Терапевтично ефективна кількість мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2 за даним винаходом переважно призводить до зниження важкості симптомів захворювання, підвищенню частоти або тривалості безсимптомних періодів або попередженню порушень або недієздатності внаслідок ураження захворюванням.

Фармацевтичні композиції можуть уводитися із застосуванням обладнання медичного призначення. Приклади пристроїв медичного призначення для введення фармацевтичних композицій описані в патентах США №№ 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; та 5,399,163,, усі з яких включені в даний документ за допомогою посилання.

В одному варіанті здійснення передбачена фармацевтична композиція, що містить

Способи лікування аутоімунних або запальних порушень

У певних варіантах здійснення мутеїн IL-2 або антитіло до IL-2 за даним винаходом застосовують для лікування аутоімунного або запального порушення. У переважних варіантах здійснення використовується молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка.

Порушення, які особливо піддаються лікуванню мутеїном IL-2 або антитілом до IL-2, розкритими в даному документі, включають без обмеження запалення, аутоімунне захворювання, atopічне захворювання, паранеопластичні аутоімунні захворювання, запалення хряща, артрит, ревматоїдний артрит, ювенільний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, олігоартрикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, поліартрикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит із системним початком, ювенільний анкілозуючий спондилоартрит, ювенільний ентеропатичний артрит, ювенільний реактивний артрит, ювенільний синдром Рейтера, SEA-синдром (серонегативність, ентеропатія, артропатія), дерматоміозит, псоріатичний артрит, склеродермію, васкуліт, міоліт, поліміоліт, дерматоміоліт, вузликовий поліртеріїт, гранулематоз Вегенера, артеріїт, ревматичну поліміалгію, саркоїдоз, склероз, первинний біліарний склероз, склерозуючий холангіт, синдром Шегрена, псоріаз, бляшковий псоріаз, пустульозний псоріаз, еритродермічний псоріаз, дерматит, atopічний дерматит, атеросклероз, вовчак, хворобу Стілла, системний червоний вовчак (SLE), важку міастенію, запальне захворювання кишечника (IBD), хворобу Крона, виразковий коліт, целиацію, розсіяний склероз (MS), астму, COPD, риносинусит, риносинусит з поліпами, еозинофільний езофагіт, еозинофільний бронхіт, хворобу Гієна-Барре, цукровий діабет I типу, тиреоїдит (наприклад, хворобу Грейвса), хворобу Аддисона, феномен Рейно, аутоімунний гепатит, GVHD, відторгнення трансплантата, ушкодження нирок, васкуліт, індукований гепатитом C, мимовільне переривання вагітності тощо.

У переважних варіантах здійснення аутоімунне або запальне порушення являє собою вовчак, реакцію "трансплантат проти хазяїна", васкуліт, індукований гепатитом C, цукровий діабет типу I, розсіяний склероз, мимовільне переривання вагітності, atopічні захворювання й запальні захворювання кишечника.

В іншому варіанті здійснення пацієнт, у якого є аутоімунне або запальне порушення, або в якого є ризик його розвитку, одержує лікування мутеїном IL-2 або антитілом до IL-2 (наприклад, мутеїном IL-2, розкритим у даному документі, таким як молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, розкрита в даному документі, або іншим мутеїном IL-2, відомий з рівня техніки, або IL-2 дикого типу, необов'язково у вигляді частин Fc-зливої молекули типу, описаного в даному документі), і відслідковують відповідь пацієнта на лікування. Реакцією, що відстежується, пацієнта може бути будь-яка виявлювана або вимірювана відповідь пацієнта на лікування або будь-яка комбінація таких відповідей. Наприклад, реакція може являти собою зміну фізіологічного стану пацієнта, таку як температура тіла або лихоманка, апетит, пітливість, головний біль, нудота, втома, почуття голоду, спрага, ясність розуму тощо. Як альтернатива відповідь може являти собою зміну кількості типу клітин або продукту гена (наприклад, білка, пептиду або нуклеїнової кислоти), наприклад, у зразку периферичної крові, узятій у пацієнта. В одному варіанті здійснення схема лікування пацієнта змінюється, якщо в пацієнта спостерігається виявлювана або вимірювана відповідь на лікування або якщо така відповідь перевищує певний поріг. Зміна може полягати в зниженні або підвищенні частоти введення дози, або зниженні або підвищенні кількості мутеїну IL-2 або антитіла до IL-2, що вводиться на дозу, або "перерви" від введення дози (тобто тимчасовому припиненні лікування або на певний період часу, або доти, поки лікар не вирішить, що лікування слід продовжувати, або поки контрольована відповідь пацієнта не вкаже, що лікування продовжується або його можна відновити), або припиненні лікування. В одному варіанті здійснення відповідь являє собою зміну температури пацієнта або рівнів CRP. Наприклад, відповідь може являти собою підвищення температури тіла пацієнта або підвищення рівня CRP у зразку периферичної крові, або й те, й інше. В одному конкретному варіанті здійснення лікування пацієнта скорочується, призупиняється або припиняється, якщо температура тіла пацієнта підвищується під час курсу лікування на

щонайменше 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2°, або 2,5° С.. В іншому конкретному варіанті здійснення лікування пацієнта скорочують, призупиняють або припиняють, якщо концентрація CRP у зразку периферичної крові пацієнта підвищується в ході курсу лікування на щонайменше 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5, або 2 мг/мл. Інші реакції пацієнта, які можна відслідковувати й використовувати у разі ухвалення рішення про зміну, зменшення, призупинення або припинення лікування, включають розвиток або погіршення стану синдрому підвищеної проникності капілярів (гіпотонію й серцево-судинну нестабільність), порушення функції нейтрофілів (наприклад, що призводить до виявлюваного розвитку або загостренню інфекції або що являє собою їх), тромбоцитопенію, тромботичну ангіопатію, реакції в місці ін'єкції, васкуліт (наприклад, васкуліт, індукований вірусом гепатиту С), або запальні симптоми або захворювання. Додаткові реакції пацієнта, які можна відслідковувати й використовувати під час ухвалення рішення про зміну, зменшення, збільшення, призупинення або припинення лікування, включають підвищення кількості NK-клітин, клітин Treg, FOXP3-CD4 T-клітин, FOXP3+CD4 T-клітин, FOXP3-CD8 T-клітин або еозинофілів. Підвищення цих типів клітин може бути виявлене, наприклад, у вигляді підвищення кількості таких клітин в одиниці периферичної крові (наприклад, виражене у вигляді підвищення кількості клітин у мілілітрі крові) або у вигляді підвищення відсоткового вмісту такого типу клітин порівняно з іншим типом клітин або клітин у зразку крові. Іншою реакцією пацієнта, яку можна відслідковувати, є підвищення кількості мутеїну IL-2, пов'язаного із клітинною поверхнею, або антитіла до IL-2 на CD25⁺ клітинах у зразку периферичної крові пацієнта.

Способи експансії клітин Treg

Мутеїн IL-2, антитіло до IL-2 або молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка можна використовувати для експансії клітин Treg в організмі або зразку суб'єкта. У даному документі передбачені способи підвищення відношення Treg до нерегуляторних Т-клітин. Спосіб включає приведення популяції Т-клітин у контакт із ефективною кількістю мутеїну людського IL-2, антитіла до IL-2 або молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка. Відношення може бути виміряне шляхом визначення відношення CD3+FOXP3⁺ клітин до CD3+FOXP3⁻ клітин у популяції Т-клітин. Типова частота Treg у крові людини становить 5-10 % від загальної кількості CD4+CD3+Т-клітин, однак у разі захворювань, перерахованих вище, цей відсотковий вміст може бути нижче або вище. У переважних варіантах здійснення відсотковий вміст Treg підвищується на щонайменше 10 %, на щонайменше 20 %, на щонайменше 30 %, на щонайменше 40 %, на щонайменше 50 %, на щонайменше 60 %, на щонайменше 70 %, на щонайменше 80 %, на щонайменше 90 %, на щонайменше 100 %, на щонайменше 200 %, на щонайменше 300 %, на щонайменше 400 %, на щонайменше 500 %, на щонайменше 600 %, на щонайменше 700 %, на щонайменше 800 %, на щонайменше 900 % або на щонайменше 1000 %. Максимальна кратність підвищення Treg може варіювати залежно від конкретних захворювань; однак максимальна частота Treg, яка може бути одержана у разі лікування мутеїном IL-2, становить 50 % або 60 % від загального числа CD4+CD3+Т-клітин. У певних варіантах здійснення суб'єктові вводять мутеїн IL-2, антитіло до IL-2 або молекулу на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка, і відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до нерегуляторних Т-клітин у периферичній крові суб'єкта підвищується.

Оскільки мутеїн IL-2, антитіло до IL-2 і молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка переважно призводять до експансії Treg порівняно з іншими типами клітин, вони також застосовні для підвищення відношення регуляторних Т-клітин (Treg) до природних клітин-кілерів (NK) у периферичній крові суб'єкта. Відношення може бути виміряне шляхом визначення відношення CD3+FOXP3⁺ клітин до CD16⁺ і/або CD56⁺ лімфоцитів, які є CD19⁻ і CD3⁻.

Передбачається, що мутеїн IL-2, антитіло до IL-2 або молекула на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка можуть здійснювати терапевтичний ефект на захворювання або порушення в пацієнта без значного підвищення відношення Treg до нерегуляторних Т-клітин або NK-клітин у периферичній крові пацієнта. Терапевтичний ефект може бути зумовлений локалізованою активністю мутеїну IL-2, антитіла до IL-2 або молекули на основі мутеїну IL-2 і Fc-злитого білка в місці запалення або аутоімунітету.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади, як фактичні, так і гіпотетичні, наведені з метою ілюстрації конкретних варіантів здійснення або ознак даного винаходу й не призначені для обмеження його обсягу.

Приклад 1. Передача сигналів мутеїнів IL-2 за участю pSTAT5

Мутеїни IL-2 досліджували щодо відносної активації pSTAT5. Скринінг щодо активності розробляли для ідентифікації мутеїнів з розширеним віком Treg:Teff, тобто таких, які зберігали високий рівень активності в клітинах Treg, при цьому демонструючи значну атенуацію в клітинах Teff. Оскільки активовані клітини Teff експресують підвищені рівні CD25, а пацієнти з аутоімунними й запальними захворюваннями характеризуються підвищеним вмістом цих клітин, автори даного винаходу застосовували CD25⁺-гейтування щодо клітин Teff для імітування більш реалістичної диференціації експресії CD25 у пацієнтів. Активність мутеїнів IL-2 оцінювали за відповіддю фосфорильованого STAT5 у клітинах, виміряного за допомогою аналізу на основі FACS. Стикло, раніше заморожені PBMC людини розморожували й витримували в повному середовищі протягом

0,5-2 годин. Клітини суспендували за концентрації 5-10 мільйонів клітин/мл і розподіляли на аліквоти по 100 мкл на лунку в 96-лунковому планшеті із глибокими лунками (0,5-1 мільйон клітин на лунку). Клітини стимулювали мутеїнами IL-2 за 10-кратного титрування дози в діапазоні від 1 нМ до 200 нМ за кінцевого об'єму 10 мкл протягом 30 хв. Рівень фосфорилювання STAT5 вимірювали з використанням набору буферів BD phosflow. Стисло, для припинення стимуляції додавали 1 мл буфера для лізису/фіксації BD phosflow. Клітини фіксували протягом 10-15 хв. при 37 °C і пермеабілізували за допомогою буфера 1x BD phosflow на льоді перед фарбуванням щодо CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 і pSTAT5. Результати для двох донорів PBMC показано в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Активация мутеїнів IL-2 за допомогою pSTAT5

IL2	Донор 1				Донор 2			
	Обробка 1 нМ IL2		Обробка 200 нМ IL2		Обробка 1 нМ IL2		Обробка 200 нМ IL2	
	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff
Тільки середовище	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
V91H, H16R, E61Q	76,85	24,6	95,1	44,3	82,5	24,7	95,4	68,3
H16E, V91H, E61Q	24,4	1,235	83,4	33,55	26,7	2,04	90,9	44,1
V91H, D20A, E61Q	16,8	1,3	94,1	51,6	19	2,54	95,3	64,2
N88K, M104T	2,2	0,71	11,035	0,98	3,6	1,06	9,22	1,47
V91H, M104T	89,35	47,65	97,65	44,6	96,9	77,5	97,1	69,5
D20A, M104T	52,7	7,195	70,3	17,1	67	12,3	78,3	19,8
H16E, M104T	88,15	47,7	96,25	44	95,9	71,7	95,9	63,3
N88K, M104V	4,89	1,025	21	1,655	4,26	0,91	17,7	2,72
V91H, M104V	89,35	50,8	97	50,9	95,2	73,1	96,7	71,7

Активация мутеїнів IL-2 за допомогою pSTAT5

IL2	Донор 1				Донор 2			
	Обробка 1 нм IL2		Обробка 200 нм IL2		Обробка 1 нм IL2		Обробка 200 нм IL2	
	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+ Teff
D20A, M104V	52,55	6,245	70,05	16,2	66,7	12	76,2	18,9
H16E, M104V	88,95	47,4	96,25	44,2	91,1	59,8	96,5	67,5
V91K, H16E, M104T	44,45	4,105	62,7	11,175	54,7	7,07	70,7	17,2
V91K, H16R, M104T	1,92	1,16	10,9	2,3	3,22	1,64	5,64	1,65
V91K, D20A, M104T	9,34	0,9	31,05	4,78	18,5	2,52	28,9	1,59
D20A, H16E, M104T	22,25	1,94	42	8,835	34,2	2,33	46	9,92
H16E, V91H, M104T	78,6	24,6	89,05	37,75	91	35,2	93,2	46,7
V91H, D20A, M104T	8,825	1,105	27,1	4,355	15,3	1,9	21,7	3,48
V91K, H16E, M104V	39,15	4,94	57,5	13,1	56,6	9,66	66,7	11,7
V91K, H16R, M104V	2,175	1,06	8,995	1,74	4,09	1,5	3,98	0,7
V91K, D20A, M104V	9,07	1,275	30,2	4,165	21,3	2,74	34,8	4,81
H16E, V91H, M104V	79,3	22,7	86,3	33,4	90,3	36,8	92,3	50,4
V91H, D20A, M104V	7,985	1,365	25,6	3,78	11,2	2,96	21,1	2,6
V91K, H16E, E61Q, M104T	35,25	3,21	88,1	35,95	37,6	4,74	93,4	45,4
V91K, H16R, E61Q, M104T	1,57	0,81	13,8	1,4	1,68	0,74	6,93	1,27
H16E, V91H, E61Q, M104T	25,8	1,925	84,1	39,8	38,9	2,63	91,9	47,7
V91H, D20A, E61Q, M104T	49,5	6,74	71,2	18,2	67,4	11,3	79,5	22,9
D20W, E61Q	2,29	0,77	6,655	1,34	2,45	1,2	2,97	1
D20W, V91K, E61Q	3,855	1,1	36,3	4,41	2,89	1,15	32,5	4,57
N88K, E61Q	18,2	1,64	92,95	45,7	26,7	4,22	97,1	64,1
V91K, N88K, E61Q	5,42	0,485	83,25	30,15	6,34	1,45	91,5	41,5
V91K, N88K, E61Q, M104T	2,9	0,765	76,2	21,4	4,02	1,35	87,7	29,6
D20W, V91K, E61Q, M104T	80,6	27,05	95,2	41,25	89,2	35,7	97	61,5
V91H, M104L	90,55	47,85	96,85	39,65	98,1	63,9	96,9	66,3
D20A, M104L	47,7	5,28	69,2	15,35	66	12,6	76,7	24,4
H16E, M104L	89,25	43,45	95,6	38,75	97,2	61	96,6	62,1
V91K, H16R, M104L	3,4	1,04	10,265	0,785	5,19	2,74	5,93	1,64
V91K, D20A, M104L	11,95	1,47	30,55	3,665	21	2,89	30,5	4,89

Приклад 2. Стабільність мутеїнів IL-2

Для відбору стабільних молекул з високим потенціалом технологічності тестували аналізи оцінки молекул за вимірюванням T_m за допомогою DSC разом з 10-денною стабільністю при 40 °C, вимірюваною за допомогою SEC-хроматографії. Результати %MP через 10 днів зображено на фігурі 1.

Приклад 3. Атенуація мутеїнів людського IL-2

Атенуовані мутеїни людського IL-2 оцінювали щодо активності в спленоцитах миші в аналізі *in vitro* pSTAT5. Автори даного винаходу підтверджували активність вибраних мутеїнів щодо імунних клітин миші в аналізі pSTAT5 спленоцитів миші (фіг. 2). Зображені криві підбору дози для трьох атенуованих мутеїнів, H16R, V91K D20A M104V, D20W і контролів, Fc людського IL-2 дикого типу, рекомбінантного людського IL-2 до рекомбінантного IL-2 миші. Спленоцити миші стимулювали протягом 30 хв. у середовищі, що містить титрувальні концентрації мутеїнів, й аналізували за допомогою FACS. Мутеїни продемонстрували такий самий ранговий порядок активності в клітинах Treg миші, як і в клітинах Treg людини (тобто WT>H16R>V91K D20A M104V>D20W). Ранговий порядок був аналогічним для Т-ефекторних клітин.

Приклад 4. Активність *in vivo* мутеїнів IL-2 людини в мишей

Мишам C57Bl6 вводили однократну дозу PBS (контроль носія), IL-2-Fc дикого типу, V91K D20A M104V, H16R або D20W у день 0, а спленоцити збирали й аналізували в день 4 щодо впливу на клітини Treg, CD8 Т-клітини й NK-клітини. Оцінювали три дози (1 мкг, 5 мкг або 25 мкг на мишу), за винятком D20W, який вводили тільки в дозі 25 мкг. Відсотковий вміст клітин Treg, зумовлений CD4+CD25+Foxp3+ клітинами, у загальній кількості живих гейтованих клітин показаний на (A), і показані розрахована загальна кількість клітин Treg (B), CD8 Т-клітин (C) і NK-клітин (D). Як зображено на фігурі 3, IL-2 дикого типу, H16R і V91K D20A M104V індукували значну експансію клітин Treg in vivo дозозалежним чином. Два мутеїни, H16R і V91K D20A M104V, продемонстрували несподівано стійку активність щодо клітин Treg такою самою або навіть більшою мірою, ніж IL-2.Fc дикого типу. На відміну від цього, ні H16R, ні V91K D20A M104V не продемонстрували значної активності щодо CD8 Т- або NK-клітин порівняно з IL-2.Fc дикого типу. Ці результати демонструють, що, незважаючи на значне послаблення активності, вимірюване шляхом зчитування pSTAT5 in vitro, послаблені мутеїни зберігають здатність індукувати стійку відповідь щодо Treg in vivo, шляхом індукування при цьому мінімальної відповіді щодо CD8 Т-клітин і NK-клітин. Таким чином, атенуація непропорційно впливає на селективність Treg:не-Treg in vivo.

Приклад 5. Передача сигналів мутеїнів IL-2 за участю pSTAT5

Мутеїни IL-2 досліджували щодо відносної активації pSTAT5. Скринінг щодо активності розробляли для ідентифікації мутеїнів з розширеним вікном Treg:Teff, тобто таких, які зберігали високий рівень активності в клітинах Treg, при цьому демонструючи значну атенуацію в клітинах Teff. Оскільки активовані клітини Teff експресують підвищені рівні CD25, а пацієнти з аутоімунними й запальними захворюваннями характеризуються підвищеним вмістом цих клітин, автори даного винаходу застосовували CD25+-гейтування щодо клітин Teff для імітування більш реалістичної диференціації експресії CD25 у пацієнтів. Активність мутеїнів IL-2 оцінювали за відповіддю фосфорильованого STAT5 у клітинах, виміряного за допомогою аналізу на основі FACS. Стисло, раніше заморожені PBMC людини розморожували й витримували в повному середовищі протягом 0,5-2 годин. Клітини суспендували за концентрації 5-10 мільйонів клітин/мл і розподіляли на аліквоти по 100 мкл на лунку в 96-лунковому планшеті із глибокими лунками (0,5-1 мільйон клітин на лунку). Клітини стимулювали мутеїнами IL-2 за 10-кратного титрування дози в діапазоні від 0,4 нМ до 25 нМ за кінцевого об'єму 10 мкл протягом 30 хв. Рівень фосфорилування STAT5 вимірювали з використанням набору буферів BD phosflow. Стисло, для припинення стимуляції додавали 1 мл буфера для лізису/фіксації BD phosflow. Клітини фіксували протягом 10-15 хв. при 37 °C і пермеабілізували за допомогою буфера 1x BD phosflow на льоді перед фарбуванням щодо CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 і pSTAT5. Результати для двох донорів PBMC показано в таблиці 2 нижче.

Таблиця 3

Активация мутеїнів IL-2 за допомогою pSTAT5

IL2	Донор 1				Донор 2			
	Обробка 25 нм IL2		Обробка 0,4 нм IL2		Обробка 25 нм IL2		Обробка 0,4 нм IL2	
	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+T eff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+T eff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+T eff	% pSTAT5+ Treg	% pSTAT5+T eff
Тільки середовище	3,85	.045						
WTIL2	100	87,7	99,7	85,3	99,8	91,9	99,5	90,3
V91A, H16A	99,7	89	99,8	85,8	99,8	91,4	99,2	43,4
V91A, H16D	99,4	82,9	99,7	76,4	100	84,5	95,1	22
V91A, H16E	99,6	76,7	100	63,6	99,6	69,4	84,4	11
V91A, H16S	99,9	84,1	99,8	80,9	99,7	88,6	99,1	38,1
V91E, H16A	99,6	85	99,8	78,1	99,8	87,5	96,4	28,3
V91E, H16D	99,5	72,6	99,2	56,9	99,8	64,7	81,2	11,2
V91E, H16E	99,3	63,3	99,3	48,1	99	62,3	74,3	7,16
V91E, H16S	100	84,2	99,3	76,1	99,8	87,3	96,6	28,3
V91K, H16A	99,3	73,4	98,9	55,9	100	65,6	82,4	12,6
V91K, H16D	96,1	37,5	93,8	22,8	95,4	30	45,1	2,1
V91K, H16S	99,4	71	99	53,3	99,8	68,5	70,7	3,36
V91S, H16E	98,6	60,1	98,9	45	98,9	53,6	70,5	7,58

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> AMGEN INC.
 <120> МУТЕЇНИ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 ДЛЯ ЕКСПАНСІЇ Т-РЕГУЛЯТОРНИХ КЛІТИН
 <130> A-2432-WO-PCT
 <150> 62/886,283
 <151> 2019-08-13
 <160> 8
 <170> PatentIn версія 3.5
 <210> 1
 <211> 133
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>
 <221> МОДИФІКОВАНІ_ЗАЛИШКИ
 <222> (125)..(125)
 <223> Cys, Ser, Val або Ala

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2
<211> 133
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<220>
<221> МОДИФІКОВАНІ_ЗАЛИШКИ
<222> (125)..(125)
<223> Cys, Ser, Val або Ala

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3
<211> 227
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 4

<211> 226

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 4

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 Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

225

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

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

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний поліпептид

<400> 8

His His His His His His
1 5

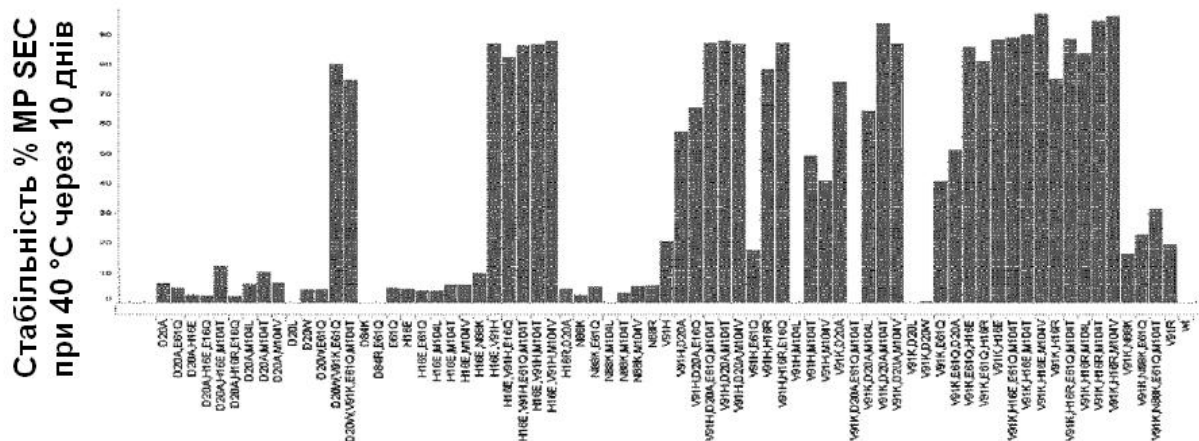


Fig. 1

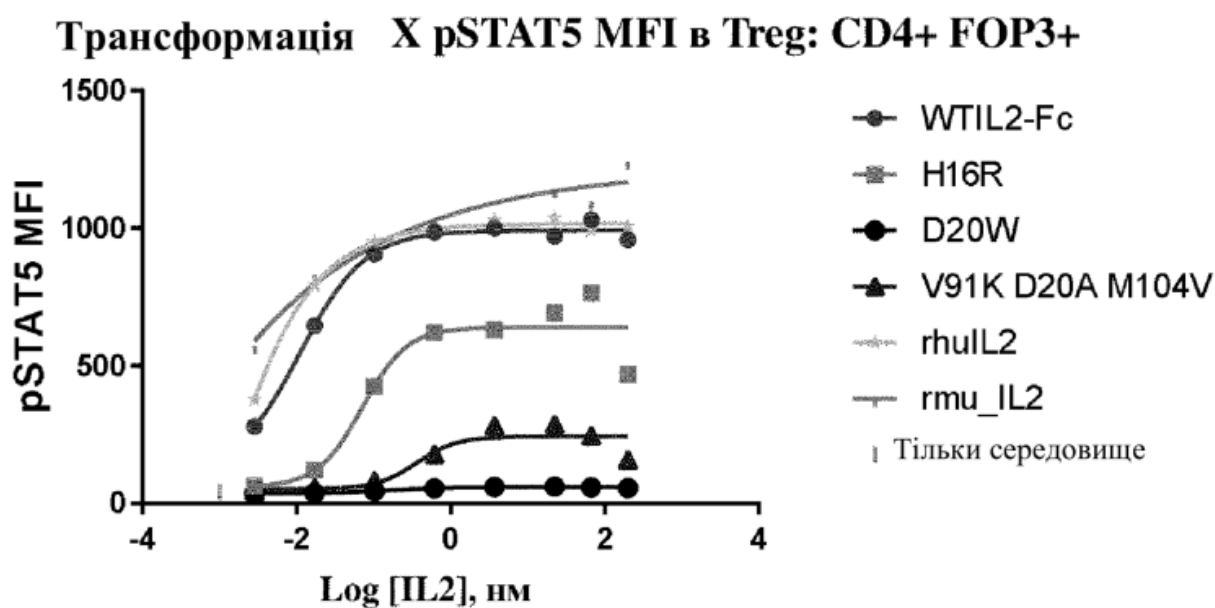
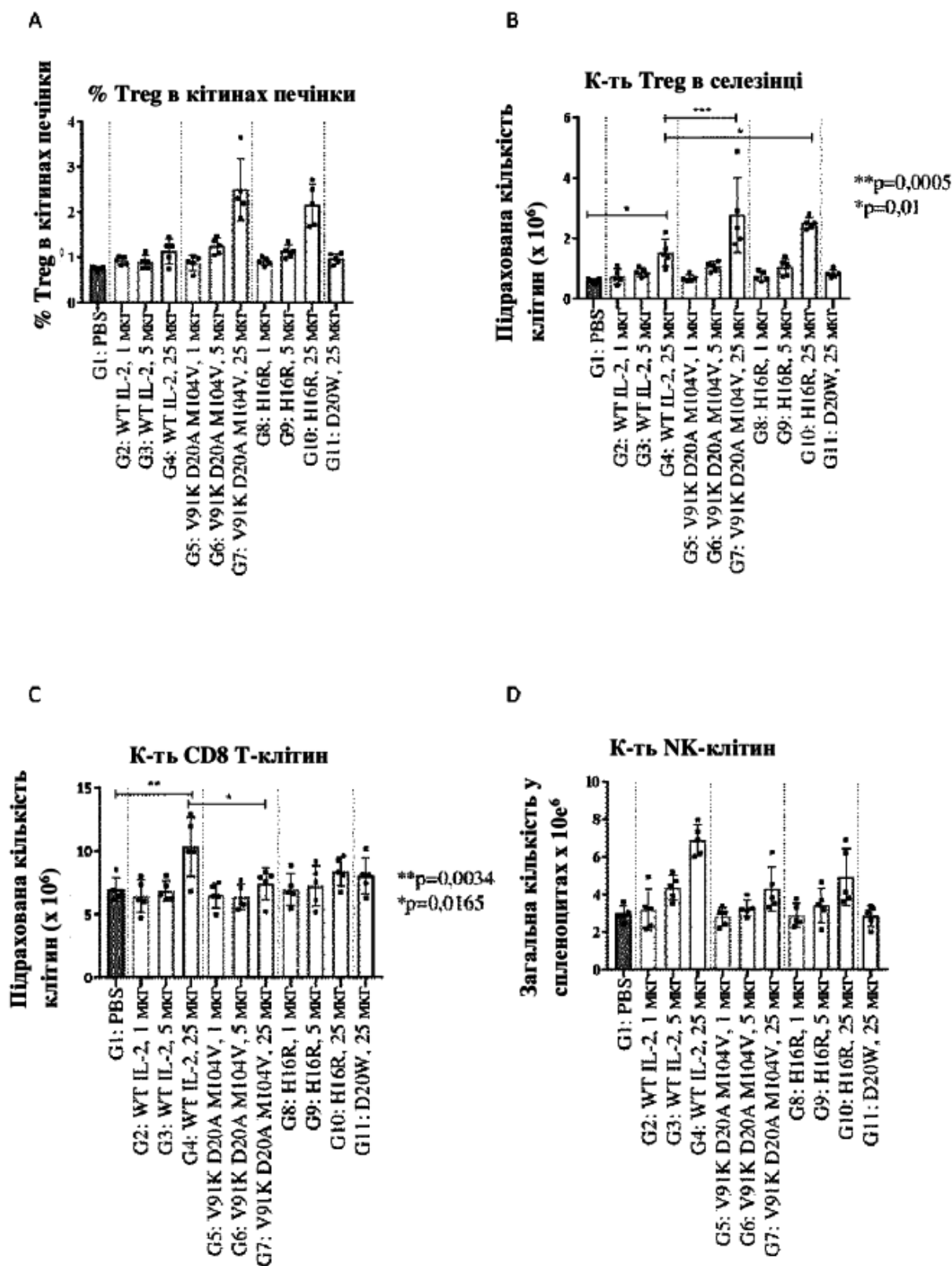


Fig. 2



Фіг. 3